

강원도 일부지역의 렙토스피라 감염에 관한 혈청학적 연구

한림대학 의학부 미생물학교실

조민기 · 민창홍 · 김윤원 · 윤창순

=Abstract=

Serological Studies on Leptospirosis in Kangwondo Area(1985)

Min-Kee Cho, Chang-Hong Min, Yoon-Won Kim and Chang-Soon Yoon

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hallym University

Serological investigations for the leptospirosis on hospitalized patients in Choonchun Sungsim Hospital during the periods from August to November 1985 and 841 inhabitants of Kangwondo area including Choonchun, Choonsung, Inje, Chulwon, Hwachun, Gosung, Taibaik, Samchuk and Yangju area were carried out.

1. Among 58 hospitalized patients who were suspected as leptospirosis, 10 patients were detected to have antibody against *Leptospira*. All of positive sera had the highest antibody titer against serogroup *Icterohemorrhagiae* and most positive sera were also reactive to serogroup *Australis* and *Canicola*. Antibody titer of positive sera detected by microscopic agglutination(MA) test were ranging from 1:40 to 1:2,560. Antibody titer detected by ELISA method were higher than those detected by MAT(ELISA 1:400~1:25,600) and IgM titer of positive sera were generally higher than IgG titer.
2. Of 841 inhabitants in 8 area of Kangwondo, 17 persons (2.02%) possessing antibody against *Leptospira* were detected by ELISA method. IgG titer in positive sera were generally higher than IgM titer. Persons possessing antibody to *Leptospira* were distributed in both sex and in various age group, and no significant regional and occupational fluctuations were observed.

Key Words: Leptospirosis, Microscopic agglutination test (MAT), ELISA, *Leptospira* serogroup and serovar.

서 론

한국에서는 1984년 가을 추수기에 강원도 원주지역 및 전라남도 광주지역 농촌에서 렙토스피라증의 유행이 확인되었으며¹⁾ 1985년 가을에도 광범위한 지역에서 렙토스피라증 환자가 많이 발생하였다. 1984년 이전에는 원인균 분리 및 혈청학적 방법에만 의존하였지만 많은 야생쥐가 렙토스피라균을 보유하고 있는 사실과²⁾ 농촌환경 여건으로 미루어 보아 한국에도 오래전부터 렙토스피라증 환자가 발생하고 있었을 것으로 추측된다.

렙토스피라증의 실험적 진단은 원인균 분리동정³⁾이 어려움 때문에 혈청학적 진단에 의존하는 경우가 많은데 렙토스피라균은 항원학적으로 많은 혈청형이 존재하기 때문에 진단에 사용하는 혈청형의 선

택이 중요하다 하겠다. 근래까지 알려진 혈청형은 19 serogroup에 180여 serovar가 있으나⁴⁾ 한국에 존재하는 *Leptospira*균의 혈청형은 현재 조사 중에 있고 전반적인 파악은 이루어지지 않은 실정이므로 환자를 진단하는데 있어서 많은 혈청형의 항원을 사용하여야 하는 어려운 점이 있다.

저자들은 1985년 8월 부터 11월 사이에 춘천지방을 비롯한 강원도 일부지역에서 렙토스피라증으로 의심되어 한림대학 부속 춘천성심병원에 입원했던 58명의 환자에 대한 혈청학적 진단을 실시하고 렙토스피라 항체 양성환자의 감염균 혈청형의 추정및 앞으로 사용할 진단용 항원의 혈청형 선택을 목적으로 환자혈청의 여러 혈청군(serogroup)항원에 대한 반응도를 비교하였으며 ELISA 방법에 의한 예비진단의 실효성을 검토하였다.

