

유행성 출혈형 폐염양 질환의 병원균 분리와 세균학적 특성

이봉기 · 유주현 · 이원영* · 김주덕

연세대학교 공과대학 식품공학과,

의과대학 미생물학교실

Isolation and Bacteriological Characteristics of Spiral form Bacteria from Patient with Epidemic Pulmonary Hemorrhagic Fever

Lee, Bong-Ki, Ju-Hyun Yu, *Won-Young Lee, *Joo-Deuk Kim

Department of Food Engineering,

*Department of Microbiology Yonsei University

We have previously isolated seven strains of spiral form bacteria, which have shown several similar characteristics to *Leptospira* from patient with epidemic pulmonary hemorrhagic fever and natural paddy water. Further studies have performed to characterize them. All of the isolated bacteria were aerobic, gram negative and spiral form and their growth were completely inhibited at temperature below 13°C and above 50°C. In sensitivity test to drugs, the bacteria were resistant to the bile salts, 5-Fu and Amphotericin B, but sensitive to the 8-Azaguanine. The isolated bacteria as well as 5 serotypes of *Leptospira interrogans* reacted the patient sera and it was also shown that antisera from rabbit immunized with the isolated bacteria reacted with 5 serotypes of *Leptospira interrogans*. These results suggest that the isolated bacteria may belong to the genus *Leptospira*.

우리나라에서 유행성 출혈형 폐염양 질환의 발생은 1975년 이후 지금까지 경기도 지방을 중심으로 강원도 충청도에 걸친 중부 내륙지방에서 매년 산발적으로 집단 발생되고 있는 것으로 보고되고 있다 (Baek 등, 1975; Park 등, 1976). 이 질환의 임상증상은 초기에 고열, 오한, 전신쇠약감, 근육통, 두통 및 구토를 야기시키며, 뒤이어 기침과 출혈성 객담 및 각혈을 수반하여 호흡곤란을 초래하며 검사상 특징으로 흉부 X선 침윤 소견과 폐장, 간장, 신장 및 중추신경계에도 이상소견을 나타내는 전신성 질환으로 보고하고 있다 (Shim 등, 1980; Han 등, 1976; Moon 등, 1976). 이 질환의 역사적 근거는 Choi 등 (1980)의 의무기록부 조사에서

이미 1975년 이전부터 발생되어온 것으로 보고되고 있다. 1975년과 1984년 이 질환이 대유행됨으로서 의학회 및 의료계에 커다란 관심을 갖게 되어 그 동안 여러 의료인들에 의해 연구되어 왔다. 그러나 그 대부분이 역학적 및 임상적인 고찰과 병리조직학적인 소견들이었고, 병원체에 관해서는 지금까지 거의 연구된 바가 없어 큰 사회적 문제를 남기고 있는 실정이다.

이에 본 연구자들은 김등(1984)의 종합적 입증을 기초로 하여 유행성 출혈형 폐염양질환 발생지역 가운데 홍천 및 원주지역을 중심으로 현지의사에 의해 이 질환으로 추측되는 환자들로부터 세균학적인 측면으로 병원체를 분리하여 보고한 바 있다 (Lee 등, 1984). 이 논문의 목

적은 분리한 균들의 생물학적 특성을 조사하여 이 질환의 치료와 예방에 기여코저 하는데 있다.

실험 재료 및 방법

균 및 배지

균 배양과 형태적 관찰을 위해 사용된 배지는 56°C에서 2시간 비 동화시킨 가토의 혈청을 10% 함유한 Fletcher 배지 (이후는 Fletcher 배지로 칭함)와 분 교실에서 고안한 YUMC 50 배지 (MEM tissue culture medium, 50ml : normal human urine, 50ml : Hepes buffer, 0.45g : 1.2% Pyruvate, 1ml, pH 7.2)를 사용하며 균의 배양은 모두 37°C 항온기에서 배양하였다.

