

螢光抗體法을 利用한 實驗的 感染 마우스에서의 Leptospira菌의 檢出

石 瑚 峰

徐 鈺 洙

農村振興廳 家畜衛生研究所

서울大學校 農科大學 獸醫學科

緒 論

Leptospira 菌에 感染된 動物에 있어서는 血中抗體檢出으로 그 診斷이 可能하나, 直接 Leptospira 菌의 檢出은 細菌 自體의 까다로운 性狀때문에 그 分離가 쉽지 않다. 暗視野顯微鏡(以下 暗視野法이라함)에 의한 Leptospira 菌 檢出은 動物의 組織이나 體液에서 細菌이 多數 存在할때 可能하다.

더우기 細菌의 分離培養에 있어서도 適切한 培地 造成과 實驗動物의 選擇에서만 이 더욱 效果의으로 利用될 수 있다¹⁾. 그러나 이 두 가지 方法으로 正確한 試驗結果를 얻으려면 많은 時間이 消耗되며 材料自體가 比較의 新鮮해야 하고 他細菌의 汚染이 없을 때 만이 可能하다. 最近 螢光抗體法을 利用하여 여러가지 微生物을 證明하고 있다.

Leptospira 菌을 證明하는데 螢光抗體法을 利用하여 新鮮한 材料는 물론 他 細菌에 汚染된 것이나 오래 保存된 組織과 體液에서 比較的 빠른 時間內에 細菌을 檢出하는 方法이 紹介되었다.

螢光抗體法은 처음 Shelden¹⁴⁾에 의하여 사람의 筋肉 病變에서 *L. icterohemorrhagiae* 를 證明하는데 成功하였고 Moulton 과 Haworth¹⁰⁾는 램스타의 腎臟에서 *L. canicola* 를, White 와 Ristic¹⁶⁾은 기니픽에서 *L. pomona* 를, 檢出하였으며 其後 여러 사람에^{2, 4, 5, 6, 8, 12, 15, 17)}의하여 特異성이 높은 血清型의 同定에 대한 利用을 많이 暗示되고 있다. 특히 마우스는 Leptospira 病의 實驗動物으로써 感受성이 있음이 여러사람에^{7, 11, 18, 19)}의하여 認定되었고 들쥐와 같이 保菌動物로서 사람과 動物에 傳播시킬 可能性이 있음이 알려졌다. Sekiguti¹³⁾는 慶北에서 개, 쥐, 그리고 사람의 Leptospira 病을 調査했으며 또 徐, 劉^{21, 22)} 등은 韓國의 一部地域에 대한 쥐의 血中抗體를 調査한바 있다.

이 研究에서는 螢光抗體法을 利用하여 *L. icterohemorrhagiae* (M20 株)와 *L. australis* (Ballico 株)에 比較

的 感受성이 높은 마우스를 實驗的으로 Leptospira 菌에 感染시켜 그 臟器, 血液 및 尿에서의 細菌 檢出 및 그 出現狀態와 또 暗視野法을 利用하여 血液 및 臟器 浮遊液의 培養으로 부터의 細菌 檢出등을 比較 研究하였다.

材料 및 方法

免疫原 : 供試菌株는 日本 保健研究院에서 分讓받은 *L. icterohemorrhagiae* (M20 株)와 *L. australis* (Ballico 株)를 Korthof 培地에 28°C에서 6~7日間 培養하였다. 培養物을 1,500 r.p.m.에서 15分間 遠心하여 微量의 沈澱物을 除去하고 다시 5°C 超遠心器를 利用하여 10,000 r.p.m.에서 30分間 3回 遠心, 洗滌한뒤 集菌(洗滌液은 磷酸緩衝生理食鹽水)했다. 이때 사용한 稀釋液은 0.3% formalion 磷酸緩衝生理食鹽水(pH 7.2)를 利用했다. 細菌의 濃度는 暗視野顯微鏡 450倍 一視野에서 200 내외가 되게끔 磷酸緩衝生理食鹽水로 稀釋, 4°C 冷暗所에 保管 使用하였다.