또한 강원도 일부지역에서의 근래의 렙토스피라

감염상황을 파악하기 위하여 춘천, 춘성군지역을 비롯한 8개 지역주민 841명의 혈청을 수집하여 렙토스피라 항체 보유 상황을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 환자혈청

1985년 8월부터 11월 사이에 춘천성심병원에 렙토스피라증으로 의심되어 입원한 58명의 혈청을 채취하여 *Leptospira* 10가지 serogroup에 속하는 12 serovar에 대한 항체를 microscopic agglutination 시험(MAT)방법으로 측정하고¹¹⁾ ELISA 방법¹²⁾에 의해 양성환자 혈청의 IgM 및 IgG가를 측정하였다.

2. 건강인 혈청

강원도 춘천, 인제, 철원, 화천, 고성, 태백, 삼척 및 양구등 8개 지역의 주민 841명의 혈청을 수집하여 ELISA 방법에 의해 항체를 측정하였다.

3. 균 주

항원으로 사용된 균주는 1984년 원주지방 환자에게서 분리된 WH-19주와 미국 CDC, 일본NIH에서 분양받은 serovar *smithi*, *canicola*, *schueffneri*, *pyrogenes*, *hebdomadis*, *autumnalis*, *australis*, *pomona*, *grippotyphosa*, *hardjo* 및 *L. biflexa* Patoc 1 등을 사용하였다.

4. Microscopic agglutination test(MAT)

Galton⁹⁾, Cole¹⁰⁾ 등에 의해 고안된 microtechnique을 사용하였다¹¹⁾. microtiter U bottom plate에 혈청을 제단희석하여 각 well에 25 μ l씩 남게하고 EMJH medium에 4~6일 배양된 생균 부유액을 적당한 농도(현미경 400 \times 로 확대된 시야에 100~200균수)로 조정하여 각 well에 25 μ l씩 넣어 micromixer로 잘 섞고 실온에서 2시간 정치후 각 well에서 소량씩 취하여 slide glass에 놓고 암시야장치현미경으로 관찰하였다. 약 50%의 응집 혹은 용균을 보인 혈청 희석배수를 응집항체가로 택하였다.

5. 효소면역측정법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

박¹³⁾ 및 김¹⁴⁾ 등에 의해 시도되었던 균체항원 부착법에 따른 ELISA 방법을 사용하였다.

1) 항원제조 및 항원부착

MAT에 의해 렙토스피라 항체 양성인 환자혈청에 응집가가 가장 높았던 serogroup *Icterohemorr-*

hagiae 중 serovar *smithi*와 serovar *canicola*, *aust-ralis* 등 균주를 항원으로 사용하였다. EMJH medium에 30 $^{\circ}$ C에서 4~5일간 배양된 균액을 0.3% formalised phosphate buffered saline (pH 7.2)으로 3회 세척하고 균 농도를 MacFarland #1 standard의 $\frac{1}{10}$ 농도로 희석하여 ELISA microplate에 부착시켰다. EIA용 PVC plate(Titertek)에 well당 50 μ l씩 poly-L-lysine(1mg/PBS 100ml)를 분주하고 실온에서 1시간 정치한 후 쏟아버리고 PBS로 희석한 항원을 각 well에 50 μ l씩 분주하여 200 \times g로 20분간 원심한 후 0.5% glutaraldehyde를 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킨후 PBS로 2회 세척하였다. 다시 100 mM glycine(in 0.1% BSA-DMEM)을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 정치하여 glutaraldehyde를 차단했다. PBS로 3회 세척하고 비특이적으로 부착되는 것을 막기 위하여 3% bovine serum albumin이 포함된 PBS-Tween 20을 각 well에 100 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 작용시켜 남은 공간을 피복시킨후 PBS로 3회 세척하여 사용하였다.

2) 혈청희석 및 항체가측정

시험혈청을 0.1% BSA-PBS-Tween 20 용액으로 1:400부터 2배 계단희석하여 각 희석액을 50 μ l씩 항원 부착 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치한 후 PBS-Tween 20으로 3번 세척한 다음 1:2000으로 희석한 peroxidase conjugated antihuman IgM (μ chain specific)와 IgG (γ chain specific) (Cappel Lab)를 well 당 50 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 PBS-Tween 20으로 5회 세척하고 각 well에 50 μ l의 substrate 용액(10ml의 phosphate citrate buffer에 4mg의 o-phenylenediamine을 녹인후 20 μ l의 30% H₂O₂를 넣음)을 넣고 30분 동안 반응시키고 2M H₂SO₄를 50 μ l씩 넣어 반응을 정지시킨후 발색반응을 관찰하였다.

