

유행성 출혈형 폐염양 질환의 병원체에 관한 연구

연세대학교 의과대학 미생물학교실

김주덕 · 이태윤 · 이원영 · 이봉기

=Abstract=

Comparative Analysis of *Leptospira* Isolated in Korea and *Leptospira* from ATCC

Joo-Deuk Kim, Tae-Yoon Lee, Won-Young Lee and Bong-Ki Lee

Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Leptospira isolated from the patients with so called epidemic pulmonary hemorrhagic fever were comparatively studied with standard strains obtained from ATCC.

The specific aim of this study was to clarify the morphologic heterogeneity of the isolates, i. e., co-existence of spiral forms in both handness, right and left, rod and spherical forms in their population by comparing them with those of the ATCC strains.

No differences between our strains and ATCC strains were noticed in their growth characteristics, responses to the culture media, temperature, antibiotics and antifungal agents.

Furthermore, the morphologic heterogeneity had been repeatedly observed even in cultures of standard ATCC strains, which had been noticed in the cultures of bacteria isolated in this laboratory. The serologic analysis of our isolates demonstrated that the bacteria reacted with *L. icterohaemorrhagiae* and *L. australis* regardless their differences in time of isolation(1984, 1985).

Thus, it was concluded that the spiral bacteria isolated in this laboratory are *Leptospira* of a new serovar which still remained to be determined.

And the previous reports on the morphology of the *Leptospira*, which described that the *Leptospira* population has only spiral forms with right-handed coils might be reconsidered.

Key Words: *Leptospira*, morphologic heterogeneity, serologic relatedness.

서 론

Leptospirosis는 1886년 이후 Weil씨병, 출혈성 황달, 출혈성 간염, Spirocheta 병 등으로 알려져 처음에는 황달을 나타내는 질병들 중의 하나로서 분류되었다. 그 후 Inada 등¹⁾과 Hübener 및 Reiter 등²⁾이 각각 일본과 독일에서 독립적으로 그 원인 균체를 분리하였으며, *Spirocheta icterohaemorrhagiae*로 명명되었다. 이 균의 중요한 숙주로서는 rat가 보고되었으며, Noguchi 등에 의해 *Leptospira* 속

*본 연구는 1985년도 삼미문화재단 연구비로 이루어졌음. 본 내용의 일부는 제56차 대한 미생물학회 추계 학술대회(1985) 및 제 57차 대한미생물학회 춘계 학술대회(1986)에서 발표된 바 있음.

으로 분류되었다.

Leptospirosis는 전 세계에 걸쳐 가축 혹은 야생 동물들(opossums, skunks, racoons, foxes, rats, 및 dogs)을 숙주로 하며 보균상태의 이들 동물이 배설하는 뇨 중에 *Leptospira*가 배설되어 자연환경을 오염시키며 오염된 물, 흙, 및 채소등에 직접 혹은 간접적으로 접촉함으로써 인체감염이 유발되는 것으로 보고있다. 사람에게 있어서의 주된 침입구(portal of entry)는 손상된 피부(특히 발 근처), 노출된 결막, 비강 혹은 구강의 점막등으로 알려져 있다³⁾.

Leptospirosis는 임상적으로 패혈증기(septicemic phase) 및 면역기(immune phase)로 분류되며, 전기에는 혈액 및 뇌척수액, 후기에는 뇨중에서 *Leptospira*의 분리가 가능하다. 환자의 주된 임상증상으로는 두통, 발열, 근육통, 오한등의 증상으로부터

황달, 뇌막염, 포도막염에 이르기까지 다양한 것으로 되어있다²⁾.

조직병리학적 소견으로서 거의 모든 장기에서의 출혈이 특징적이며 간장의 손상은 이 질환의 전형적인 병리소견으로서, 여기에는 간 평판의 해체, 다핵거대 간세포의 출현, 간세포의 단일 혹은 집단적 괴사, Kupffer cell의 과다증식 등이 포함된다. 신장의 손상은 주로 세뇨관 손상이며, 말기에는 세뇨관 상피의 괴사와 기저막의 이상으로 인한 간질성 신염을 보이게 된다. 폐에서는 주로 폐 조직의 괴사, 출혈 및 간질성 부종등이 관찰되며, 이와 같은 소견은 거의 모든 장기에서 나타날 가능성이 있는 것으로 보고되어 있다³⁾.