免疫血清 : 免疫血清은 體重 2.5~3.0 kg의 健康한 白色 家兔를 供試細菌 菌株當 3頭씩 6頭로 供試했다. 供試動物은 10日間 臨床的인 觀察을 했으며 免疫原을 家兔 耳靜脈에 7日 間隔으로 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 4 ml씩 4回 接種하였고 마지막 接種에서 7日째 되던 날 各接種物로부터 1 ml씩의 血液을 採取하여 凝集反應¹⁾에 의하여 滿足한 血清力價를 確認한 後 全採血하였다.

螢光標識 globulin : 血清內 globulin 抽出과 Fluorescein isothiocyanate (Sigma Chemical Co. 製品)로 標識하는 方法은 安田 등²⁰⁾과 Cherry 등³⁾의 方法에 따랐다. 免疫血清 20 ml를 4.1 M 黃酸암모니아로 5°C에서 一晝夜 放置시켜 globulin을 沈澱시킨다음 이것을 4,000 r.p.m.(5°C)에서 30分間 濃縮하였다. 다시 이것을 증류수로 溶解하고 거기에 硫酸암모니아를 加하여 위와 같은 沈澱操作을 2回 反復한 후 透析膜에 넣어 5°C에

서 0.01 M 磷酸緩衝生理食鹽水 (pH 7.2)로 透析하였다. 殘留 硫酸암모니아는 鹽化바륨으로 檢出하였다.

Globulin의 蛋白質測定은 Micro-Kjeldahl法에 준했는데 抗 *L. icterohemorrhagiae* 血清과 抗 *L. australis* 血清은 각각 12.3 mg/ml과 33.8 mg/ml였다.

Globulin에 螢光物質을 標識하는 操作은 다음과 같이 하였다. 즉 磷酸緩衝生理食鹽水에 희석한 globulin을 magnetic stirrer로 저으면서 천천히 acetone에 녹인 螢光物質을 蛋白質에 대해 1:20比率로 混合하였다. 이어서 0.01 M 磷酸緩衝生理食鹽水 (pH. 7.2)와 0.5 M 炭酸緩衝液 (pH.9.0)을 조용히 適下한 후 5°C 冷藏庫에서 18時間 균등하게 흔들었다. 이때 非螢光物質을 除去하기 위하여 Sephadex G-50과 DEAE-cellulose column으로 濾過 精製했으며 精製分劃된 Fraction I, II, III中 凝集力價가 가장 높은 Fraction II (1:3,200)를 選擇하였다. 이것을 다시 seitz 濾過器로 濾過하여 染色力價를 測定한 다음 4倍 稀釋이 되도록 磷酸緩衝生理食鹽水 (pH 7.2)로 稀釋하여 1ml씩 分瓶, -20°에서 保存하면서 使用하였고 試驗前에 各螢光抗體와 抗原間의 特異性을 調査하였다.

마우스接種: 供試動物은 安養 家畜衛生研究所의 飼育場에서 繁殖 사육된 白色마우스(體重 15~20 g)를 供試 菌株當 24마리씩 對照群 4마리 總 52마리를 使用하였다. 接種 細菌液은 Korthof 培地에서 6~7日間 培養된 것으로서 0.2ml에 100내외의 *Leptospira* 菌이 包含되도록 磷酸緩衝生理食鹽水로 稀釋하여 皮下接種하였다. 接種後 2週동안은 48時間 間隔으로 그후 5週까지는 5日間隔으로 2마리씩 順次的으로 殺處分하였다. 그리고 心臟血液과 尿는 슬라이드 그라스에 直接 塗抹한 반면에 各 臟器材料는 可能한 限 一定한 部位에서 少量을 切斷하여 捺染標本을 만들었다.