성 적

렙토스피라증으로 의심되어 입원한 환자 58명의 혈청중 *Leptospira* 항체양성인 것은 10건이었으며 이들 혈청의 10가지 serogroup에 대한 항체는 Table 1에서 보는 바와 같이 일반적으로 양성환자 혈청은 모두 serogroup *Icterohemorrhagiae*에 해당하는 한국에서 분리된 균주 WH-19주 및 serovar *smithi*에 대하여 1:40~1:2,560의 항체가를 보였으며 serovar *australis* 항원에도 1:40~1:1,280의 항체가를 보였다. *L. biflexa* Patoc 1 항원에 대한 반응은 높지는 않지만 모두 양성이었다.

Table 1. Antibody titer of patients against *Leptospira* strains(MAT)

Patient No.	Date of serum onset	Antigen (Serovar)											
		WH-19 Smithi	Canicola Utrecht IV	Schueffneri Vleermuis 90C	Pyrogenes Salinem	Hebdomadis Autumnalis	Australis	Pomona	Grippityphosa	Hardjo	Patoc 1		
0~0	8/22	640	1,280	40	20	80	40	1,280	80	20	-	-	160
0~1	9/13	40	40	160	-	20	-	160	-	-	-	-	80
0~3	9/20	640	1,280	80	40	40	20	1,280	40	-	-	-	40
0~4	9/15	640	320	-	-	80	-	80	-	-	-	-	80
7	10/3	1,280	2,560	80	20	40	40	1,280	-	-	-	-	640
9	10/20	160	320	-	20	-	-	640	-	-	-	-	40
33	10/24	320	640	-	-	-	-	1,280	-	-	-	-	160
38	10/30	40	40	80	20	-	-	40	-	-	-	-	40
42	11/9	320	640	-	-	-	-	320	-	-	-	-	40
50	11/16	640	1,280	1,280	20	-	80	1,280	-	160	20	-	320
1*	10/3	20	40	-	-	20	-	20	-	-	-	-	20

*Patient No. 1 was the same person with patient No. 7

양성환자의 혈청을 대상으로 균체항원부착법에 의한 ELISA로 측정된 IgM 및 IgG 가는 Table 2에서와 같이 1:400~1:25600의 범위에 있으며 일반적으로 IgG가 보다 IgM가 높았다.

ELISA에 의한 항체가 측정은 그 민감도가 MAT보다 높으나 각 serovar에 대한 특이도는 낮은 것으로 나타났으며 ELISA 방법은 예비진단 목적에는 적합한 방법인 것으로 간주되었다.

강원도 춘천지역을 비롯한 8개지역 주민 841명에 대한 렙토스피라 항체 보유 사항을 균체항원부착법에 의한 ELISA 방법으로 조사한 결과는 Table 3에서 보는바와 같이 1:400 이상의 항체가 가진 사람은 2.02%에 해당하는 17명이었으며 지역적으로 뚜렷한 차이를 볼수 없었다. Table 4에서와 같이 항체가 양성자의 연령 및 성별에 따른 차이를 볼수 없었으며 직업도 다양하였다. 일반적으로 IgM보다 IgG가 높은 수준이었다.