1984년 우리나라에서 경기, 강원, 충북지방을 중심으로 산발적으로 농부들에게서 발생되었던 유행성 출혈형 폐염양 질환은 상기와 유사한 역학적, 임상적 및 병리적 소견을 나타내었으며, 본 교실에서 그 원인균으로 *Leptospira*를 분리함으로써 유행성 출혈형 폐염양 질환은 *Leptospira*에 의한 leptospirosis로 보고한 바 있다⁴⁾. 이들 본 교실에서 분리한 *Leptospira*균주는 한 배양집락에서도 형태학적으로 나선형 이외에 단간형 또는 장간형 균이 혼재함을 관찰할 수 있었으며, 나선형 균에서도 오른쪽 또는 왼쪽으로 꼬인 나선균의 형태를 관찰할 수 있었다.

이에 본 연구에서는 1984년과 1985년 본 교실에서 환자로부터 분리한 *Leptospira*균주의 형태학적 및 생물학적 특성을 규명하고 이들의 특성을 ATCC로부터 분양받은 *Leptospira*균주의 특성과 함께 비교 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 병원균의 분리와 분리균의 특성

1). 병원균의 분리⁵⁾

균주의 분리를 위하여는 EDTA가 포함된 혈액 및 뇨를 환자로부터 채취하고, 이들을 실험동물에 접종하여 균을 분리하였다. 사용한 실험동물은 암·수 구별없이 guinea pig (체중, 200~250g)과 마우스 (체중, 18~20g) 등이었다. 직접분리시에는 leptospirosis증 환자의 혈액 및 뇨를 직접 배지에 접종하여 균의 분리를 시도하였다. 혈액(EDTA 포함)은 실온에서 750g에 30분간 원침하여 침전액을 사용하였는데, 실험동물 사용시에는 guinea pig은 1ml, 마우스는 0.1ml의 침전액을 복강내로 주사하였고, 직접 가검물로부터 분리하기 위하여는 각 가검물마다 0.03ml(Pasteur 피펫으로 1~2방울)의 침전액을 3~5개의 Fletcher 반고체배지에 접종·배양하였다.

환자의 뇨는 100ml를 5,000g로 30분간 원침하여 침전물을 생리식염수 5ml에 부유액을 만들어 위와 같은 양으로 각 실험동물에 복강내로 주사하였다.

농물은 200ml를 일차저속원침(2,000g/10분)하여 상층액만 취한 후, 뇨의 경우와 같은 방법으로 처리한 후 동물에 접종하였다. 접종 후 각 실험동물들은 외관상 병세를 보일 때까지 사육·관찰하였으며, 희생부검은 접종 10~15일후에 실시되었고, 방광의 뇨 및 담즙으로부터 채취한 체액들은 YUMC 5050 배지 ((2) 배양조건 참조.) 및 Fletcher반고체배지에 접종, 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 5일간 배양하여 균을 분리하였다.

2). 분리균의 특성

(1). 염색상, 형태 및 운동성 : 위와 같은 방법으로 분리된 균주들은 그람염색 및 silver 염색⁶⁾에 의해 광학현미경으로 관찰하였으며, 균의 운동성은 위상차현미경으로 관찰하였다. 한편 균의 형태는 주사 및 투과전자현미경으로 관찰하였는데, 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope; TEM)적 관찰을 위해서는 3% glutaraldehyde(pH 7.4)로 고정하고, 2% phosphotungstic acid(pH 7.4)용액으로 염색·건조후 Hitachi H-500형 투과전자현미경으로 75KV에서 관찰하였다. 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)적 관찰은 3% glutaraldehyde(pH 7.4)로 고정하고, 1% osmiumtetroxide로 처리후 탈수·건조시키고, aluminum stub에 gold coating(Eiko 1B-3)하여 Hitachi S-450형 주사전자현미경으로 15~20KV에서 관찰하였다.