螢光染色: 安田 등²³⁾의 直接法을 利用하였으며 可檢材料를 슬라이드 그라스에 塗抹한 後 acetone에 5分

無水 ethanol이나 methanol에 5分間 固定한 後 moist chamber에 넣고 標識螢光抗體로 染色하여 30°C에 30分내지 1時間 乾燥시켰다. 그리고 非特異的 螢光物質을 除去하기 위하여 磷酸緩衝生理食鹽水 (pH. 7.2)로 洗滌한 後 90% glycerin加 0.01 M 磷酸緩衝生理食鹽水로 적신 다음 카바 그라스를 덮고 鏡檢하였다.

螢光顯微鏡에 의한 鏡檢: 染色 標本은 各급적 染色當日에 鏡檢하였다. 可檢材料 1例當 2~3배의 標本을 만들어 檢査하였다. 螢光顯微鏡(日本 Doyoda製)은 U.V. filter 裝置로써 觀察하였고 光源은 超高壓 水銀燈 250UV를 附着시킨 紫外線램프를 使用하였다.

暗視野顯微鏡에 의한 鏡檢과 細菌培養: *Leptospira* 菌 培養過程은 各 材料에 따라 조금씩 달리 하였다. 즉 肝과 腎臟材料는 約 0.5g을 無菌的으로 採取하여 滅菌 마쇄기로 마쇄하여 5ml의 pH 7.2, 0.01M 磷酸緩衝生理食鹽水로 稀釋하여 上層液을 3,000 r.p.m.에 30分間 遠心하여 約 450倍와 150倍率의 暗視野顯微鏡下에서 20視野以上 觀察하였다. 血液材料는 1ml 注射器로 直接 心臟血을 뽑아 Fletcher 培地(5ml)와 Korthof 培地(5ml)에 2~3滴씩 가하여 30°C에서 7~10日間 培養 觀察하였다.

結 果

免疫血清의 力價測定: 家兎 免疫血清을 螢光物質로 標識한 뒤 Sephadex G-50과 DEAE-cellulose로 精製한 免疫血清의 分劃物 I, II 그리고 III을 顯微鏡의 凝集反應에 의해 凝集價를 調査하였던 바 表 I과 같다. 즉 *L. icterohemorrhagiae* (M 20)와 *L. australis* (Ballica)에 대해 分劃 II는 각각 3,200과 6,400으로 가장 높은 力價를 나타냈고, 分劃 III은 800과 3,200을 보인 반면에 分劃 I은 400과 1,600이었다.

Table 1. Agglutinin Titer of Immunoglobulin Fractions by DEAE-cellulose

Antiserum	Fractions	Agglutinin Titer						
		X100	X200	X400	X800	X1600	X3200	X6400
<i>L. icterohemorrhagiae</i>	I	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. australis</i>	I	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	-

Table 2. Fluorescent Antibody (FA) Titre of *L. icterohemorrhagiae* and *L. australis* to Homologous and Heterologous Conjugates.

Antiserum	Antigen	FA Titer					
		4	8	16	32	64	128
<i>L. ictero.</i>	<i>L. ictero.</i>	卅	卅	卅	+	+	-
	<i>L. austral</i>	+	±	-	-	-	-
<i>L. australis</i>	<i>L. ictero.</i>	+	±	-	-	-	-
	<i>L. austral.</i>	卅	卅	卅	卅	+	+

* Reciprocal dilution

血清型 特異性 調査 : *L. icterohemorrhagiae*(M20) 와 *L. australis* (Ballico)에 대한 螢光抗體의 各 抗原에 대한 特異性을 調査하였던 表 2와 같은 成績을 얻었다. 즉 同系抗原에 대하여는 64 또는 128 이상의 力價를 보인 반면에 他系抗原에 대하여는 4라는 낮은 類屬反應을 보였다.

