

한국에서 분리된 렙토스피라균의 생물학적 특성에 대한 연구(1985)

국립보건원 미생물부

박경석 · 오희복 · 이명숙 · 성원근 · 박미연 · 이용우 · 김호훈 · 백승복

=Abstract=

Isolation and Characterization of *Leptospira Interrogans* in Korea, 1985

Kyung-Seok Park, Hee-Bok Oh, Myung-Sook Lee, Won-Keun Sung, Mi-Yeoun Park
Yong-Woo Lee, Ho-Hoon Kim and Sung-Bok Paik

Department of Microbiology, National Institute of Health, Seoul, Korea

A microbiological study for the isolation and characterization of *Leptospira interrogans* was performed in an attempt to define the characteristics of leptospirosis in Korea. The results are summarised as follows.

Thirty-five cultures were isolated from 11 patients with leptospirosis and 24 wild rodents captured in Paju area. The isolation rate of *Leptospira* from wild rodents reached 23.1%.

All 35 cultures were identified as *Leptospira interrogans* by their characteristic morphology and motility in dark field microscopy, pathogenicity in Guinea pig and sensitivity to 8-Azaguanine.

Cultures formed diffuse subsurface colonies with hazy margin and were catalase, peroxidase and oxidase positive.

The fifty percent lethal dose of isolate HM 4 in Guinea pig was 8.9×10^4 org. Mouse passage method was successfully applied in maintenance of fresh isolates without any loss of their original virulence.

Key Words: *Leptospira interrogans*, isolation, virulence

서 론

렙토스피라증은 사람 및 가축에 광범위하게 감염되는 급성질환으로 1886년 Weil에 의해 처음 보고되었으며 그 원인균인 *Leptospira interrogans*는 현재 19개 혈청군, 180여 혈청형으로 분류되고 있다¹⁾.

우리나라에서는 1970년대 이후 농촌지역을 중심으로 유행하여 많은 희생자를 내어온 가칭 출혈성 폐염양 질환환자로부터 1984년 가을 조동²⁾이 렙토스피라균을 분리동정함에 따라 이 질병의 존재가 증명되었으며, 1985년에도 제주도를 제외한 거의 전국에서 환자가 발생되었다. 이에 따라 1985년에 이루어진 광범위한 역학조사 결과 농촌주민의 렙토스피라균에 대한 항체가 보유율이 평균 11.7%에 달하여 이 질병이 오래전부터 우리나라에 풍토병으

로 존재하였으리라는 추정을 뒷받침해 주고있다.

지금까지 보고된바에 의하면 우리나라에서는 본 질환을 규명하는데 중요한 계기가된 폐출혈등 일부 임상증세가 특징적으로 높은 빈도로 나타나고, 180여 혈청형으로 분류되는 원인균의 전세계적 분포양상이 다름에 비추어 이 질병에 대한 백신 및 효과적인 진단방법 개발은 물론 그 병원성기작을 밝히기 위해서는 우리나라에 존재하는 균주들의 분포 및 그 생물학적 특성 파악이 매우 중요한 과제의 하나이다.

이에따라 본 연구에서는 1985년 8월에서 11월 사이에 발생한 렙토스피라증환자 및 일부 농촌지역들 쥐로부터 원인균을 분리하여 동정하고 이들의 제반 생물학적특성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 원인균 분리배양

환자로 부터 렙토스피라균 분리를 위해서는 전국 각 병원에서 본 질환이 의심되어 국립보건원에 혈청 및 균 배양검사를 의뢰한 환자를 대상으로 하였으며, 환자의 혈액 및 뇌척수액은 Fletcher's semi-solid 배지에 1~3방울씩 접종하여 30°C에서 배양하였고 이와함께 항응고제인 1% sodium oxalate로 처리한 혈액은 150~250g의 기니피에 0.5ml~1ml씩 복강내 주사하였다. 이 기니피는 매일 직장체온 및 체중을 관찰하여 병변이 있는 개체의 심장으로부터 혈액을 채취하여 환자혈액과 같은 방법으로 배지에 접종하였다.

들쥐 등 야생동물에서의 렙토스피라균 분리를 위해서는 경기도 파주농촌지역 및 제주지역을 대상으로 하여 1985년 9월에서 10월 사이에 들쥐(등줄쥐, 비단털쥐) 및 따위를 채집하여 산채로 실험실로 운송한 후 부검하여 그 신장조직을 취해 PBS(pH 7.4)를 1:10 되게 첨가한 후 마쇄하여 혈액검체와 같은 방법으로 배양하였다.