항원조제

항원은 환자로부터 분리 배양한 균을 0.5% formalin 처리로 고정하여 생리식염수로 3회 세척한 후 다시 생리식염수에 균부유액을 만들어 사용하였다. *Leptospira interrogans* 균주 항원은 일본 Denka 연구소 (Tokyo, Japan)에서 비활성화된 *L. icterohaemorrhagiae*, *L. autum-nalis*, *L. hebdomadis*, *L. australis* 및 *L. canicola*를 구입하여 이용하였다.

항혈청 조제

가토의 항혈청은 균부유액 (1×10^9 cells/ml)과 Freund's incomplete adjuvant 각각 동량 혼합하여 가토의 subcutaneous에 일주일간격으로 4회 접종한 후 항혈청을 얻었으며 사람의 항혈청을 환자로부터 얻은 혈청을 사용하였다.

형태학적 관찰

분리균 형태의 관찰은 그람 및 silver 염색 (Clark, 1981)과 전자현미경에 의해 관찰하였다.

물리 생화학적 특성

열에 대한 내성; Fletcher 배지에 3~5일간 배양한 균을 생리식염수로 균부유액 (1×10^7 cells/ml)을 만들어 여러 온도에서 각각 30분간 열 처리를 하였다. 균의 사멸에 대한 판정은 Fletcher 한천 (1.5%) 평판배지에 7일간 배양하여 균집락형성 여부로서 판정하였다.

5-fluorouracil (5-Fu), 8-azaguanine 및 amphotericin B와 항생제에 대한 감수성; YU

MC5050 및 Fletcher 배지에 5-Fu (중의제약)나 8-azaguanine (8-Ag; Sigma) 및 amphotericin BCE. R. Squib & Sons, Inc. U. S. A.)을 각각 $150 \mu\text{g/ml}$, $250 \mu\text{g/ml}$ 및 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 첨가하여 약제 감수성 검사에 대한 배지를 만들고, 이 배지들에 YUMC5050 배지에서 연속 계대 배양해온 균을 접종한 후 7일간 배양하여 균집락 형성 여부로서 감수성을 판정하였다.

생화학적 성질; 분리균의 생화학적 검사는 Krieg 및 John (1984)과 Sonnerwirth 및 Jarett (1980)의 균동정방법에 의해 장내 그람 음성균, *Spirochetes*, Helical vibriod 그람 음성균 및 *Actinomycetes* 균 등에 관여되는 특성들을 비교하여 조사하였다.

실험 결과

분리균주들의 배양 및 형태적 특징

유행성 출혈형 폐염양 질환의 환자로부터 실험동물을 통하여 분리한 7균주에 대한 배지의 적합성을 알아보기 위한 실험으로 BHI, Nutri-

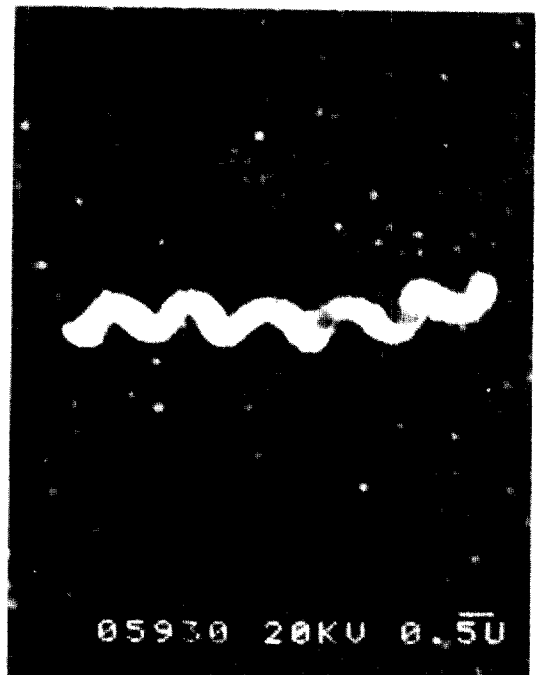


그림 1. 배양 3일째 균의 주사현미경사진 : 오른쪽 방향으로 고인 나선형 세포가 관찰됨.