(2). 배양조건과 5-FU 및 8-azaguanine의 영향 : 균의 분리 및 제대를 위하여는 Fletcher배지 (10% 가토혈청 및 150µg/ml의 5-FU 함유)를 주로 사용하였다(이하 Fletcher배지로 약함). 균의 분리 및 대량배양시에는 본 교실에서 교양한 YUMC 5050 배지(MEM 세포배양용 배지, 50ml; 여과된 정상성인의 뇨, 50ml; Hepes buffer, 0.45g; 1.2% pyruvate, 1ml, pH 7.2)를 병용하였으며, 두가지 배지 모두 교체배지시에는 한천을 1.5% 함유시켰다. Fletcher반고체 배지의 경우는 0.2%의 한천이 함유되어 있는 것을 사용하였다(Difco Lab.; BioQuest). 균의 배양조건은 배지의 종류를 달리하거나 통기성 및 온도의 영향등을 살펴보았는데, 사용된 배지는 brain heart infuson 평판배지, 영양한천배지 및 Fletcher배지등이었고, 13°C이하, 30% 및 37°C 등으로 온도를 달리하여 배양하였다. 각 균주들은 5-FU (150µg/ml) 및 8-azaguanine(250µg/ml)이 함유된 평판배지에서 37°C로 7일간 배양하여 균집락 형성여부에 의해 약제에 대한 감수성을 판정하였다.

(3). **균주의 병독성**: 동물에 의한 병독성 실험은 guinea pig, 마우스 및 다람쥐를 사용하였고 각 동물의 체중은 자기 200~250g, 18~20g 및 1.8~2.0g이었다.

마리당 접종균수는 guinea pig이 $2 \sim 4 \times 10^8$, 마우스가 $2 \sim 4 \times 10^8$, 다람쥐가 $2 \sim 4 \times 10^{10}$ 이었다. 접종은 복강내로 하였고, 접종후 외관적인 증상 및 2개월내 사망동물의 숫자로서 균주의 병독성을 판정하였다.

(4). **감염된 동물의 조직병리학적 관찰**: 상기와 같은 방법으로 감염시킨 동물들의 조직병리학적 소견은 균 접종후 날짜가 진행됨에 따라 각 3일, 10일, 및 20일째에 희생부검하여 Hematoxilin 및 Eosin염색으로 각 장기의 병변을 관찰하였고, 한편으로는 조직을 동결절편하여 환자 및 가토의 항혈청과 이에 대한 FITC conjugated immunoglobulin을 사용하여 간접면역형광법으로 균체를 증명하였다. 또한 조직절편, 방광의 뇨, 및 담즙등으로부터 채취한 세포들을 직접 Fletcher 배지에 접종하여 균의 배양여부로서 접종한 균의 감염여부를 확인하였다.

(5). **혈청학적 검사**: 분리균과 환자의 혈청에 대한 혈청학적 검사는 시험관내 응집반응, 간접면역형광법 및 Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)로 시행하였다.

사용된 항원으로는 Denka 연구소(Tokyo, Japan)에서 분양받은 비활성화 *Leptospira* 표준항원 5가지 혈청균들 (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. hebdomadis*, *L. australis* 및 *L. canicola*)와 ATCC로부터 분양받은 균주중 *Leptospira grippityphosa*를 첨가하여 총 6주의 참조항원이 사용되었다. ATCC에서 분양받은 균주와 본 교실에서 분리한 균주들은 0.5% formalin에 고정한 후, 생식염수 부유액을 만들어 항원으로 사용하였다. 한편 환자에서 분리된 항혈청 외에 가토로부터 항혈청을 얻었는데, 각 균주들은 56°C에서 30분간 열처리한 후 1×10^8 /ml 농도의 균부유액 2cc를 매주 피아주사하여 4회 주사후 일주의 휴식기간을 두고 혈청을 채취하여 사용하였다.

가) 시험관내 응집반응은 항원액과 56°C에서 30분간 처리한 환자 혹은 가토의 항혈청을 항원과 동량으로 (0.25 ml) 시험관내에서 혼합하여, 50°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 원침하여 판정하였다.

나) 간접면역형광법은 상거한 항원액들은 slide glass에 도말하여 acetone으로 고정한 다음, 환자 및 가토의 항혈청을 첨가하여, 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.05M phosphate buffered saline (pH 7.2)으로 3회 반복세척한 후 FITC가 붙은 goat의 an-

ti-human IgG 및 IgM과 anti-rabbit IgG 및 IgM (이상 Cooper Biochemical Inc., USA)을 떨어뜨려 실온에서 반응시켰다. 30분후 같은 완충액으로 3회 세척후 건조시켜 Zeiss 형광현미경으로 검경, 판정하였다.