배지에 접종한 가검물은 1주에서 3개월까지 30°C에서 배양하며 균 발육을 관찰하였으며, 발육된 균은 암시야장치현미경(×400)으로 전형적인 렙토스피라균의 형태와 운동성을 확인하였다.

2. 생화학적 특성

1) 참조균주

분리균주의 모든 생화학적 특성시험에는 대조로 *Leptospira interrogans serovar copenhageni, mwgolo, icterohemorrhagiae, pyrogenes, canicola, ballum, hardjo, naam*, 1984년 분리균주인 WH-19, KR-4 등 병원성 균주 및 *L. biflexa*에 속한 Patoc 1, Andamana 주를 사용하여 시험하였다.

2) 8-Azaguanine 에 대한 감수성

8-Azaguanine(Sigma)농도가 225 μ g/ml 되게 만든 EMJH broth 5ml에 분리균 및 대조균 배양액(약 2×10^8 org/ml)을 0.2ml씩 접종하여 증식정도를 육안 및 암시야 장치 현미경으로 2주간 관찰하였고, 모든 균주는 대조시험으로 8-Azaguanine을 넣지 않은 EMJH배지에도 동량접종하였다.

3) Oxidase 시험

시험관에 7일 배양된 원액(약 2×10^8 org/ml)을 1ml씩 넣고 당일 조제한 1% p-aminodimethylaniline oxalate 용액을 25 μ l 씩 첨가한 후 빛을 쬐이면서 실온에 방치하여 45분 후에 연한 적갈색(병원성) 및 진한 갈색(비병원성)으로의 변화를 관찰하였다.

4) Catalase-Peroxidase 시험

Pine⁷⁾ 등에 의해 고안된 Whole-Cell peroxidase-catalase 시험방법에 의해 실시하였다.

5) 구형세포로의 전환

균 배양액을 5,000rpm으로 30분간 원심한 후 PBS, pH 7.4로 1회 세척하고 1M NaCl에 부유하여 실온에 2시간 방치한 후, 75% 이상의 균이 구형으로 바뀌는지를 암시야장치 현미경으로 관찰하였다.

6) Colony 형태

분리균들을 적당한 농도로 단계희석한 후 각각 0.1ml씩을 취해 EMJH 평판배지(찬천 1%)에 접종하고 유리봉으로 균일하게 도말하고 밀봉한후 30°C에서 2주이상 배양하여 그 집락형태를 관찰하였다.

3. 실험동물에 대한 병원성

1) 기니피에 대한 병원성 및 LD₅₀

분리균을 0.5ml씩(약 5×10^7 org/ml) 기니피 복강내에 접종한 후 매일 직장체온 및 체중을 측정하여 병변이 있는 개체의 혈액을 배지에 접종하여 균의 재분리를 확인하고, 병변이 있거나 죽은 개체는 부검하여 폐, 간, 신장 등 여러 장기의 병변을 육안으로 관찰하고, 조직표본을 만들어 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

분리균의 LD₅₀측정을 위해서는 건강한 기니피(180~250g) 3수를 1군으로 5개군에 8.9×10^6 org/ml의 균 부유액을 10배수로 희석하여 8.9×10^5 org/ml까지 5단계를 1ml씩 복강내 주사한 후 7일 이내에 치사여부를 관찰하여 50% 치사율을 계산하였다.

2) 마우스에 대한 감염시험

마우스의 혈액 및 각 장기조직내의 렙토스피라균 생존상태를 시험하기 위해 분리균에 감염되어 병변이 있는 기니피로부터 혈액을 취해 건강한 마우스(ICR과 ddy 교잡종) 20수의 복강내에 0.1ml씩 접종한 후, 1주 간격으로 2개월까지 3수씩 부검해 혈액 및 각 장기조직을 배양하고 혈청을 분리해 항체가 측정하였다. 또한 균을 접종한 마우스 한마리를 건강 마우스 10수와 같은 통에 일주일 동안 사육한 후 2개월 후에 나머지 마우스를 모두 부검하여 신장조직을 배양해 렙토스피라균 존재를 확인하였다.