Table 1. Culture condition and typical shape of 7 strains of the isolated bacteria

Organism	Stain**		Culture media***			Cell shape on the YUMC 5050	Relation to oxygen	Culture**** temperature	
	Gram	Silver	BHI	Nutrient	Fletcher			13°C	37°C
strain	-	+	+	+	+	spiral	aerobic	-	+

ent 및 Fletcher 배지에 각 균주들을 심어 배양 상태를 관찰한 결과 모든 배지에서 분리 균주들은 일반 그람 음성균과 같이 잘 배양되었으며 균집락의 형태는 점액성이 높은 것으로 나타났다. 세포의 형태적 관찰에서는 그림 1 및 2에서와 같이 모두 나선형을 나타내었으며 배양조건에서는 모두 호기성이었고 온도에 대한 성장여부는 모두 13°C 이하에서는 배양이 되지 않았으나 37°C에서는 배양이 되었다.

5-Fu, 8-azaguanine 및 amphotericin B 에 균주의 내성

균주의 성장에 있어 5-Fu, 8-azaguanine 및 amphotericin B에 대한 감수성을 알아보기 위한 실험으로서 YUMC5050 배지에서 연속 계대

배양해 온 균주들을 5-Fu, 8-azaguanine 및 amphotericin B가 각각 함유된 Fletcher 한천 (1.5%) 평판배지에 심어 37°C에서 호기적 조건으로 7 일간 배양한 결과 7 균주들에 모두 5-Fu 포함배지에서 성장되어 5-Fu에 내성을 보이거나 균집락 형성수에 있어서는 5-Fu가 포함되지 않은 배지에 비해 그 집락수가 많이 감소되는 것으로 나타났다. 한편 8-azaguanine에서는 모든 균주가 성장 억제되어 약제에 감수성을 나타내었고 amphotericin B의 경우는 모든 균주가 증식되어 내성을 나타내었다 (Table 2).

균주의 생화학적 특징

분리 균주들의 염색성이 모두 그람 음성반응을 나타내기 때문에 그람 음성 세균과 또한 각 균주들간의 생화학적 특성을 비교한 바 그람 양성 세균의 성장을 억제시키는 bile salt에 대해서 분리균주 모두 그람 음성 세균과 같이 성장이 억제되지 않았으며, 당 발효능력에서는 7주 모두 glucose, sucrose 및 lactose를 전혀 발효하지 못하는 것으로 나타났다. 균주의 운동성 관찰에 있어서는 YUMC5050액체 배지 및 Fletcher 배지에 3 일간 배양한 후 wet preparation으로 검경한 결과 7주 모두 운동성을 나타내었으며 장간균 형태에 비해 단간균 형태의 균이 더 빠른 운동성을 보였다. Glucose로부터 산 생성 능력을 알아보기 위한 methyl red test와 nitrate reduction test를 한 결과 분리균주 7주는 모두 음성반응을 나타내었다 (Table

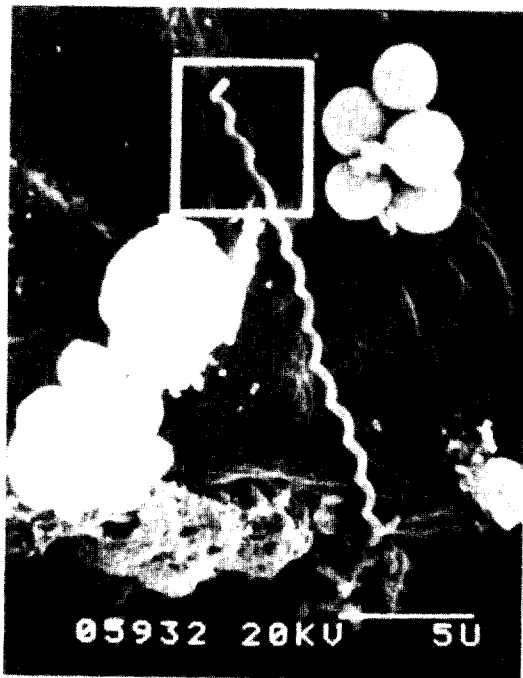


그림 2. 배양 3일째 균의 주사현미경사진 : 오른쪽으로 꼬인 나선형 세포와 구형의 세포가 관찰됨.