고 찰

렙토스피라균은 많은 serogroup과 serovar가 있기 때문에 환자의 혈청학적 진단에는 각 serogroup에 해당하는 여러가지 serovar를 항원으로 사용하여야 하나 실제로 여러가지의 항원을 사용하기는 어렵기 때문에 어느지역 또는 나라에 존재하는 serovar를 파악하고 그 serovar균주를 택하여 진단용 항원에 사용하는 것이 일반적인 예이다. 우리나라에 유행하는 serovar는 아직 완전히 파악되지는 않았지만 1984년 이후 분리된 *Leptospira* 균들은 현재까지 조사결과로는 대부분이 serogroup *Icterohemorrhagiae*에 속하는 것으로 동정되고 있으며 따라서 환자의 혈청학적 예비진단에 사용하는 항원은 serogroup *Icterohemorrhagiae*에 속하는 것중 응집성이 높은 균주를 선택하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

실제로 1985년에 춘천지방에서 발생한 양성환자의 혈청에서는 전부 serogroup *Icterohemorrhagiae* 항원에 높은 반응을 보였으며 다음으로 serovar *australis* 항원에도 반응을 보인 것이 특기할만하다 (Table 1).

환자의 혈청학적 진단을 위한 항원-항체 반응시험에는 주로 microtechnique을 이용한 microscopic agglutination test(MAT)가 표준화된 방법으로 많이 이용되고 있으며^{8, 9, 13}, macroagglutination^{6, 11, 14}이 screening을 목적으로 이용되고 있고 또한 CF test¹⁵, hemolytic test⁷, 간접형광항체법^{10, 16} 및 혈구응집 반응법^{12, 17} 등이 많이 이용되고 있으며 특히 혈구응

Table 2. Antibody titer of patient with polyvalent antigen(ELISA)

Serum No.	Date of onset	Date of serum collection	Antibody titer*	
			IgM	IgG
0~0	8/22	9/3	3,200	25,600
0~1	9/13	9/26	200	400
0~2	9/20	10/2	3,200	200
0~4	9/15	9/24	6,400	3,200
7	10/3	10/23	6,400	800
9	10/20	10/25	400	< 100
33	10/24	11/6	800	< 100
38	10/30	11/9	800	800
42	11/9	11/12	800	< 100
50	11/16	11/19	1,600	3,200
1**	10/3	10/7	400	400

* Antigen was polyvalent of three serovar (smithi, canicola, australis).

** Patient No. 1 was the same person with patient No. 7

Table 3. Distribution of Leptospira antibody positive subject among the inhabitants of Kangwon-do(ELISA)

District	No. fested	No. of positive(%)
Choonchun Choonsung area	395	9 (2.27)
Inje area	102	3 (2.9)
Chulwon area	91	2 (2.2)
Hwachun area	41	1 (2.4)
Gosung area	35	1 (2.8)
Taibaik area	30	1 (3.3)
Samchuk area	114	0 (0)
Yangku area	33	0 (0)
Total	841	17 (2.02%)

집반응은 발병초기의 항체를 검출할 수 있는 장점이 있으나 회복기의 항체는 검출하기 어려운 점이 있다¹¹⁾.

근래에 개발된 ELISA 방법은 민감도가 높고 이용하기 간편하며 혈청내의 IgM, IgG 등 immunoglobulin의 class를 구별하여 측정할 수 있는 장점이 있기 때문에 항원-항체 반응을 통한 혈청학적진단에 많이 이용되고 있으며 렙토스피라증 진단에도 사용되고 있다.^{12, 13, 14)}

Alder¹⁵⁾와 Waltman¹⁶⁾ 등은 파쇄된 균체항원을 이용하고 Thiermann¹⁷⁾ 등은 phenol로 추출한 항원을 이용하여 ELISA를 시행하였다. 박¹⁸⁾ 등은 균체를 직접 EIA plate에 부착하는 방법을 시도하였으며 저자들은 이 방법을 응용하여 이미 MAT로 진단된 환자혈청에 대한 실험으로 민감도를 확인한수

있었다.