성 적

1. 균 분리

Table 1. Isolation of leptospirae from patients(1985)

Isolate	Date of onset	date of inoculation	Specimen	Isolation procedure	Area of infection
HY-1	Oct. 23	Oct. 25	blood	via Guinea pig	Yo-Ju
HY-2	"	"	"	"	"
HM-3	Oct. 22	Oct. 25	"	"	Yon-Chun
HM-4	Oct. 20	Oct. 22	"	"	Shin-Tan-Jin
HS-5	Sep. 7	Sep. 10	CSF	direct culture	Hong-Chun
HS-6	Oct. 11	Oct. 14	CSF	"	Nam-Yang-Ju
HS-7	?	Oct. 27	blood, CSF	"	Gong-Ju
HV-8	Oct. 24	Oct. 29	blood	"	Wha-Sung
HY-10	Nov. 5	Nov. 7	blood	via Guinea pig	Yo-Ju
310-9	?	Oct. 9	blood	direct culture	Chung-Won
310-19	?	Oct. 14	blood	"	"

Table 2. Isolation of leptospirae from wild animals in Pa-Ju

Species	No. of examined	No. of isolates	Isolation rate(%)
<i>Apodemus agrarius</i>	86	22	25.6
<i>Cricetulus tritonnestor</i>	5	1	20
<i>Crocidura lasiura</i>	13	1	7.7
Total	104	24	23.1

사람에게서는 모두 11주의 원인균이 분리되었으며 그 분포는 Table 1과 같다. 지역별로는 경기도 여주지방에서 3주(여주부속 고대병원 2주, 여주 김정형외과 1주), 충북 청원지방에서 2주(청주 병원)가 분리되었으며, 기타 경기도 남양주, 연천, 화성군, 강원도 홍천, 충남 공주, 신탄진에서 1주씩 분리되었다. 분리시기로는 9월 및 11월의 1주씩을 제외하고는 모두 10월중이었으며 모두 발병 5일 이내, 항체가 검출되기 이전에 취한 혈액 및 뇌척수액검체를 직접 배지에 배양하거나 기니피에 접종하여 분리되었고, 배지에서 직접 배양된 경우는 접종 2~10주후에, 기니피의 경우엔 접종 4~10일 후 채혈하여 배지에 배양해 4~7일만에 분리하였다.

경기도 파주 농촌지역에서는 모두 104수의 들쥐 및 따쥐를 채집하여 등줄쥐에서 22주 비단털쥐에서 1주, 따쥐에서 1주의 렙토스피라균을 각각 분리하였다(Table 2).

또한 아직 렙토스피라증 환자 발생보고가 없었던 제주도지역에서의 렙토스피라균 분포를 파악하기 위해 1985년 10월에 등줄쥐 9수, 집쥐(*R. rattus*) 4수 등을 채집하여 같은 방법으로 균 분리를 시도하였으나 전혀 분리되지 않았다.

2. 분리균의 생물학적 특성

1) 형태학적 특성

분리주들은 암시아장치 현미경으로 *Leptospira* 균 특유의 운동성 및 형태를 확인할 수 있었으며 양끝에 hook을 가지고 있었고 그 길이는 약 6 μ m로 실험실 계대보존 균주들보다 짧고 가늘었으나 여러대 계대하는 동안 이들과 크기가 유사하여졌다.

2) Colony 형태

분리주들은 1% Agar가 첨가된 EMJH 평판배지에 배양하였을 때 1~2주 사이에 직경 1~3mm로 hazy margin을 가진 투명한 colony를 형성하였으며 round margin의 smooth colony도 낮은 빈도로 섞여 있었으나, *L. biflexa* Patoc 1주 및 이미 병원성을 잃어버린 *L. interrogans* serovar *copenhageni* M-20주는 대부분 smooth colony만을 형성하였다.

3) 생화학적 특성

분리주들은 모두 8-Azaguanine 225 μ g/ml에 의해 생장이 저지되었고 1M NaCl에 의해 구형세포로 변형되었으나 Patoc 1주는 반대결과로 나타났다. 또한 분리주들은 모두 catalase를 지니고 있었고 peroxidase, oxidase도 양성이었다.