臟器組織과 尿에서의 *Leptospira* 菌 檢出 : *Leptospira* 菌은 螢光顯微鏡下에서 特異한 螢光을 發하는 草綠色의 細菌體를 쉽게 찾아 볼 수 있었다. 마우스 接種에서 接種日數에 따라 血液과 尿를 슬라이드 그라스에 塗抹, 染色하여 조사 하였는데 *L. icterohemorrhagiae*에 관한 成績은 表 3과 같다. 즉 接種後 心血에서는 第2日째에 10視野中 細菌數가 1~2였으나 第6日째는 서서히 增加하여 1視野中 3~6으로 增加되었다. 尿에서는 8日째 標本에서 *Leptospira* 菌이 처음으로 檢

Table 4. Detection of *Leptospira* from Various Tissues, Blood and Urine of Mice Experimentally Infected with *L. australis*

Days after Inoculation	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Blood	Urine
2	-	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	+	-
6	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+
10	卅	+	+	+	卅	卅
12	卅	卅	卅	卅	卅	卅
14	卅	卅	卅	卅	卅	卅
19	卅	卅	卅	卅	卅	卅
24	卅	卅	+	卅	卅	卅
29	卅	卅	+	卅	+	卅
34	+	+	+	卅	-	卅

+ : 1-10 organisms in ten microscopic fields

± : 1-10 organisms in one microscopic field

卅 : 10-20 organisms in one microscopic field

卅 : More than 20 organisms in one microscopic field

出되었다.

*L. australis*에 관한 成績은 表 4와 같다. 接種 2日後에 心血에 少數의 細菌體가 나타났으며, 接種後 2週頃에는 視野中 細菌體가 15~18까지 나타 나다가 그후 점점 減少되었다. 尿에서는 *L. icterohemorrhagiae*와 같았으나 34日後까지도 細菌數가 減少되지 않았다. 各 臟器의 組織標本에서는 第4日째부터 肝, 脾肺에서 細菌體가 처음으로 檢出되었고, 腎臟에서는 6日째에 細菌體가 檢出되었다. *L. icterohemorrhagiae*는 接種後 12日과 14日에, *L. australis*는 14日과 19日에 각기 가장 높은 出現率을 보이다가 점차 減少되었다. 특히 腎臟에서는 34日째 까지도 增加되었으며 肝臟에 있어서는 接種後 12日과 14日에 每視野當 20이상의 細菌이 觀察된 것도 있었다(Fig.2).

Table 3. Detection of *Leptospira* from Various Tissues, Blood and Urine of Mice Experimentally Infected with *L. icterohemorrhagiae*

Days after Inoculation	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Blood	Urine
2	-	-	-	-	+	-
4	+	+	+	-	±	-
6	+	+	+	+	卅	-
8	+	+	+	+	卅	+
10	卅	卅	+	+	卅	卅
12	卅	卅	+	卅	卅	卅
14	卅	+	卅	卅	卅	卅
19	+	+	+	卅	卅	卅
24	+	+	+	+	+	+
29	-	+	-	+	-	+
34	-	-	-	+	-	+

+ : 1-10 organisms in ten microscopic fields

± : 1-10 organisms in one microscopic field

卅 : 10-20 organisms in one microscopic field

Table 5. Comparison of Dark-field Microscopic Test, Fluorescent Antibody Technique and Culture Method in the Demonstration of Leptospires from Tissues of Mice Experimentally Infected with *L. icterohemorrhagiae*

Days after Inoculation	Agglutinin Titer	Blood			Liver		Kidney	
		Culture			Dark-field Examination, FA test	Dark-field Examination, FA test	Dark-field Examination, FA test	Dark-field Examination, FA test
		Fletcher, Korthof, FA test						
2	50	-	-	+	-	-	-	-
4	200	+	-	+	+	+	-	-
6	200	+	+	+	-	+	-	+
8	200	+	+	+	+	+	+	+
10	200	+	+	+	+	+	+	+
12	400	+	+	+	+	+	+	+
14	400	+	+	+	+	+	+	+
19	400	+	-	+	-	+	+	+
24	400	-	-	+	-	+	+	+
29	1600	-	-	-	-	-	-	+
34	1600	-	-	-	-	-	-	+

Table 6. Comparison of Dark-field Microscopic Test, Fluorescent Antibody Technique and Culture Method in the Demonstration of Leptospires from Tissues of Mice Experimentally Infected *L. australis*.

