

효소면역측정법에 의한 렙토스피라증 진단의 검토*

서울대학교 의과대학 미생물학교실, 암연구소, 내과학교실¹ 및 국립보건원 미생물부²

박경희 · 장우현 · 이정삼¹ · 최강원¹ · 박경석² · 오희복²

=Abstract=

Diagnosis of Leptospirosis by Enzyme-liked Immunosorbent Assay

Kyung-Hee Park, Woo-Hyun Chang, Jung-Sang Lee¹, Kang-Won Choi¹

Kyung-Suck Park², and Hee-Bok Oh²

Department of Microbiology, Internal Medicine¹, and Cancer Research Institute, College of Medicine, Seoul National University, and Division of Microbiology, National Institute of Health²

To apply ELISA to serodiagnosis of leptospirosis with killed whole cells from *Leptospira interrogans* serovars *mwogolo* (Mwogolo), *copenhageni* (M-20), WH-20, *autumnalis* (Akiyami A), *cynopteri* (3522 C), *australis* (Bacillico) and *Leptospira biflexa* serovar *patoc* (Patoc 1), sensitivity and specificity was evaluated.

The reactivity of IgM and IgG antibody in the sera from patients with leptospirosis, hemorrhagic fever with renal syndrome and other febrile disease and normal healthy control to the killed whole cells was analysed.

The results were summarized as follows.

1. The reactivity (absorbance at 492nm) of IgM and IgG to *L. mwogolo* antigen in the sera of patients with leptospirosis were 1.414 ± 0.370 , 1.242 ± 9.554 respectively; hemorrhagic fever with renal syndrome, 0.329 ± 0.131 , 0.239 ± 0.126 ; other febrile disease, 0.196 ± 0.071 , 0.355 ± 0.141 ; normal healthy control, 0.136 ± 0.016 , 0.208 ± 0.077 .
2. The reactivity of IgM and IgG to *L. copenhageni*, WH-20, *L. autumnalis*, *L. cynopteri* and *L. australis* antigens were similar to that to *L. mwogolo* antigen, but that to *L. biflexa* antigen was not discriminated among above disease.
3. Correlation coefficient between the MAT titer and ELISA OD (IgM) to the above antigens was in the range of 0.071-0.518.
4. As absorbance above 0.60 was determined positive for the diagnosis of leptospirosis, the sensitivity and specificity of IgG was 25-89% and 91-96% respectively. And those of IgM was 98-100% and 89-100% except *L. biflexa* (29%) respectively.

Key Words: Leptospirosis, serodiagnosis, ELISA.

서 론

렙토스피라증은 *Leptospira interrogans*에 의한 급성 전신성 질환으로 쥐, 개, 소, 돼지, 말과 기타 가축에 많이 감염되고 있으나^{7, 16, 22, 23} 사람에서 발생된 것은 1886년 Weil에 의해서 처음 보고되었다¹⁰.

*본 연구는 1985년도 서울대학교 의과대학 기초 의학 진흥연구조성비 및 기초 의학 조교 연구비로 이루어졌음.

*Leptospira*는 180여 serovar로 구성되고 있으며 주 공유 응집원을 중심으로 18개의 혈청군으로 나뉘어지고 있다²⁰.

렙토스피라증은 우리나라에서도, 오래전부터 존재하고 있었을 것으로 추정되어 왔지만, 1984년 이동²⁰과 조동²¹이 일부 농촌지역에서 출혈성패염양 질환으로 보고된 환자에서 *Leptospira*균을 분리동정함으로써 우리나라에도 렙토스피라증이 발생함이 확인되었다.

다른 감염성 질환에서와 마찬가지로 환자검체

에서 원인균을 분리 동정하는 것이 확진하는 최선의 방법이나 원인균을 분리 동정하는 데는 장기간이 소요되기 때문에 주로 환자 혈청내 항체를 증명하는 검사가 이용되고 있다.

Galton 등¹⁾과 Cole 등²⁾에 의해 제시된 현미경 응집검사(microscopic agglutination test, MAT)는 렙토스피라증에 대해 가장 보편적으로 쓰이고 있는 혈청학적 진단 검사방법이다^{3), 4), 5)}, 그러나 이 검사는 매번 여러 *Leptospira* 균의 생균배양이 필요하고, 또한 매번 생균배양시 따르는 검사자에 대한 감염 위험성 및 결과 판독시의 주관성을 배제하지 못한 단점이 있다.

그밖에, 혈구응집검사^{6), 7)} 보체결합검사⁸⁾, 혈구 용해검사^{9), 10)} 등이 실시되어오고 있다. 그러나 이런 검사법들 보다 더 민감하고 생균양원을 필요치 않으며 많은 환자를 동시에 검진할 수 있는 방법으로 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 여러 연구자에 의해 유용하다고 보고되고 있다^{11), 12), 13), 14)}. 그러므로 본 연구에서는 한국에서 분리한 *Leptospira*를 항원으로하여 환자혈청에서 IgG 혹은 IgM 항체가 어떤 진단적 의의가 있는가를 평가하기 위하여 육안응집반응으로 확인된 렙토스피라증 환자혈청과 유사질병환자혈청을 대상으로 ELISA를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 항원의 제작

국립보건원에서 분리한 *L. interrogans* (WH-20)¹⁵⁾와 미국 CDC(center for disease control)에서 분양받은 *L. interrogans* serovar *mwoglo* (Mwogolo) (1984년 도 우리나라 쥐에서 분리한 것임) 및 *copenhageni* (M-20)와 *autumnalis* (Akiyami A), *cynopteri* (3522C) *australis* (Ballico) 그밖에 *L. biflexa* serovar *patoc* (Patoc 1)을 균체항원으로 사용하였다. 균체항원은 각각의 균종을 EMJH배지에 식균하고 30°C에서 5일간 배양한 후 10mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3회 원심, 세척한 후 0.3% formalinized saline으로 균 부유액을 만들었다.