현환인 환자에서는 일반적으로 IgM가 높았고 일반주민에서는 IgG가 높음을 확인할 수 있었다. 환자의 예비진단에 있어서는 항원준비가 쉽고 장기간 사용할 수 있으며 결과 판독이 용이하여 많은 환자를 동시에 검사할 수 있는 균체부착법에 의한 ELISA 방법을 사용하는 것이 좋을 것으로 생각되며 예비시험을 위한 항원은 근래에 우리나라 환자에 가장 강하게 반응하는 serogroup *Icterohemorrhagiae*에 속하는 serovar와 *australis, canicola, patoc* 1 등의 serovar 항원을 혼합하여 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

렙토스피라증에서는 항체는 일반적으로 발병후, 6~12일부터 MAT에 의해 측정되며 발병 3~4주후에는 항체가 최고로 상승하는 것이 보통이다. 본 연구에서는 렙토스피라 항체 양성환자들의 대부분이 Table 1에서 보는바와 같이 발병후 5~20일 사이의 채혈되었으며 MAT 방법에 의한 항체가는 1:80부터 1:2,560까지였으며 환자번호 50은 발병 3일만에 높은 항체가를 보이는것은 특이하나 경한 증상으로 시작되었을 경우 환자가 진술한 발병일이 실제와 크게 다른 경우가 있음을 감안할 때 이 경우에도 발병일 기록이 잘못되었을 가능성이 있다.

발병초기에 채혈된 환자는 반드시 2~3주후의 2차 혈청의 항체가를 비교하여 항체가 상승을 확인해야 올바른 진단을 내릴 수 있다. Table 1의 환자번호 1(1차채혈)과 환자번호 7(2차채혈)은 동일인으로 채혈시기가 다르며 2차 채혈의 항체가 상승이 뚜렷함을 볼수 있었다.

강원도 주민 841명의 *Leptospira* 항체보유율 조

Table 4. Leptospira antibody titer of positive subject among the inhabitants of Kangwon-do(ELISA)

Serum No.	Age	Sex	Residence	Occupation	Antbody titer(ELISA)	
					IgM	IgG
2~1	15	M	Choonsung	Merchant	400	1,600
2~99	15	M	Choonsung	Student	400	800
0~74	61	F	"	Farmer	800	400
M~22	32	F	"	-	400	800
M~34	75	F	"	-	400	400
0~26	58	F	Choonchun	-	<400	1,600
0~40	58	M	"	Farmer	<400	800
0~62	47	F	"	Merchant	<400	1,600
0~96	18	F	"	Student	400	800
5~4	23	F	Chulwon	-	400	1,600
0~59	12	F	"	Student	800	400
7~47	24	F	Inje	-	800	800
7~82	32	M	"	Soldier	400	1,600
0~66	63	F	"	-	800	800
H~42	58	M	Hwachun	Official	<400	800
9~6	32	M	Gosung	Soldier	<400	800
3~47	32	M	Taibaik	Soldier	<400	1,600

사에서는 항체부착에 의한 ELISA 시험방법을 이용했으며 serovar *smithi*, *australis* 및 *canicola* 항원을 혼합하여 사용하였다. 항체 보유율은 2.02%(Table 3)이며 삼척지역을 제외하고는 지역적인 차이는 없었으며 항체 양성자들의 성별, 연령, 직업별 상황은 다양하였는데 이것으로 보아 감염원이 다양할 것으로 추측된다. 건강인 혈청은 주로 건강진단을 위해 보건소에 내왕한 사람들로 부터 수집된 것으로 직업이 다양하고 일반적으로 논농사가 적은 지방의 주민이 대상이 되었기 때문에 항체보유율이 높지 않았던 것으로 생각된다.

결 론

1985년 8월부터 11월 사이에 춘천지방에서 렙토스피라증으로 의심되어 입원한 환자에 대한 렙토스피라 항체를 조사하고 춘천지역을 비롯한 강원도내 8개지역 주민 841명의 렙토스피라 항체 보유율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 입원환자 58명중 렙토스피라항체 양성인 환자는 10명이었으며 이들의 혈청은 serogroup *Icterohaemorrhagiae*에 대한 항체가 가장 높았으며 serovar *australis*, *canicola* 및 *patoc* 1 항원에도 반응을 보였다. 생균을 항원으로 사용한 MAT에 의한 항체는 1:40~1:2560이었고 일반적으로 IgM 항

체가 IgG 항체가 보다 높았다.