Table 2. The Effect of 5-Fu, 8-azaguanine and amphotericin B on the growth of 7 strains of the bacteria

Organism	Culture in the Fletcher medium contained with		
	5-FU (150µg/ml)	8-azaguanine (225µg/ml)	Amp. B (2.5µg/ml)
7 strain	+	-	+

Table 3. Biochemical characteristics of 7 strains of the bacteria

Organism	Resistance in bile salt (0.15%)	Fermentation of carbohydrates			Motility	Methyl red test	Nitrate reduction test
		Glucose	Sucrose	Lactose			
7 strains*	+	-	-	-	+	-	-

3). 이상의 결과에서 분리균주는 모두 같은 것으로 나타났기 때문에 이후의 실험은 5-Fu에 내성을 나타내는 한 균주에 대해서만 조사하였다. 균주의 사멸온도

균의 사멸온도의 측정은 5-Fu 함유 Fletcher 배지에서 6일간 배양된 5-Fu 내성 균주를 생리 식염수로 균부유액을 만들어 45°C, 50°C, 60°C에서 각각 30분간 열처리를 한 후 다시 5-Fu 함유 Fletcher 한천(1.5%) 평판 배지에 7일간 배양하여 그 성장여부를 조사한 결과 50°C 이상의 온도에서는 모두 사멸되어 열에 대해 감수성이 높은 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. The viability of the bacteria at various temperatures

Organism	Incubate cell suspended in the saline for 30min at			
	45°C	50°C	55°C	60°C
5-U Resistance strain	+	-	-	-

분리균과 *Leptospira*의 항원성

분리균의 혈청학적 동정을 위하여 환자들의 항 혈청(Subject 5, Subject 6, Subject 7) 과 분리균에 대한 가토의 항혈청을 비활성화 시킨 *Leptospira interrogans* 5 Serotypes (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. hebdomadis*, *L. australis* 및 *L. canicola*) 항원을 0.5% formalin으로 비활성화시킨 5-Fu 내성 균주에 대해 시험관 응집반응으로 시험한 바, 환자 3명의 혈청은 모두 *Leptospira interrogans* 5 Serotypes 및 분리균에 응집반응을 나타내었다. BG-5에 대한 특이 가토의 항혈청 역시 5종의 *Leptospira*와 5-Fu 내성균주에 모두 응집반응을 나타냈으며 항원들에 대한 응집반응 정도에 있어서는 두 혈청 모두 *L. australis*

Table 5. Tube agglutination by patient and hyperimmunized rabbit sera with *Leptospira interrogans* and the bacteria (BC-5-R strain)

Antigen	Patients sera*			Anti-5-Fu Resistant** Strain Rabbit serum
	subject 5	subject 6	subject 7	
The inactivated				
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	++	++	++	++
<i>L. autumnalis</i>	+	+	+	+
<i>L. hebdomadis</i>	+	+	+	+
<i>L. australis</i>	++	++	++	++
<i>L. canicola</i>	+	+	+	+
The inactivated 5-Fu Resistant strain	++	++	++	++

* : sera from patients the bacteria were isolated
 ** : serum prepared from Rabbit immunized with the isolated bacteria
 + : positive response
 ++ : strong response

와 *L. icterohaemorrhagiae*에 더 강하게 반응하는 것으로 나타났다(Table 5).