Days after Inoculation	Agglutinin Titer	Blood			Liver		Kidney	
		Culture			Dark-field Examination, FA test	Dark-field Examination, FA test	Dark-field Examination, FA test	Dark-field Examination, FA test
		Fletcher, Korthof, FA test						
2	200	-	-	+	-	-	-	-
4	400	+	+	+	-	+	-	-
6	400	+	+	+	-	+	-	+
8	400	+	+	+	+	+	-	+
10	800	+	+	+	-	+	-	+
12	800	+	+	+	+	+	+	+
14	800	+	+	+	+	+	+	+
19	800	+	-	+	+	+	+	+
24	800	-	-	+	-	+	-	+
29	1600	-	-	+	-	+	+	+
34	1600	-	-	-	-	+	+	+

4. 細菌培養法, 暗視野顯微鏡法 및 螢光抗體法에 의한 *Leptospira* 菌 檢出: 心臟血과 腎, 肝臟을 材料로 하여 細菌培養法과 暗視野顯微鏡法 그리고 螢光抗體法으로 細菌檢出率을 比較해 보았다. (表 5, 6) *L. icterohemorrhagiae* (M 20)를 接種한 마우스의 血液을 培養하여 細菌을 檢出하는 일은 螢光抗體法보다 細菌檢出率이 떨어지며 (表 5), 腎臟 및 肝臟을 乳劑로 만들어 直接 顯微鏡下에서 檢査할 경우 螢光抗體法이 暗視野法보다 좋았다.

L. australis (Ballico)를 接種한 마우스 材料에서 培

養法, 暗視野法 그리고 螢光抗體法의 比較에서 培養法과 暗視野法에 의한 檢出率이 알았다. 그리고 血液材料를 培養할 경우 Fletcher 培地가 Korthof 培地보다 더욱 좋았다.

接種後 血清凝集價의 消長을 調査하였던바 2日에는 *L. icterohemorrhagiae* 와 *L. australis* 가 각각 1:50과 1:200의 낮은 凝集價를 나타내었으나 接種 1週부터는 1:200, 1:400으로 그리고 接種 2週부터는 1:400, 1:800으로 上昇, 마지막 34日에는 1:1,600으로 가장 높은 凝集價를 보였다.

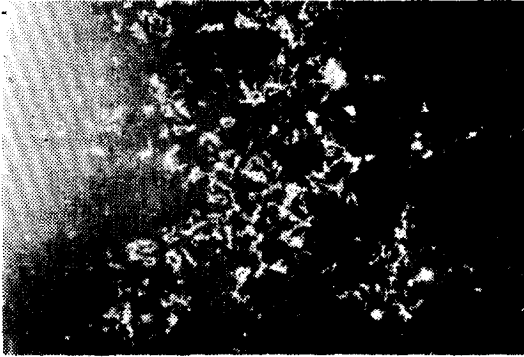


Fig. 1. *L. australis* in pure culture as revealed by fluorescent microscopy. Photograph taken at 100X



Fig. 2. *L. icterohemorrhagiae* in mouse liver as revealed by fluorescent microscopy. Photograph taken at 100X

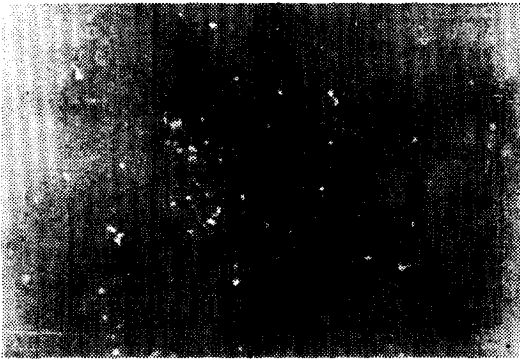


Fig. 3. *L. australis* in mouse kidney as revealed by fluorescent microscopy. Photograph taken at 100X



Fig. 4. *L. icterohemorrhagiae* in mouse kidney as revealed by fluorescent microscopy. Photograph taken at 650X