항원 부착시에 1ml에 6×10^8 , 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 cell로 균 부유액을 만들어 균체항원으로 사용하였다. 균수는 포르말린으로 고정된 인형적혈구수와 균수를 비교하여 측정하는 비교계수법을 사용하여 측정하였다.

2. 대상 혈청

국립보건원에서 육안응집검사로 렙토스피라증으

로 진단받은 29명의 환자혈청과, 서울대학교병원에서 신증후군 출혈열로 진단된 환자 10명 및 장티푸스를 비롯한 그밖의 열성질환환자 18명의 혈청을 사용하였다. 정상대조군으로는 건강한 서울대학교 의과대학생 15명의 혈청을 사용하였다.

3. 효소면역측정법 (ELISA)

1). 항원부착

장티푸스균체 부착법¹⁶⁾에 따라 polyvinylchloride (PVC) plate (Titertek® EIA plate)에 well 당 50μl씩 poly-L-lysine(100μg/ml PBS)을 분주하고, 실온에서 1시간 정치후 제거하였다. PBS로 희석한 각균량의 균체항원을 각 well에 50μl씩 분주하고 1,500×g (Beckmann TJ-6 centrifuge)로 20분간 원심침전하였다. PBS에 녹인 0.5% glutaraldehyde를 각 well에 50μl씩 분주하고 15분간 실온에서 반응시켰다. PBS로 2회 세척하고 100 mM glycine과 0.1% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 RPMI 1640 용액을 각 well에 100μl씩 분주하고 실온에서 30분간 방치하여 glutaraldehyde를 차단하였다. PBS로 2회 세척하고 비특이적으로 부착되는 것을 막기 위해 3% BSA가 포함된 PBS-Tween 20으로 37°C에서 2시간동안 남은 공간을 피복시켰다.

2). 최적부착 항원의 양 결정

1ml에 6×10^8 , 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 으로 조정된 WH-20 균체 항원을 PVC plate에 부착시킨 후, 양성혈청으로 가토항 *Leptospira* WH-20 혈청과 음성대조 혈청으로 정상가토혈청을 1:100부터 10배씩 계단희석하여 well 당 50μl씩 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 1:4000으로 희석한 peroxidase conjugated goat antirabbit Ig(G+M+A) (Cappel Lab, Lot NO. 14216)을 well 당 50μl씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS-Tween 20으로 5회 세척하였다. 그 후 10ml의 phosphate citrate buffer (pH 5.0)에 4mg의 o-phenylenediamine을 완전히 녹인후 20μl의 20% H₂O₂를 넣은 기질용액을 만들어 well 당 50μl씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켜 흡착된 peroxidase의 양에 따른 발색반응을 일으켰다. 그후 2M H₂SO₄을 well 당 50μl씩 첨가하여 반응을 정지시키고, 발색정도를 ELISA reader (Titertek®)을 이용하여 492nm에서 흡광도(optical density)로 측정하였다. 그 결과 양성과 음성반응을 구별하는데 6×10^7 cell/ml이 가장 적합하였다.

3). 검체의 최적 혈청농도의 결정

Table 1. The reactivity of IgG antibody to the killed whole cell antigen, *L. mwogolo*, *L. copenhageni*, WH-20, *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis* and *L. biflexa* in the sera of patients with leptospirosis, hemorrhagic fever with renal syndrome and other febrile disease and normal healthy control by the absorbance at 492 nm in the ELISA

Antigen	Leptospirosis(29) ^b	HFR ^a (10)	Other febrile disease(18)	Normal healthy control(15)
<i>L. mwogolo</i>	1.242±0.554 ^c	0.297±0.126	0.355±0.141	0.208±0.077
<i>L. copenhageni</i>	1.087±0.529	0.382±0.135	0.392±0.145	0.326±0.096
WH-20	1.070±0.515	0.310±0.121	0.388±0.146	0.249±0.086
<i>L. autumnalis</i>	1.047±0.540	0.288±0.081	0.311±0.135	0.231±0.063
<i>L. cynopteri</i>	0.978±0.514	0.350±0.089	0.452±0.164	0.314±0.101
<i>L. australis</i>	0.755±0.484	0.340±0.065	0.420±0.094	0.267±0.082
<i>L. biflexa</i>	0.475±0.196	0.303±0.103	0.367±0.143	0.257±0.075

Table 2. The reactivity of IgM antibody to the killed whole cell antigen, *L. mwogolo*, *L. copenhageni*, WH-20, *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis* and *L. biflexa* in the sera of patients with leptospirosis, hemorrhagic fever with renal syndrome and other febrile disease and normal healthy control by the absorbance at 492 nm in the ELISA