고 찰

폐염에 관계되는 질환으로는 adenovirus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus (Huebner 등, 1958; Monto, 1978), arena virus (Sanfor, 1977) 등에 의한 Virus성 폐염과 *Chlamydiae*, *Rickettsiae*, *Mycoplasma* (Chaoock 등, 1963), *Leptospira* (Heath 및 Alexander, 1965; Turner, 1973) 등에 의한 세균성 폐염 및 allergen에 의한 과민성 폐염(hypersensitivity pneumonitis) (Pepys, 1960; Rankin 등, 1967)

등을 들 수 있다.

그동안 유행성 출혈형 폐염양 질환에 대해 여러 연구자(Chae, 1976 ; Han 및 Kim 등, 1976 ; Kim 등, 1976 ; Moon, 1976)들의 임상 및 병리학적 소견으로는 위에 열거한 virus 성 폐염 및 allergen에 의한 과민성 폐염과는 다르다고 보고하고 있고, Park 등(1976)은 환자들이 tick 나 mite 등의 곤충에 물린 경험이 없다고 보고하는 점으로 보아 *Rickettsia*에 의한 감염은 배제하고 있다. 또한 Chae 등(1976)은 이 질병이 한 가구내에 동일질환이 없다는 즉 접촉성 전염이 안된다는 점에서 *Chlamydiae*와 *Mycoplasma*에 의한 의문 또한 배제하고 있다. 1984년 김 등은 위와 같은 사실과 환자의 발생이 주로 논농사에 종사하는 사람이 대부분이라는 점을 종합하여 *Leptospirae*에 의한 감염일 가능성이 높다는 제시에 따라 유행성 출혈형 폐염양환자로 부터의 병원체 분리하는 virus 가 아닌 세균에 초점을 두게 되었다. 대상지역은 이 질환이 많이 발생되고 있는 홍천 및 원주지역에서 42명의 환자가운데 22명의 가검물과 5건의 눈물을 채취하여 guinea-pig 및 아우스에 접종함으로써 모두 7주의 세균을 분리할 수 있었다(Lee 등, 1984).

동물의 감염 장기로부터 원인균을 분리하기 위해 사용된 YUMC 5050배지의 착안은 *Leptospira*가 감염환자나 동물의 urine에서 장기간 배출된다는 Turner (1973) 및 Wong 등(1977)의 보고와 영양요구성에서 pyruvate와 nonessential amino acid가 *Leptospira*의 성장을 증가시킨다는 Johnson 등(1973)의 주장, 그리고 acid에 약하다는 점등을 감안하여 정상인의 urine과 hepes buffer가 함유된 MEM 조식배양 배지를 각각 동량 혼합하여 사용하게 되었다. 7주의 분리균들에 대한 염색성, 배지의 적합성 및 특징적인 세포형태와 배양조건등을 조사한 결과 분리 균주들은 모두 그람 음성이고 나선형이며, 엄격한 호기성이었고 13°C 이하에서는 성장되지 않았다. 이러한 점들은 Bergey's manual의 *Leptospira*특성과 거의 일치하는 양상을 보였다. Johnson 및 Rogers(1964a, 1964b)는 *Leptospira*가 pyrimidine analogue인 5-Fu에 성

장이 억제되지 않으나 일반세균은 감수성을 나타낸다고 하였고 또한 병원성 *Leptospira*는 8-azaguanine에 감수성을 보이거나 비병원성인 *Leptospira biflexa* 균주는 내성을 나타낸다고 보고하였다.