考 察

Leptospira 菌의 檢出은 주로 暗視野法, 菌培養法 그리고 動物接種法等에 의하여 이루어져 왔으나 細菌自體의 여러가지 까다로운 조건으로 인해서 檢出率이 높지 못하였다. 그리고 暗視野法の 경우에는 材料의 前處理가 필요해서 血液內 섬유질이나 原形質 老廢產物等은 *Leptospira* 菌體로 誤認되기 쉬웠다. 尿에서는 時間의 經過에 따라 細菌自體의 활발한 運動이 없어지게 되어 狹雜物과의 區別이 困難하게 되므로 時間이 큰 影響을 미친다. 한편 細菌培養法과 動物接種法은 判定하기에 長時間이 要하고 따라서 細菌의 汚染等으로 인해 檢出率이 낮다.

이에 반하여 螢光抗體法에서는 材料의 前處理가 必要없이 극히 짧은 時間內에 標本을 만들 수 있고 特異

한 螢光 때문에 쉽고 確實한 判定이 可能한 長點을 지니고 있다.

White와 Ristic¹⁶⁾에 의하면 實驗적으로 感染된 鷄소의 尿에서 *Leptospira* 菌을 檢出함에 있어 螢光抗體法이 暗視野法보다 좋은 成績을 얻게 하였다고 發表하였다.

White, Stoliker와 Galton¹⁷⁾은 螢光抗體法으로 개의 尿와 腎臟에서 少數의 *Leptospira* 菌을 檢出함으로써 이方法의 臨床的 應用價値를 報告하였다. 또 Coffin¹⁸⁾ 등은 鷄胎兒에서 螢光抗體法이 다른 方法보다 훨씬 좋은 結果를 얻게 하였다고 했으며 長期 保存材料를 비롯하여 10% formalin에 1年半 동안 保存된 鷄胎兒에서도 뚜렷한 細菌體를 檢出할 수 있었다고 報告했다. 이 밖에도 Coffin은 개의 腎臟組織 凍結切片의 細尿管管中에 束狀으로 存在하는 *Leptospira* 菌體를 보았다고 報告하였다. Boulanger와 Robertson¹⁹⁾은 螢光抗體法이

Leptospira 菌을 檢出하는데 培養法처럼 좋은 結果를 얻게 하였음을 報告한 바 있다.

이 實驗에서 實驗動物로 마우스를 擇한 理由는 1) 實驗動物로서 感受성이 높고 2) 小動物이라 다루기가 容易하고 求하기가 쉽고 3) Leptospira 菌의 重要한 保菌動物로서 이에 대한 體內 臟器別 細菌出現을 調查할 目的이었다. 接種細菌의 選擇은 특히 마우스에 感受성이 높은 *L. icterohemorrhagiae* 와 *L. australis* 를 擇하였다.

精製 免疫血清의 力價測定 結果 分割Ⅱ가 3,200 으로 가장 높았으며 이는 精製前 免疫血清의 力價 12,800 보다는 크게 낮았다. 이것은 精製處理過程에서 오는 力價消失로 生覺된다.

螢光抗體와 各 抗原間의 特異성을 調査하였던 바 同系抗原에 特異反應을 보이는 반면 他系 抗原間에서도 약간의 類屬反應을 보이기 때문에 이 試驗에서는 螢光抗體를 診斷 目的으로 利用할 때에는 16 倍이상 稀釋해야 함을 알게 되었다.

螢光抗體를 써서 各 臟器와 體液에서 細菌體를 檢出하였더니 血液, 肝, 脾, 肺腎臟 그리고 尿의 順으로 나타났다. 그리고 血液, 肝, 肺臟에서는 細菌數가 서서히 減少되고 腎臟과 尿에서는 계속 유지되었다. 螢光標識時에는 細菌體의 모양이 純 培養時나 臟器內에 있을 때 보다 細菌體가 끊어지거나 서로 뭉쳐 있었다. 臟器內에서 急激한 細菌體의 增加를 보이는 臟器는 肝臟이었다. 또 接種 2週以後부터 異常型의 細菌體를 肝과 腎臟에서 觀察할 수 있었다.