4) 배양 특성

분리주들은 13 $^{\circ}$ C 이하에서는 배양되지 않았으며, 분리후 초기 계대배양이 매우 어려워 거의 2주 이상 걸렸으며 stationary phase에서의 균 수도 10⁷ org/ml 미만이었으나 계대수가 늘어날 수록 배지에 적응되어 5대 이상 계대배양에서는 2~3일내에 왕

Table 3. Biological characteristics of isolates

Characteristics	All 35 fresh isolates	Patoc 1	<i>L. copenhageni</i> (avirulent)	WH-19 (avirulent)
Pathogenicity in G.P.	+	-	-	-
LD ₅₀ in G.P.	*8.9×10 ⁴	NT	NT	>10 ⁸
Growth at 13°C	-	+	-	-
Inhibition of growth by 8-Azaguanine	+	-	+	+
Colonial morphology (majority)	hazy margin	Smooth	Smooth	Smooth
Motility	+	+	+	+
Catalase	+	-	-	-
Peroxidase	+	+	+	+
Oxidase	pale pink	dark brown	pale pink	pale pink

* : Tested by HM4-3rd subculture in EMJH broth

Table 4. Infectivity of leptospirae in mouse

Route of infection	Tests	Specimen	Reactions after infection				
			1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks	8 weeks
i.p. injection of infected G.P. blood	Culture	blood	+	-	-	-	-
		kidney	+	+	+	+	+
		lung	+	-	-	-	-
	Antibody detection	serum	-	+	-	-	-
		Pathogenicity	+	-	-	-	-
		Mortality (%)	0	0	0	0	0
bled with a infected mouse	Culture	Kidney	NT	NT	NT	NT	+

NT : Not Tested

성하게 분열하는 bleeding nest가 관찰되었고 4 일 만에 균 농도 10⁸ org/ml 이상으로 증균되었다. 또한 초기배양에서는 가토혈청이 첨가된 Fletcher's semisolid 보다 tween 80와 bovine serum albumin 이 첨가된 EMJH 배지에서 더 잘 배양되었다.

5) 기니피크에 대한 병원성 및 LD₅₀

분리균중 사람에서의 분리균 11주, 들쥐 분리균 10주(AP 6, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 23, 24)를 기니피크에 접종하여 병변유발정도를 관찰한 결과 일부 분리주(HY 1, HY 2, HM 3, HS 5, AP 6, AP 12, AP 20)에서 균 접종 4~5일 후부터 기니피크 귀, 발, 부검시 복벽및 전체장기에서 심한 황달증세를 관찰할 수 있었다. 기타 소견은 모든 분리균이 유사하여 복벽, 폐의 심한 출혈과 신장의 전반적인 팽대를 육안으로 관찰할 수 있었고 조직표본의 병리학 적 소견도 균주간의 차이를 볼 수 없었으며, 1984년 분리주₁₁와 동일한 렙토스피라증 특유의 변화를

관찰할 수 있었다.

LD₅₀는 분리후 2번 계대된 HM 4주를 EMJH 배지에 배양하여 측정하였을 때 8.9×10⁴으로 나타났으며 참고로 1984년에 분리되어 10대이상 계대된 WH-19주는 10⁸이상으로 나타났다.

3. 마우스에 대한 감염

분리주 HM 3에 감염된 기니피크 혈액을 10~18g 마우스 복강내에 0.1ml씩 주사하여 감염및 보균상태를 시험한 결과는 (Table 6)과 같다. 실험에 사용한 마우스들은 균접종에 의해 1수도 죽지않았으나 주사 1주후에 chloroform으로 마취하여 부검한 경우 복벽의 황달이 뚜렷하였으나 기니피크에서와 같은 출혈은 관찰되지 않았다. 그러나 접종 2주후의 부검부터는 전혀 병변의 없었으며 이때 일시적으로 항체가 검출되었으나 그 후부터는 다시 역가가 떨어졌다. 또한 병변이 있었던 경우(1주후)는 혈액

에서도 균이 분리되었으나 그 후부터는 신장에서만 가능하였으며 감염 2개월 후에도 7수중 4수의 신장에서 균이 분리되었다. 또한 렘토스피라균을 접종한 마우스 1수를 건강한 마우스 10수와 같은통에 사육한 경우에도 2개월후 건강 마우스 중 50% 이상의 신장에서 균이 분리되어 렘토스피라균의 수평감염력이 확인되었다.