2. 춘천지역을 포함한 강원도 8개지역 주민 841명의 렙토스피라 항체보유율은 (ELISA로 측정 1:400이상) 2.02%이었고 일반적으로 IgG 항체가 IgM항체가 보다 높았다.

항체양성자의 연령은 12세부터 75세까지 이었으며 성별의 차이는 볼수 없었고 직업도 다양하였다. 삼척지역을 제외하고는 지역별 차이는 거의 없었다.

참 고 문 헌

- 1) 김원원, 황용수, 국윤호, 최강원, 김익상, 차창용, 이승훈: 효소면역측정법을 위한 장티푸스 균체항원의 부착방법. 대한미생물학회지 20: 91 1985.
- 2) 박경화: 효소면역측정법에 의한 렙토스피라증의 진단. 서울대학교 의과대학 대학원 석사학위논문. 1985.
- 3) 조민기, 오희복, 성원근, 박미연, 이명숙, 송철, 백승복, 심재철, 안선동: 농촌지역에서 발생한 출혈성 폐렴양 질환의 미생물학적연구. 국립보건원보 21: 233. 1984.
- 4) Alder B, Faine S and Gordon LM: The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) as a serological test for detecting antibodies aga-

- inst *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* in sheep. *Aust. Vet. J.* **57**: 414, 1981.
- 5) Alder B, Murphy AM, Locarnini SA and Faine S: Detection of specific anti-leptospiral immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 452, 1980.
 - 6) Cole John K Jr, Sulzer CR, and Pursell AR: Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Micro.* **25**: 976, 1973.
 - 7) Cox CD: Hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with leptospiral extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **90**: 610, 1955.
 - 8) Galton MM, Sulzer CR, Santa Rosa CA and Feelds MJ: Application of micro technique to the agglutination test for leptospirosis antibodies. *Applied Micro.* **13**: 81, 1965.
 - 9) Galton MM, Powers DK, Hale AD and Cornell R: A rapid macroscopic slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis, *Amer. J. Vet. Res.* **19**: 505, 1958.
 - 10) Hirschberg N, Calton MM and Sulzer CR: Experiences with the indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of leptospirosis. *Health Lab. Science* **5**: 89, 1968.
 - 11) Howarth JA: A macroscopic tube agglutination test for leptospirosis. *Amer. J. Vet. Res.* **17**: 789, 1956.
 - 12) Krieg NR et al: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 1984.
 - 13) Manual CDC: *Leptospirosis, Methods in Laboratory Diagnosis*, US HEW Publication No. (CDC) **80-8275**, 1978.
 - 14) Muraschi TF: Latex-leptospiral agglutination test. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**: 235, 1958.
 - 15) Randall R, Wetmore PW and Warner AR: Sonic-vibrated leptospirae as antigens in the complement fixation test for the diagnosis of leptospirosis. *J. Lab. Clin. Med.* **34**: 1411, 1949.
 - 16) Sulzer CR and Jones WL: Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Appl. Micro.* **26**: 655, 1973.
 - 17) Sulzer CR, Glosser JW, Rogers F, Jones W L and Frix M: Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis, *J. Clin. Microbiol.* **2**: 218, 1975.
 - 18) Terpstra WJ, Lighthart GS and Schoone GJ: Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): *Zentbl. Bakt. Hyg. Abt. I. Orig.* **247**: 400, 1980.
 - 19) Thiermann, AB and Garrett LA: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* servars *hardjo* and *pomona* in cattle. *Amer. J. Vet. Res.* **44**: 884, 1983.
 - 20) Torten M, Schenberg and Van der Holden J: The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus specific antigen, *J. Infect. Dis.* **116**: 537, 1966.
 - 21) Waltman WD and Dawe DL: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antileptospiral antibodies in swine sera, *Amer. J. Vet. Res.* **44**: 1120, 1983.