Antigen	Leptospirosis(29) ^b	HFR ^a (10)	Other febrile disease(18)	Normal healthy control(15)
<i>L. mwogolo</i>	1.414±0.370 ^c	0.329±0.131	0.196±0.071	0.136±0.016
<i>L. copenhageni</i>	1.274±0.404	0.387±0.150	0.215±0.077	0.182±0.031
WH-20	1.318±0.362	0.284±0.123	0.247±0.079	0.123±0.024
<i>L. autumnalis</i>	1.210±0.344	0.229±0.085	0.164±0.048	0.165±0.030
<i>L. cynopteri</i>	1.198±0.432	0.328±0.107	0.254±0.075	0.173±0.043
<i>L. australis</i>	0.921±0.372	0.332±0.099	0.246±0.070	0.211±0.044
<i>L. biflexa</i>	0.484±0.165	0.361±0.128	0.230±0.077	0.195±0.025

a : hemorrhagic fever with renal syndrome

b : Number of subject

c : mean ± standard deviation (absorbance at 492 nm)

6×10⁷ cell/ml로 각각의 항원을 부착시킨후 2명의 렙토스피라증 환자와 1명의 정상대조군 혈청을 1:100부터 계단희석하여 실온에서 반응시켰다. PBS-Tween 20으로 3회 세척한 후 peroxidase conjugated goat antihuman IgG 및 IgM (Cappel Lab. Lot No. 14468, 18283)을 각각 1:2000, 1:4000으로 희석하여 사용하였다. 그 결과 혈청의 희석은 각각의 항원에 대해서 IgG 및 IgM 항체가 공통적으로 양성대조에서는 높은 값을 나타내고, 음성대조와 비교하여 분리도가 좋은 1:400으로 결정했다.

4. 현미경 응집검사(MAT)

Microtiter U-bottom plate에 혈청을 1:25부터 2배씩 계단희석하여 각 well에 50μl씩 넣고 현미경 450× 확대한 시야에서 100~200균수로 조정된 생균부유액을 동량넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 그후 각 well에서 micropipette으로 소량 취하여 slide glass에 놓고 cover glass를 덮은 후 dark field microscope으로 관찰하였다. 75~100% 균괴

를 이룬것을 4+, 약 75%의 균이 응집된 것을 3+, 50% 정도가 응집된 것을 2+, 그리고 25% 정도 응집된 것을 1+로 하고 항체의 종말점은 2+ 반응을 보인 희석배수를 택하였다.

성 적

1. 각 환자군 혈청내 IgG 항체 반응

L. mwogolo 항원에 대한 렙토스피라증 환자 혈청의 IgG 항체가의 평균치는 흠광도로 Table 1에서 표시한 바와 같이 1.242±0.554, 신증후군 출혈열환자에서는 0.297±0.126 다른 열성질환 환자에서는 0.355±0.141, 정상대조군에서는 0.208±0.077이었다.

L. copenhageni 항원에 대해서는, 렙토스피라증 환자에서 1.087±0.529, 신증후군 출혈열환자에서 0.382±0.135 다른 열성질환환자에서 0.392±0.145 정상대조군에서 0.326±0.096이었다.

WH-20 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 1.070±0.515, 신증후군 출혈열환자에서 0.310±