고 찰

렘토스피라균은 1917년 Noguchi에 의해 들쥐로부터 처음 분리되었으며 직경 $0.1\mu\text{m}$, 길이 $6\sim 12\mu\text{m}$ 의 나선균으로 axial filament가 존재해 운동성이 활발하며 산소를 최종 electron acceptor로 하는 호기성세균으로 oxidase, catalase 및 peroxidase-positive로 알려져 있다. 현재 Leptospira genus에는 *L. interrogans*와 *L. biflexa*의 두 species가 존재하는데 그 중 병원성이 있는 *L. interrogans*는 *L. biflexa*와는 달리 13°C 이하에서는 자라지 못하며 15개 탄소분자 이상의 long-chain fatty acid를 energy 및 탄소원으로 이용하여 성장한다. 현재 렘토스피라균의 동정에는 serotype이 그 기본이 되고 있으며 기타 생화학적 특성이 그 특징을 분석하는데 이용되는데 이는 2,6-diaminopurine, 8-Azaguanine, copper sulfate 및 sodium hydrogen carbonate에 대한 감수성, lipase 활성, oxidase의 상대적 활성, 조직배양시 cytopathic effect 등이 있다.

1984년 조¹⁾ 등에 의해 강원도 원주, 홍천지역 환자로부터 렘토스피라균이 분리된 이래 본 실험에서는 홍천지역을 비롯해 경기도 화성, 연천, 여주, 남양주, 충북 청원, 충남 공주, 신탄진동 비교적 광범위한 지역환자로부터 원인균을 분리할 수 있었고 전라남북도와 경상도 지역에서도 혈청학적으로 진단된 환자는 많았으나 지리적 여건으로 균 분리에는 성공하지 못하였다. 환자로부터의 균 분리에는 검체 채취시기가 매우 중요하여 발병 3일 이내, 항생제 투여전의 경우 그 분리율이 높았으며 기니픽 접종에 의해서만 균이 분리되는 경우도 많았다.

파주지역 농촌에서 채집된 동줄쥐 (*Apodemus agrarius*), 비단털쥐 (*Cricetulus tritonnestor*) 및 따쥐 (*Crocodyrus lasiura*)로부터의 균분리율은 각각 25.6%, 20%, 7.7%로 평균 23.1%의 균 분리율을 나타내어 이 지역을 비롯한 우리나라 농촌지역에서의 전염원이 되는 동물의 균보유율이 상당히 높음을 확인할 수 있었다. 제주지역에서는 총 13수의 설치류 중 한수도 발견하지 못하였으나 이 지역에서의 렘토스피라균 존재여부를 증명하기 위해서는 보다 광

범위한 조사가 요구된다.

병원성인 *L. interrogans*를 비병원성인 *L. biflexa*로부터 구별하는데에는 현재 기니픽등 실험동물에 대한 병원성, 13°C 에서의 성장, 8-Azaguanine에 대한 감수성등 몇가지 특성이 그 기준이 되는데 분리균 35주는 모두 그 범주에 속하였다. 또한 이들은 사람 및 동물로부터 분리당시에는 실험동물에 대한 병원성이 매우 강한 반면 인공배지로의 계대배양이 매우 까다로웠고 대략 5대이상 계대되면 adaptation되어 4~5일만에 stationary phase에 이르렀다. 그러나 이렇게 여러번 인공배지에 계대된 균주들은 점차 실험동물에 대한 병원성을 상실하여 분리당시와는 달리 기니픽을 이용한 pathogenicity 증명이 어려웠다. Fuzi 등은 이러한 점을 보완하기 위해 oxidase test를 이용해 parasitic leptospira를 saprophytic leptospira와 구별하였는데, 본 실험에서도 *L. biflexa*에 속한 참조균주 Patoc1 및 Andamana는 oxidase 시약에 의해 진한 갈색으로 변한 반면 분리주 및 기타 parasitic leptospira 참조균주들은 모두 연한 분홍색으로 나타나 그 구별이 용이하였다.

평판배지에서의 colony 형태도 그 병독성과 관계되리라 생각되는데²⁾ 본 분리주들도 분리초기에는 형성되는 colony의 대부분(90%)이 hazy margin을 가진데 비해 계대수가 늘어 나면 smooth colony의 빈도가 높아지었다.

분리주들의 기니픽 접종시 병리조직학적 소견은 전형적인 렘토스피라 감염증을 확인할 수 있었으며 특히 일부 균 접종후 4~5일 이내에 황달증세가 관찰되었는데, 이들 황달을 유발한 균주가 분리된 환자에서는 같은 증세가 나타나지 않았던 점을 고려해 볼때 이의 원인, 균주 및 균 접종량과의 관계를 보다 체계적으로 검토할 필요가 있을 것이다.