Alexander 는¹⁾ Leptospira 病의 感染初期(1~10 日)에 는 血液에서 2週부터 3~4 個月까지는 尿, 肝, 腎, 脾臟 등에서 細菌體가 檢出되었음을 報告한 바 있다. 이 試驗에서 動物體內의 各 臟器別로 細菌의 出現狀態를 정확히는 알 수 없으나 一般적으로 血液에서 各 臟器 組織으로 浸透되어 마지막에는 腎臟에 定着, 病巢를 形成하면서 增殖하게 됨으로 계속 細菌體가 尿로 排泄되는 것으로 믿어진다.

이상에서 螢光抗體에 의한 各 臟器別 細菌體 檢出은 약간의 異常型을 除外하고는 쉽게 分別할 수 있었으며 螢光抗體法은 여러 사람의 報告^{2), 4), 16)}와 같이 型 特異성이 높고 暗視野法, 細菌分離培養法보다 훨씬 좋은 檢出率을 나타내고 있어 Leptospira 病 診斷에 크게 利用되리라 믿는다.

結 論

實驗적으로 마우스에 *L. icterohemorrhagiae* (M20)

와 *L. australis* (Ballico)를 感染시켜 感染된 血液 尿 및 臟器로부터 Leptospira 菌을 細菌培養法, 暗視野法 그리고 螢光抗體法으로 比較 檢出하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

L. 感染된 마우스의 血液, 尿 및 各臟器에서 *L. icterohemorrhagiae* (M20)와 *L. australis* (Ballica)를 螢光抗體法으로 細菌體를 各各 特異적으로 檢出할 수 있었다.

2. 血液, 尿 및 各 感染臟器에서 螢光抗體法에 의한 細菌檢出은 培養法과 暗視野法보다 優秀하였다.

3. 螢光抗體法에 의한 Leptospira 菌의 檢出은 接種後 2日된 血液에서 觀察할 수 있었고 그후 肝, 脾, 肺 그리고 腎臟에서 觀察되었다. 또 螢光抗體法으로 腎臟과 尿에서 接種後 34日까지 觀察할 수 있었으며 他 臟器에서는 觀察할 수 없었다.

4. Leptospira 菌 檢出을 위한 螢光抗體反應에서 他系抗原보다 同系抗原에 型 特異성이 높았다.

5. 螢光抗體法은 臨床材料로부터 直接 Leptospira 菌을 檢出하는데 利用價値가 크다고 하겠다.

參 考 文 獻

1. Alexander, A.D., Gochenour, W.S., Reinhard, K.R., Ward, M.K. & Yager, R.H.: Leptospirosis. Am. Pub. Hlth. Ass. Inc., 5th Edition. 1970.
2. Boulanger, P. & Robertson, A.: Fluorescein-labelled antibody technique for the demonstration of *Leptospira pomona*. Canad. J. Comp. Med., 1961. 25 : 299
3. Cherry, W.B., Goldman, M. & Carski, T. R.: Fluorescent antibody techniques. Publ. Hlth. Service, Pub. No. 729 (U.S.A.) 1960.
4. Coffin, D.L. & Maestrone, G.: Detection of leptospire by fluorescent antibody. Am. J. Vet. Res., 1962. 23 : 159-164.
5. Coons, A.H. & Kaplan, M.H.: Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 1950. 91 : 1
6. Dacres, W.C.: Fluorescein labeled antibody technique for identification of leptospiral serotypes Am. J. Vet. Res., 1961. 22 : 570
7. Imamura, S., Ashizawa, Y. & Nagata, Y.: Studies