본 실험의 결과에서도 YUMC 5050 배지에서 연속 계대 배양해온 7 균주는 모두 5-Fu에 내성을 나타냈으며 8-azaguanine에서는 감수성을 나타내어 *Leptospira*특성에 또한 일치함을 보여주었다. Table 1에 분리 균주들이 모두 그람 음성이라는 점에서 일반 그람 음성 세균과의 생화학적 비교 시험을 해본 결과 0.15%, bile salt에는 내성을 보여 그람 음성 세균과 특성이 같으나 glucose, sucrose 및 lactose를 하나도 발효하지 않는다는 점은 일반 그람 음성 세균과는 다른 것으로 볼 수 있다. 이는 Johnson (1981)의 실험 결과에서도 *Leptospira*는 당을 carbon 혹은 nitrogen source로 이용하지 않는다는 보고에 준할때 분리균 7주는 모두 *Leptospira*일 가능성을 제시할 수 있다.

열에 대한 균주의 내성 실험에서는 50°C에 30분간 열처리했을 때 완전히 사멸되었다. 이는 Sonnenwirth (1980)가 *Leptospira*는 50°C에서 10분간 열처리에 의해 사멸된다는 보고와 일치하는 것으로 나타났다. 분리 균주에 대한 혈청학적 동정을 위해 환자의 항혈청과 분리균에 대한 가토의 항혈청이 *Leptospira interrogans* 5 Serotypes의 항원 및 5-Fu 내성 분리균주 항원과 응집반응으로 조사한 바 환자의 항혈청 및 분리균의 특이 가토 항혈청 모두 *Leptospira* 5 Serotypes과 5-Fu 내성균주에 양성 반응을 나타내었다. 이는 분리균주가 혈청학적으로 볼때 *Leptospira*와 같은 항원성을 갖고 있다는 것을 의미하고 한편 5-Fu 내성균주와 YUMC 5050배지에서만 배양된 균주는 서로 항원적으로 같은 것임을 알 수 있다.

이상과 같은 사실을 종합하여 보면 분리균의 형태학적, 물리생화학적 및 항원성이 모두 *Leptospira*와 일치하며 또한 환자의 대부분이 논농사에 종사하는 사람들이라는 점을 Kaufmann 및 Martone (1980)이 논농사나 하수도 처리에 종사하는 사람들에서 Leptospirosis 발생율이 많

다는 보고를 미루어 볼 때 유행성 출혈열 폐염양 질환은 *Leptospira interrogans*에 의한 Leptos-

pirosis로 사료되며 이 분리균들에 대한 혈청학적 분류 및 병원성은 현재 연구중에 있다.

적 요

유행성 출혈열 폐염양 질환의 환자 및 논물에서 분리한 병원체의 세균학적 특성을 조사한바, 형태적 및 물리생화학적 특성이 *L. interrogans*와 동일하였으며 또한 형태학적 검사에서도 분리균과 *L. interrogans*는 항원적으로 같은 반응을 보였다.