분리균들을 그 virulency를 원래상태로 유지시키며 보유하는것은 그 pathogenicity 기작 연구뿐 아니라 백신 개발시 공격용 균주로도 매우 중요하다. 이들은 앞서 말한바와 같이 인공배지에서 배양시 급격히 그 virulency를 잃게 된다. 따라서 병원성 유지를 위해서는 기니픽계대를 유지하는 것이 바람직하나, 기니픽은 병원성이 높은 분리균에 의해 4~7일 이내에 치사되므로 영구적으로 기니픽 계대를 유지하는데에는 많은 노력이 따라야 할 것이다. 이에 본 실험에서 마우스 계대를 시도해 균 접종후 2개월후에도 그 신장에서 원인균을 순수분리할 수 있었으며 균주의 병원성유지를 위해서는 마우스 계대법도 유용하리라 생각된다.

임상적 특성이 매우 다양한 렘토스피라증은 아직

그 병원성기작이 충분히 밝혀지지 않았으며 특히 우리나라의 경우 폐출혈 증세가 높은 빈도가 나타나는 등 특징적인면을 지니고 있다. 따라서 본 질환을 연구하는데에는 이들 분리균들의 혈청형 및 생물학적 특성과 약이 매우 중요한 자료가 될 것이며 나아가 이들의 항원성분의 특성과 phospholipase 등 enzyme activity, colony 형태변이를 비롯한 유전적 특성, cytochrome pattern 분석등을 통해 그 virulence factor 를 밝히는 것이 주요과제로 남아 있다.

결 론

우리나라에서의 렙토스피라증에 대한 체계적인 진단 및 예방대책 수립을 위한 기초자료를 마련하고자 1985년 8월에서 12월 사이 환자 및 일부 농촌지역 들쥐로부터 렙토스피라균을 분리하여 그 병원성, 생화학적 특징 등 제반 생물학적 성상을 파악하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 경기, 강원, 충북, 충남지역 11명의 렙토스피라증 환자의 혈액 및 뇌척수액으로부터 원인균을 분리하였다.

2. 9월에서 10월 사이 경기도 파주지역에서 채집한 104수의 들쥐 및 따귀 중 23.1%인 24수에서 *Leptospira* 균이 분리되었다.

3. 분리된 35주는 모두 기니픽에서 황달, 폐출혈 등 병원성을 나타내었으며, 사람 분리균 HM 4주의 LD_{50} 는 8.9×10^4 이었다.

4. 분리균주들은 모두 13°C 이하에서는 자라지 않았고, 8-Azaguanine에 감수성이 있었으며 1M NaCl에서 구형으로 전환되는 등 *L. interrogans*의 특징에 부합하였으며 catalase, peroxidase, oxidase가 존재하였고 1% Agar의 평판배지에서 hazy margin을 가진 투명한 colony가 형성되었다.

5. 분리균의 병원성 보존을 위해서는 마우스 계

대법이 효과적이었다.

참고문헌

- 1) 조민기·백승복·오희복·송 철: 한국에서 유행한 *Leptospirosis*의 세균학적 연구, 한국역학회지 **6**:16-35, 1984.
- 2) 최강원: 출혈성 임상적 특성, 한국역학회지 **6**:3-7, 1984.
- 3) Abdussalam M. et al: Research needs in *Leptospirosis* Bull. WHO. **47**:113-122, 1972.
- 4) Baseman J.B. and Cox C.D.: Terminal electron transport in *Leptospira*. *J. Bact.* **97**:1001-1004, 1969.
- 5) Faine S.: Guidelines for the control of *Leptospirosis*, WHO., 1982.
- 6) Fuzi M. and Csoka R.: Rapid Method for the differentiation of Parasitic and saprophytic leptospirae. *J. Bact.* **11**:1008, 1961.
- 7) Pine L. et al: Whole-cell Peroxidase Test for identification of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **19**:286-290, 1984.
- 8) Plascencio W.Y.R., Yanagawa and K. Ueno: *Zbl. Bakt. Hgg., I. Abt. Orin. A* **251**:230-236., 1981.
- 9) Starr M.P. et. al(ed): The prokaryotes, chap. 51 The Genus *Leptospira*, **582**:291, 1981.
- 10) Sulzer C.R. and Jones W.L.: *Leptospirosis, Methods in laboratory diagnosis. HEW. Publ. No. (CDC) 76-8275*, 1980.
- 11) Tonsil B. (ed): *Bergey's manual of systematic bacteriology. William and Wilkins, Baltimore*, 62-70, 1984.