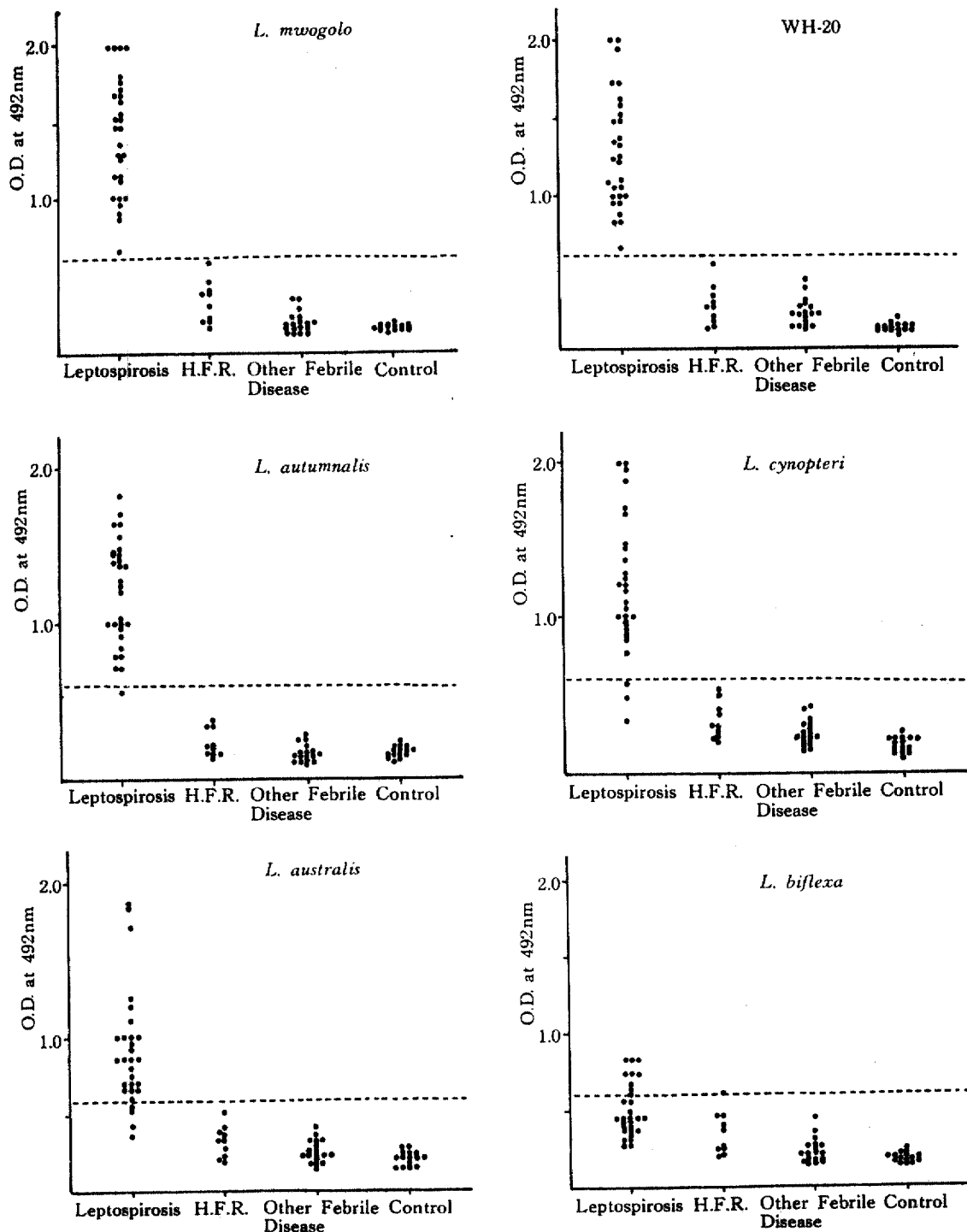


Fig. 1. Distribution of reactivity of IgM antibody to the killed whole cell antigen, *L. mwogolo*, WH-20, *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis* and *L. biflexa* in the sera of patients with leptospirosis, hemorrhagic fever with renal syndrome and other febrile disease and normal healthy control by the absorbance at 492nm in the ELISA. The dotted line shows the cutoff level for the presence of specific IgM by ELISA (0.60).

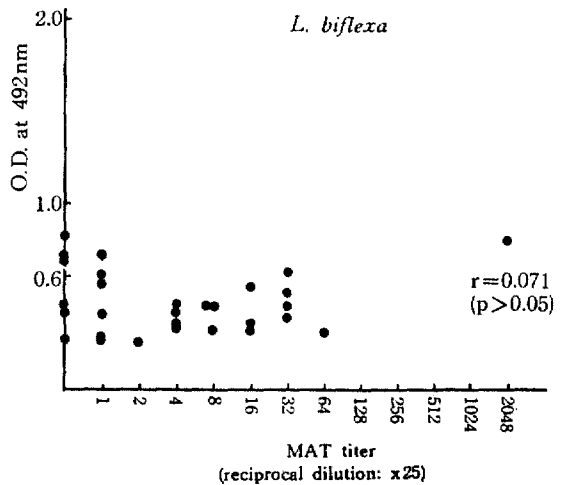
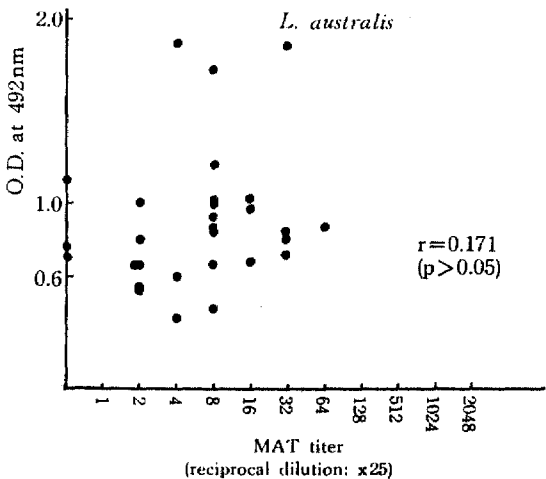
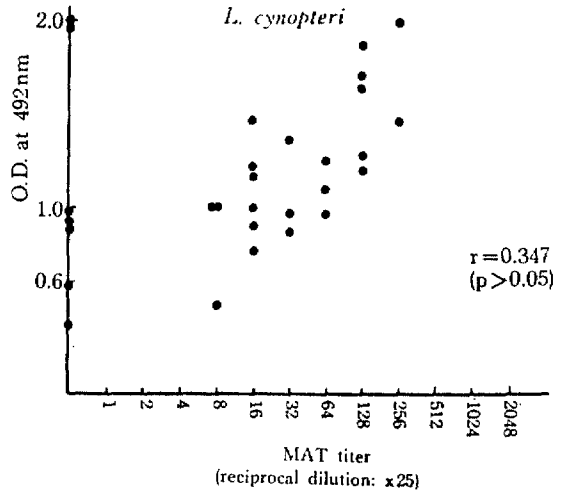
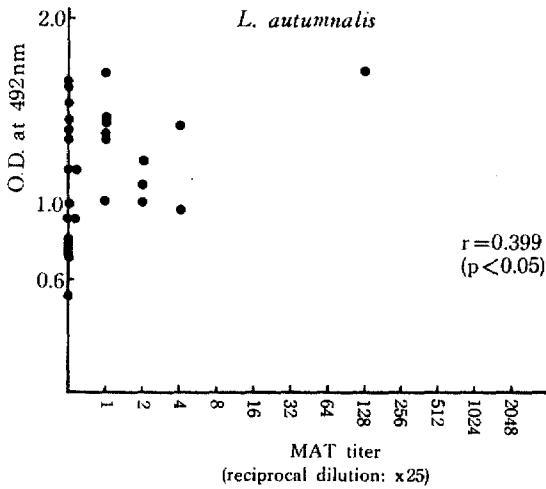
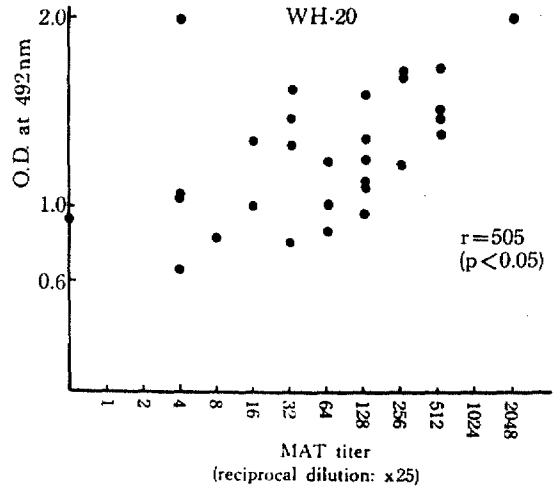
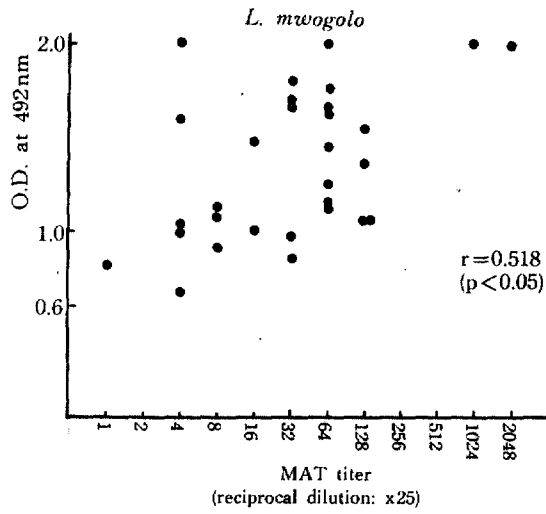