다) ELISA 방법은 균 부유액 (1×10^8 /ml)을 음파처리(sonication)한 후 ELISA plate(Flow Lab. Inc., USA)에 10 μ l씩 넣어 건조시키고 methyl alcohol로 고정하였다. 각 well들은 0.05M phosphate buffered saline (pH 7.2)으로 3회 세척한 후, 1% bovine serum albumin(fraction V, Sigma)으로 20분간 처리하고, 다시 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 항원이 덮여진 각 well에는 20 μ g의 환자 혹은 가토의 항혈청을 넣어 40°C에서 90분간 반응시킨 후, 완충액으로 3회 세척하고, peroxidase가 붙은 polyvalent antihuman immunoglobulin 혹은 anti-human IgG나 anti-human IgM을 넣어 40°C에서 60분간 반응시켰다. 역시 동일 완충액으로 3회 세척한 후 이 효소에 대한 기질을 100 μ l씩 넣어 실온, 암소에서 30분간 반응시킨 후, ELISA reader로 판정하였다.

2. 분리균주와 표준균주의 특성비교

1). 물리·생화학적 검사

상기한 (2. 분리균의 특성 참조) 방법으로 배양 조건, 염색상, 형태 및 운동성을 비교, 관찰함과 동시에 열에 대한 내성, 5-FU, 8-azaguanine, 및 amphotericin B에 대한 감수성 여부, 그리고 기타 생화학적 특성들을 다음과 같은 방법으로 관찰하였다.

(1). **열에 대한 내성**: Fletcher 고체배지에서 5일간 배양한 균을 생식염수부유액 (1×10^8 /ml)으로 만들어 45°C, 50°C, 55°C 및 60°C에서 각기 30분간 열처리한 후 Fletcher 고체배지에서 접종, 37°C에서 7일간 배양하여 균집락 형성여부를 관찰하였다.

부도 1. 배양 5일째 분리균주 (BG-5)의 silver염색 모습: 나선형 세균 이외에도 단간형, 장간형의 세균들이 관찰되고 있다.

부도 3. 배양 5일째 표준균주(*L. icterohaemorrhagiae*)의 silver 염색 모습: 분리균주에서 관찰한 것과 동일한 형태학적 다양성을 관찰할 수 있다.

사는 Johnson 및 Faine²³⁾, Sonnenwirth 및 Jarett²⁴⁾의 균 동정방법에 의해 장내그람음성균, Spirochetes, 나선형 Vibrioids 및 Actinomycetes 등에 관계되는 특성들을 비교하였다.

2). 항생제 감수성 검사

Fletcher 배지에서 37°C로 48시간 배양한 균액을 사용, Müller-Hinton 배지에 멸균된 면봉으로 균을 도말하여 원판확산법에 의해 methicillin, penicillin-G, oxytetracycline, erythromycin 및 streptomycin 등에 대한 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

3) 균주들의 시간별 배양에 따른 형태학적변화:

1984년도 분리균주중 1주(UM-19)와 3가지 혈청균(*L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*)의 참조 *Leptospira* 균주(ATCC)를 사용하였는데, 각 균주들은 Fletcher 고체평판배지에서 3일간 배양한 후, 무균적으로 1×10^8 /ml의 생리식염수 균부유액으로 만들었으며, 이를 10개의 Fletcher 반고체배지에 동시에 접종한 후, 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하면서 2일 간격으로, 위상차 현미경 및 광학현미경적 관찰을 하였으며, 동시에 전술한 방법(분리균의 특성 참조)에 따라 처리하여 주사전자현미경으로 관찰하였다.

4) 혈청학적 검사

분리균주들 이외에 분리균의 특성에서 열거한 항원들을 사용하였고 사용된 혈청들도 동일하였다. 각 반응들은 현미경적 응집 시험으로 관찰하거나 간접면역형광법을 사용하였다.

성 적

1. 병원균의 분리와 분리균의 특성

1). 병원균의 분리

부도 2. 분리균주로 감염시킨 guinea pig의 병리 소견(실험결과 참조).