REFERENCE

- Baek, Y.W., Kim, C.Y., Park, S.H., Suk, Y. K., 1975. Radiologic manifestation of pneumonialike disease occurred epidemically in the central area of Korea in autumn. *J. Korean Med. Assoc.* **19**(4)
- Chae, I. S., Shim, B.S., Chin, C.J., Shin, K.C., Choi, Ko., 1976. Anepidemiological, clinical and radiological study on the epidemic pneumonitis, occurred in the central area of Korea in autumn, 1975. *J. Korean Med. Assoc.* **19**(4).
- Chanock, R.M., Dienes, L.E., 1963. *Mycoplasma pneumonia*: Proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). *Science* **140**: 662
- Choi, I.J., Kim, T.S., Zin, S.Y., Shin, K.C., Choi, K.H., Shim, Y.H., 1980. A report on one autopsy case identified as Lepptospirosis among epidemic pulmonary hemorrhagic fever
- Clark, G., 1981. Staining procedures (4th ed). Williams & Wilkins Baltimore & London.
- Han, W.S., Kim, D.S., 1976. Autopsy and postmortem needle biopsy findings of pneumonitis-like disease. *J. Korean Med. Assoc.* **19**(4)
- Heath, C.W., Jr. Alexander, A.D., 1965. Lep-tospirosis in the united states: Analysis of 483 cases in man, 1949-1961, *N. Engl. J. Med.* **273**: 857-915.
- Huebner, R.M., Rowe, W.P., Chanock, R.M., 1958. Newly recognized respiratory tract viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **12**: 49
- Johnson, R.C., Rogers, P., 1964 b. Differentiation of pathogenic and Saprophytic leptospire with 8-azaguanine. *J. Bact.* **88**: 1618
- Johnson, R.C., Rogers, P., 1964 a. 5-Fluorouracil as a selective agent for the growth of *Leptospirae*. *J. Bact.* **88**: 422
- Johnson, R.C., Walby, R.A.H., Auran, N.E., 1973. Cultivation of parasitospire: Effect of pyruvate. *Appl. Microbiol.* **26**: 118.
- Johnson, R.C., Aerobic spirochetes, 1981. The genus *Leptospira* in star, stolp, truper, balows and schlegel (Editors), The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, New York, 582.
- Kaufmann, A.F., Martone, W.J., 1980. Lep-tospirosis: in public health and preventive medicine. John M Last (ed), 11th ed. Appleton-crofts New York.
- Kim, J.S., Lee, C.W., Oh, D.K., In, S.D., Lee, Y.H., Cho, W.H., 1984. An analytic epidemiological study to test the Hypothesis, Lep-tospirosis as the cause of epidemic Pulmonary hemorrhagic fever in Korea. *Korean J. Epid.* **6**: 8.
- Kim, K.S., 1976. On the Radiologic findings. *J. Korean Med. Assoc.* **19**(4)
- Krieg, N.R., John, G.H., 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1, Williams & Wilkins baltimore, U.S.A.
- Lee, W.Y., Lee, B.K., Kim, J.D., Kim, J.S., Kim, S.O., 1984. *Leptospira interrogans* "Korea" isolated from patients with epidemic pulmonary hemorrhagic fever. *Korean J. Epid.* **6**: 36
- Monto, A.S., 1978. The tecumseh study: V. patterns of infection with respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* **258**: 207
- Moon, G.J., 1976. The gross and histo-

- pathological findings. *J. Korean Med. Assoc.* **19**(4).
20. Park, S.C., Lee, J.H., Kim, M., Park, H.C., Min, S.C., Lee, B.H., Kim, C.S., 1976. An epidemiological study on the epidemic pneumonitis, occurred in Ryeo-Ju and I-Cheon, central Area of Korea, 1975. *J. Korean Med. Assoc.* **19**(4).
 21. Pepys, J., 1966. Pulmonary hypersensitivity disease due to inhaled organic antigens. *Ann. Inter. Med.* **64**: 943
 22. Rankin, J., Kobayashi, M., Barbce, R.A., Dickie, H.A., 1967. Pulmonary granulomatosis due to inhaled organic antigens. *Med. Clin. N. Am.* **51**: 459
 23. Sanfor, J.P., 1977. Arbovirus and Arenavirus infection in Harrison's Principles of internal medicine 8th ed. p1041. McGraw-Hill Kogakusa Ltd.
 24. Shim, Y.H., Shim, B.S., Choe, K.H., Kim, D.S., Shin, K.C., Lee, K.Y., Lee, Y.W., Kim, Y.J., Chin, C.J., 1980. Epidemiological and clinical observation. *J. Korean Med. Assoc.* **23**: 131
 25. Sonnenwirth, A.C., Jarett, L., 1980. The spirochetes, in Gradwohl's clinical Laboratory methods and diagnosis. Sonnenwirth Ac, Jarett L (editor) 8th ed. p1868. The C.V. Mosby Company.
 26. Turner. L.H., 1973. Leptospirosis. *BrMed J.* **1**: 537
 27. Wong, M.L., Kaplan, S., Dunkle, L.M., Stechenberg, B.W., Feign, R.D., 1977. Leptospirosis: A childhood idisease. *L. Pediatrics* **90**: 532.

(Received September 1, 1985)