Fig. 2. Comparison between MAT and ELISA(IgM) to *L. mwegolo*, WH-20, *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis* and *L. biflexa* in the sera of patients.

0.121, 다른 열성질환환자에서 0.388 ± 0.146 , 정상대조군에서 0.249 ± 0.086 이었다.

L. autumnalis 항원에 대해서는, 렙토스피라증 환자에서 1.047 ± 0.540 , 신증후군 출혈열환자에서 0.288 ± 0.081 , 다른 열성질환환자에서 0.311 ± 0.135 , 정상대조군에서 0.231 ± 0.063 이었다.

L. cynopteri 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 0.978 ± 0.514 , 신증후군 출혈열환자에서 0.350 ± 0.089 , 다른 열성질환환자에서 0.452 ± 0.164 , 정상대조군에서 0.314 ± 0.101 이었다.

L. australis 항원에 대해서는, 렙토스피라증 환자에서 0.755 ± 0.196 , 신증후군 출혈열환자에서 0.340 ± 0.065 . 다른 열성질환환자에서 0.420 ± 0.094 , 정상대조군에서 0.267 ± 0.082 *L. biflexa* 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 0.475 ± 0.196 , 신증후군 출혈열환자에서 0.303 ± 0.103 , 다른 열성질환환자에서 0.367 ± 0.143 , 정상대조군에서 0.257 ± 0.075 이었다.

2. 각 환자군 혈청내 IgM 항체반응

L. mwogolo 항원에 대한 렙토스피라증 환자혈청의 IgM 항체가의 평균치는 흡광도로 Table 2와 Fig. 1에서 표시한 바와 같이 1.414 ± 0.370 , 신증후군 출혈열환자에서 0.329 ± 0.131 , 다른 열성질환환자에서 0.196 ± 0.071 , 정상대조군에서 0.136 ± 0.016 이었다.

L. copenhageni 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 1.274 ± 0.404 , 신증후군 출혈열환자에서 0.387 ± 0.150 , 다른 열성질환환자에서 0.215 ± 0.077 정상대조군에서 0.182 ± 0.031 이었다.

WH-20 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 1.318 ± 0.362 , 신증후군 출혈열환자에서 0.284 ± 0.123 , 다른 열성질환환자에서 0.247 ± 0.079 , 정상

대조군에서 0.123 ± 0.024 이었다.

L. autumnalis 항원에 대해서는, 렙토스피라증 환자에서 1.210 ± 0.344 , 신증후군 출혈열환자에서 0.229 ± 0.085 다른 열성질환환자에서 0.164 ± 0.048 정상대조군에서 0.165 ± 0.030 이었다.

L. cynopteri 항원에 대해서는, 렙토스피라증 환자에서 1.198 ± 0.432 , 신증후군 출혈열환자에서 0.328 ± 0.107 , 다른 열성질환환자에서 0.254 ± 0.075 정상대조군에서 0.173 ± 0.043 이었다.

L. australis 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 0.921 ± 0.372 , 신증후군 출혈열환자에서 0.332 ± 0.099 , 다른 열성질환환자에서 0.246 ± 0.070 , 정상대조군에서 0.211 ± 0.044 이었다.