- on leptospirosis. I. Experiment leptospirosis of mice with jaundice, hemorrhage and high mortality. Jap. J. Exp., 1970. 30 : 427
8. Maestrone, C.: The use of an Improved fluorescent antibody procedure in the demonstration of leptospira in animal tissues. Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1963. 27 : 108
 9. Menges, R.W., & Galton, M.M.: Direct cultural methods for the isolation of leptospire from experimentally infected guinea pigs. Am. J. Vet. Res., 1961. 22 : 1085
 10. Moulton, J.E. & Haworth, J.A.: The demonstration of leptospira canicola in hamster kidneys by means of fluorescent antibody. Cornell Vet., 1957. 47 : 524.
 11. Ryu, E.: Inhibitory action of normal sera and their albumin fractions on the leptospiremia of mice. Chinese J. Microbiol., 1968. 1 : 30
 12. Sandhu, T.S. & White, F.H.: Evaluation of a macroscopic plate test and an indirect immunofluorescence test to direct leptospiral antibodies in bovine serum. Can. J. Comp. Med., 1971. 36 : 34
 13. Sekiguti, I.: On the Leptospirosis distributed in Kyung-Sang Buk-Do. J. Bact. (Japan), 1942. 552
 14. Sheldon, W.H.: Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technique in human muscle lesions of *Leptospira icterohemorrhagiae*. J. Inf. Dis., 1953. 105 : 118
 15. Torten, E., Shenberg, E. & Van Der Hoeden, J.: The use immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus specific antigen. J. Infect. Dis., 1966. 116 : 537
 16. White, F.H. & Ristic, M.: Detection of *Leptospira pomona* in guinea pig and bovine urine with fluorescein-labelled antibody. J. Inf. Dis., 1959. 105 : 118
 17. White, F.H.: & Stoliker, H.E., & Galton, M.M.: Detection of leptospire in naturally infected dogs, using fluorescein- labeled antibody. Am. J. Vet. Res., 1961. 22 : 650.
 18. Yanagawa, R., Hiramune, T., Fujita, J. & Ishii, S.: Experimental studies on infection and immunity in Leptospirosis (III. The use of mice for estimation of *Leptospirae*). Jap. Soci. of Vet. Sci., 1959. 21 : 259
 19. Yanagawa, R., Hiranune, T. & Fujita, J.: Inhibition of leptospirae by the kidney tissue suspension of guinea pigs and mice. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1963. 3 : 121
 20. 安田健次郎, 豊鳥滋, 秋山武久: 螢光抗體法 手技 (I, II, III) 1963. p.16-40
 21. 徐鈞洙, 劉榮標. Leptospira 菌에 대한 韓牛와 豚의 血中抗體調查 大韓獸醫學會誌 1972. 12 : 91
 22. 劉榮標, 徐鈞洙: Leptospir 屬菌에 대한 개와 쥐의 血中抗體調查 大韓獸醫學會誌 1971. 11 : 41

Detection of Leptospire in Experimentally Infected

Mice, Using Fluorescent Antibody Technique

H.B. Seuk, D.V.M., M.S.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

I.S. Seo, D.V.M., M.S.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture

Seoul National University

Abstract

Cultural method, dark field microscopy & fluorescent antibody technique were compared for their sensitivity of the detection of leptospire from experimentally infected mice. Two groups of mice were

infected with *L. icterohemorrhagiae* (M20) and *L. australis* (Ballico), and the infected blood, urine and a number of organs were subjected to the bacterial isolation.

The results obtained were summarized as follows:

1. *L. icterohemorrhagiae* (M20) and *L. australis* (Ballico) in blood, urine and various tissues of experimentally infected mice were detected with a negligible non specificity, by the fluorescent antibody technique.
2. The fluorescent antibody technique, as applied to detection of leptospire in blood, urine and various infected tissue, proved to be better than cultural method and dark-field microscopy.
3. Early detection of leptospire by fluorescent antibody technique were possible in blood at 2 days after inoculation, whereas detection of organisms in liver, spleen, lung and kidney were observed later. By means of fluorescent antibody technique, the detection of leptospire in kidney and urine was possible up to 34 days postinoculation, whereas those in other parts were impossible.
4. Fluorescent antibody reaction of leptospire were highly specific to homologous antigen rather than to heterologous one.
5. Fluorescent antibody technique may be of value in the application for the demonstration of leptospira from clinical specimens.