L. biflexa 항원에 대해서는 렙토스피라증 환자에서 0.484 ± 0.165 , 신증후군 출혈열환자에서 0.361 ± 0.128 , 다른 열성질환환자에서 0.230 ± 0.077 , 정상대조군에서 0.195 ± 0.025 이었다.

3. 렙토스피라증 환자의 MAT 역가와 ELISA IgM 항체반응의 비교

렙토스피라증 환자의 MAT 역가와 ELISA와 IgM 항체반응을 비교한 결과를 Fig. 2에 표시하였다. 즉 *L. icterohaemorrhagiae* 에 속하는 *L. mwogolo*, WH-20, *L. copenhageni*와 *L. autumnalis* 항원에 대해서는 모든 환자에서 흡광도 0.6 이상을 나타내었으나, *L. cynopteri* 및 *L. australis* 항원에 대해서는 MAT 역가가 1:100 이상인 경우에도 각각 2,3 명의 환자에서 흡광도 0.6미만을 나타내었다. MAT titer와 ELISA 흡광도사이의 상관계수는 *L. mwogolo*에서 0.518, WH-20에서 0.505 *L. copenhageni*에서 0.506 *L. autumnalis*에서 0.399, *L. australis*에서 0.171, *L. cynopteri*에서 0.347 그리고 *L. biflexa*에서 0.071이었다.

Table 3. Comparison of the sensitivity and specificity between IgM and IgG according to the killed whole cell antigen, *L. mwogolo*, WH-20, *L. copenhageni*, *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis* and *L. biflexa* for the diagnosis of leptospirosis by ELISA

	IgM		IgG	
	sensitivity	specificity	sensitivity	specificity
<i>L. mwogolo</i>	100	98	89	93
WH-20	100	98	79	93
<i>L. copenhageni</i>	97	98	75	91
<i>L. autumnalis</i>	97	98	68	96
<i>L. cynopteri</i>	93	100	61	91
<i>L. australis</i>	89	98	50	96
<i>L. biflexa</i>	29	98	25	93

(The absorbance above 0.6 was determined as positive reaction)

4. 렙토스피라증 진단의 유용성

효소면역측정법으로 환자혈청중 IgM 및 IgG 항체측정이 렙토스피라증 진단에 이용될 수 있는가를 알아보기 위하여, *L. mwogolo*, WH-20, *L. copenhageni*, *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis*, *L. biflexa* 각각의 항원에 대한 민감도와 특이도를 비교 검토하였다. 즉 Table 3에서 표시한 바와 같이, 흡광도 0.6 이상을 양성으로 판정하여 렙토스피라증을 진단하였을 경우 민감도와 특이도를 검토하여 보았다. IgM 항체를 검색할 경우 *L. mwogolo* 항원에 대해서는 각각 89%, 93%이고, WH-20 항원에 대해서는 79%, 93%, *L. copenhageni* 항원에 대해서는 75%, 91%, *L. autumnalis* 항원에 대해서는 68%, 96%, *L. cynopteri* 항원에 대해서는 61%, 91%, *L. australis* 항원에 대해서는 50%, 96%, *L. biflexa* 항원에 대해서는 25%, 93%이었다.

IgM 항체를 검색할 경우, *L. mwogolo* 및 WH-20 항원에 대해서는 민감도가 100%, 특이도가 98%였으며 *L. copenhageni* 및 *L. autumnalis* 항원에 대해서는 97%, 98%, *L. cynopteri* 항원에 대해서는 93%, 100%, *L. australis* 항원에 대해서 89%, 98%, *L. biflexa* 항원에 대해서는 29%, 98%을 이었다.

고 찰

지금까지 Galton 등¹⁷⁾ 과 Cole 등¹⁸⁾ 에 의해 가장 보편적이며 표준 검사법으로 알려진 현미경 응집검사(MAT)와 그밖의 혈구응집검사^{19, 20)}, 보체 결합검사²¹⁾, 혈구 용해검사^{14, 15)} 등은 항원 항체 반응으로 렙토스피라증 환자혈청내에서 주로 IgM 항체를 검색할 수 있는 것으로 보고되어 왔다^{22, 23, 24, 25, 26)}.

그러나 근래에 개발된 효소면역 측정법(ELISA)은 미량 존재하는 항체나 항원을 검출하는데 그 민감도나 특이성이 뛰어날 뿐 아니라 혈청내 IgM 항체 및 IgG 항체 등 immunoglobulin class를 구별하여 측정하는 것이 가능하므로 렙토스피라증 및 그밖의 감염성 질환의 진단 및 예후판정에 많이 이용되고 있다.^{6, 9, 11, 12, 13, 16, 21, 26, 27, 28)}

Adler 등⁹⁾ 과 Waltman 등²¹⁾ 은 파쇄된 균체를 항원으로 ELISA를 시행하였으며, Thiermann 등²²⁾ 은 균체를 phenol로 추출한 항원을 이용하여 ELISA를 시행하였다. 그러나 저자는 표준검사방법인 현미경 응집검사(MAT)가 균체의 표면항원에 대한 항체를 검색하는 방법이므로, 균체를 직접 ELISA에 부착시키는 것이 보다 편리하여 타당하다고 사료되

었다.

본 실험에서 사용한 *Leptospira* 균체 항원은 조 등²⁾이 1984년 유행성페염양 질환으로 의심되었던 환자에서 분리동정한 *L. icterohaemorrhagiae* 혈청군에 속하는 WH-20과, CDC에서 분양받은 균주으로써 같은 혈청군에 속하는 *L. mwogolo* 및 *copenhageni* 그밖에 *L. autumnalis*, *L. cynopteri*, *L. australis*와 속(genus) 특이성이 있는 공통항원을 가지고 있는 것으로 알려진 *L. biflexa*^{4, 12, 27)}를 균체항원으로 하여 효소면역측정법을 시행하였다. 특히 렙토스피라증 환자와 우리나라에서 만연되고 있으면서 임상적으로 감별진단이 요구되는 신중후군출혈열 환자²⁸⁾ 및 장티푸스를 포함한 그밖의 유사한 열성 질환 환자를 대상으로 혈청내 IgG 항체반응과 IgM 항체반응을 비교하였다.

비병원성인 *L. biflexa*를 제외한 다른 균체항원에 대해서 렙토스피라증 환자가 유사질환 환자군 및 건강대조군에 비해 IgG, IgM 항체가 모두 증가하였으나, *L. icterohaemorrhagiae* 혈청군에 속하는 균체항원에 더 현저한 반응을 나타내었다. 또한 IgM 항체반응이 IgG 항체반응에 비해 민감도와 특이도가 더 높았다. 즉 균체항원에 따라서 IgG 항체반응을 측정할 때는, 민감도에 있어서 약간씩의 차이를 나타내고 있으며 비특이적인 반응을 다소 보이고 있다. 그러나 IgM 항체반응에서는, *L. biflexa* 항원을 제외한 다른 균체항원에서 민감도가 89% 이상이면서, 특이도에 있어서도 98%~100%를 나타내어, IgG 항체반응을 측정하는 것보다 구별이 잘되었다. 특히 *L. icterohaemorrhagiae* 혈청군에 속하는 *L. mwogolo*, WH-20, *L. copenhageni* 항원에 대해 IgG 나 IgM 항체반응이 다른 균에 비해 분리도가 좋았던 것으로 보아 우리나라에서 발생된 렙토스피라증이 *L. icterhaemorrhagiae* 이어서 환자혈청에 보다 특이하게 반응하는 것이 아닌가 사료되었다.

L. biflexa Patoc 1은, 1958년 Combiescu 등¹⁰⁾에 의해 속(genus) 특이성이 있음이 보고된 이후, Cox 등¹¹⁾에 의해 혈구용해시험 등에 이용되어 왔으며, Palit와 Gulasekharan²³⁾은 혈구응집검사를 시행하여, 렙토스피라증의 검진에 이용될 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서 *L. biflexa*(Patoc 1)은 그 민감도와 특이성이 다른 균체항원에 비해 현저히 떨어지는 것으로 보아 ELISA의 항원으로 부적합하다고 사료되었다.

Fig. 2에서와 같이 MAT 역가와 ELISA 흡광도 사이에는 거의 상관관계가 없었는데 특히 *L. autumnalis*의 경우 대부분의 환자에서 MAT 역가가 1:100이하임에도 ELISA로 흡광도 0.6 이상을 나타내

어, MAT가 혈청형 특이성을 나타내는데 반해 ELISA는 종(species) 특이성과 관련되어 있는 것으로 사료되었다.

그러므로 본 실험의 결과로 보아 *Leptospira* 사균체를 그대로 plate에 부착시킨 ELISA 검사방법으로 환자혈청내에서 IgM을 검색하는 것은 렙토스피라증 환자의 조기 발견 및 진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

렙토스피라증으로 의심되는 환자를 조속하고 정확히 진단하기 위하여 *L. interrogans* serovar *mwogolo* (Mwogolo), WH-20, *copenhageni* (M-20) *autumnalis* (Akiyami A), *cynopteri* (3522 C), *australis* (Ballico)와 *L. biflexa* serovar *patoc* (Patoc 1) 균체항원을 직접 plate에 부착시켜 효소면역 측정법으로 렙토스피라증 환자 및 신증후군 출혈열 환자 그밖의 유사열성질환환자 혈청내 IgG 및 IgM 항체반응을 측정하고 그 민감도와 특이도를 비교검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *L. mwogolo* 항원에 대한 IgM 및 IgG 항체가 렙토스피라증 환자에서 각각 1.414 ± 0.370 , 1.242 ± 0.554 , 신증후군 출혈열 환자에서 0.329 ± 0.131 , 0.297 ± 0.126 , 다른 열성질환환자에서 0.196 ± 0.071 , 0.355 ± 0.141 정상 대조군에서 0.136 ± 0.016 , 0.208 ± 0.077 으로 IgM 항체반응이 더 현저하였다.

2. WH-20과 *L. copenhageni* 및 그밖의 균체항원에 대해서는 위와 유사하였으나, *L. biflexa* 항원에 대해서는 질병군에 따른 차이를 구별할 수 없었다.

3. 렙토스피라증 환자에 대한 현미경응집반응 역가와 효소면역측정법에서 IgM 항체반응(흡광도)의 상관계수는 $0.071 \sim 0.518$ 로 상관관계가 낮았다.

4. 렙토스피라증 진단을 위한 효소면역 측정법에서 흡광도 0.6이상을 양성반응으로 정할수 있었으며 IgG 항체가의 특이도는 전균체항원에 대하여 91~96%였으며 민감도는 *L. biflexa*에 대해서는 25% 그외의 균체항원에 대해서는 50~89%로 다양하였다.

IgM 항체가의 특이도는 전균체항원에 대하여 98~100%였고 민감도는 *L. biflexa* (29%)를 제외한 다른 균체항원에 대하여 89~100%였다.

참 고 문 헌

1) 김윤원, 황용수, 국윤호, 최강원, 차창용, 이승

훈: 효소면역측정법을 위한 장티푸스 균체항원의 부착방법. 대한미생물학회지, 20: 91, 1985.

- 2) 이정상: 한국형출혈열-신증출혈열. 인제의학 6: 23, 1985.
- 3) 조민기, 백승복, 오희복, 송철: 한국에서 유행한 Leptospirosis의 세균학적 연구. 한국역학회지, 6: 16, 1984.
- 4) Adler B and Faine S: The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. Med. Microbiol.* 11: 387, 1978.
- 5) Adler B, Murphy AM, Locarnini SA and Faine S: Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 11: 452, 1980.
- 6) Adler B, Faine S and Gordon LM: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological test for detecting antibodies against *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in sheep. *Aust. Vet. J.* 57: 414, 1981.
- 7) Andreani E, Tolari F and Farina R: Experimental infection in sheep with *Leptospira interrogans* serotype *hardjo*. *Br. Vet. J.* 139: 165.
- 8) Carmago ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti, CK and Nakabara CS: Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect. Immun.* 21: 55, 1978.
- 9) Cole JR, Ellinghausen HC and Rubin HL: Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. *Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc.* 83: 189, 1979.
- 10) Combiescu D, Sturdza N, Sefer M and Radu I: Recherches Sur les leptospiroses. *Arch. Roum Path Ex, Microbiol* 17: 245, 1958.
- 11) Cox CD: Hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with leptospiral extracts, *Proc Soc. Exp. Biol.* 90: 610, 1955.
- 12) Cox CD: Standardization and stabilization of an extract from *Leptospira biflexa* and its use in the hemolytic test for leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 101: 203, 1957.
- 13) Cox DC, Alexander AD and Murphy LC: Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *J. infect. Dis.*

101: 210, 1957.

- 14) Dittmar D, Cleary TJ and Castro A: Immunoglobulin G and M specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dengue antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 498, 1979.
- 15) Engvall E and Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of IgG. *Immunochemistry* **8**: 871, 1971.
- 16) Garland SM, Locarnini SA and Gust ID: A solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibody to rubella virus. *Pathology* **11**: 393, 1979.
- 17) Galton MM, Powers DK, Hall AD and Cornell RG: A rapid microscopic slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *Am. J. Vet. Res.* **19**: 505, 1958.
- 18) Hathaway SC, Little TW and Wkathall AE: Experimental infection of pregnant gilts with leptospires isolated from British Wildlife. *Br. Vet. J.* **39**: 393, 1983.
- 19) Inada Y and Ido T: Isolation of the etiological agent of weill's disease. Tokyo Ijishinshi **1908**: 351, 1915.
- 20) Lee TS, Kim SG, Yun SC, Choe KW, Han Y C, Chil TG and Kim SY: An autopsy case of leptospirosis, in Korea. *J. of Korean Med. Assoc.* **28**: 373, 1985.
- 21) Locarnini SA, Coulepsi AG, Stratton AM, Kaldor J and Gust ID: Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A-specific immunoglobulin M. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 459, 1979.
- 22) Milner AR, Wilks CR, Morgan IR and Rosen NE: *Leptospira* serogroup *hebdomadis* infection as an Australian Zoonosis. *Vet. J.* **56**: 70, 1980.
- 23) Palit A and Gulaskharam J: Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. Clin. Path.* **26**: 7, 1973.
- 24) Pike RM, McBrayer HL, Schulze ML and Chandler CH: Chromatographic analysis and sulfhydryl sensitivity of antileptospira agglutinins in rabbit and human sera. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**: 786, 1965.
- 25) 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.
- 26) Reinhard KR: Parasitological review: Newer knowledge of Leptospirosis in the United States. *Exp. Parasitol.* **2**: 87, 1953.
- 27) Rothstein N and Hiatt CW: Studies of the immunochemistry of leptospires. *J. Immunol.* **77**: 257, 1956.
- 28) Russell CJ and Faine S: Family II. Leptospiraceae, p 62 in Krig RL and Holt JG(ed), Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. vol 1, W and W, Baltimore, 1984.
- 29) Sulzer CR, Glosser JW, Rogers F, Jones WL and Frix M: Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* **2**: 218, 1975.
- 30) Terpstra WJ, Ligthart GS and schoone GJ. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralbl. Bakt. Hyg. Abt. I. Orig.* **247**: 400, 1980.
- 31) Thiermann AB and Garrett LA: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 884, 1983.
- 32) Tong MJ, Rosenberg EB, Votteri BA and Che C T: Immunological response in leptospirosis. Report of three cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20**: 625, 1971.
- 33) Turner LH: Leptospirosis II. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **62**: 880, 1968.
- 34) Urquhart AE, Lee MG, King SD and Terry SI: Human leptospirosis infective serogroups and serotypes in Jamaica. *Int. J. Zoon.* **7**: 44, 1980.
- 35) Waltman WD and Dawe DL: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antileptospiral antibodies in swine sera. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 1120, 1983.