(2) 5-FU, 8-azaguanine, 및 amphotericin B의 영향: Fletcher 배지 및 YUMC 5050 배지에 5-FU (중위제약), 8-azaguanine(8-Ag; Sigma) 및 amphotericin B(E.R. Squib and Sons, Inc., USA)를 각각 150µg/ml, 250µg/ml 및 2.5µg/ml의 농도로 첨가하여 이들에 균을 접종, 37°C에서 7일간 배양한 후 균집락 형성여부로 감수성을 판정하였다.

(3) 생화학적 검사: 분리균에 대한 생화학적 점

실험재료 및 실험방법에서 전술된 대로 병원균의 분리가 시도되었다. 그 결과 가검물들 중 혈액으로부터 6주, 뇨와 눈물로부터 각 1주, 도합 8주의 병원균이 분리되었는데, 혈액으로부터의 4주는 guinea pig를 통하여, 그리고 혈액, 뇨 및 눈물로부터의 3주는 마우스를 통하여 분리되었다. 환자의 혈액을 guinea pig에 접종한 경우는 모두 7에로서, 그중 4에에서 10~25일 경과후 탈모, 혈뇨 및 체중감소등의 육안적인 증상을 나타내거나, 또는 뚜렷한 증상없이 사망하였으며, 4에에서 모두 장기나 방광의 뇨로부터 YUMC 5050배지를 통하여 병원균을 분리하였다(BG-5, BG-6, BG-7 및 BG-12로 명명). 환자의 뇨 및 눈물을 마우스에 접종한 경우는 모두 14에로서 뇨 접종군에서 1에(UM-19로 명명), 눈물접종군에서 1에(WM-1로 명명)에서 균주를 분리하였으나 guinea pig의 경우와 같은 육안적인 증상을 보이거나 사망한 예는 없었다. 가검물 중 혈액으로부터 직접 5-FU 함유 Fletcher 배지에 접종하여 병원균을 분리한 경우는 1에로서(BD-2로 명명), 1985년 가을 leptospirosis의 증상으로 내원한 환자의 혈액으로부터 분리되었다.

2). 분리균의 특성

(1). 염색상, 형태 및 운동성 : 분리균주들은 모두 그람염색상 유성으로 나타났으며, silver 염색에 의하여 형태의 관찰이 용이하였다. 광학현미경상 silver 염색으로 균의 형태를 관찰한 결과, 전형적인 나선형외에도 단간형 및 장간형등이 관찰되었으며(부도 1 참조), 투과 및 주사현미경상에서는 오른쪽으로 꼬인 나선형외에도 단간형, 장간형, 왼쪽으로 꼬인 나선형 및 구형등이 관찰되었고, 구형과 다른 형태들이 서로 연결되어 있는 모습도 관찰할 수 있었다. 나선형 균의 경우 나선의 숫자는 12~18개가 대부분이었으며, 직경은 0.2 μ m, 길이는 6 μ m 이상이였다.

각 분리균주들은 생리식염수 부유액을 만들어 위상 차현미경으로 그 운동성을 관찰하였는데, 모두 매우 빠른 운동성을 보였으며 그 양상은 다양하였으나 전방돌진의 경우가 대부분이었다.

(2). 배양조건과 5-FU 및 8-azaguanine의 영향 : 배지의 적합성 여부를 알아보기 위해 brain heart infusion 한천평판배지, 영양한천평판배지 및 Fletcher 평판배지를 사용, 배양 양상을 본 결과, 균주들은 세가지 배지에서 모두 잘 배양되었으며, 균집락은 얼은 노란색으로 집락의 경계는 선상도말시 명확한 원형이고, 집락성은 높은 것으로 나타났다. 동기성여부를 알아보기 위해서 YUMC 5050 한천평판배지에 균주를 접종하여 호기성 및 혐기적으로 6일간 배양해 본 결과 모두 엄격한 호기성이었다. 균의 배양조건중 온도의 영향을 알아보기 위한 실험에서, 13°C 이하에서는 모든 균주가 배양되지 않았으나, 30°C에서는 18~24시간, 37°C에서는 14~18시간내에 집락을 형성하여, 37°C에서 보다 빨리 증식하는 것으로 나타났다(Table 1 참조). 모든 균주들은 5-FU에 내성을 보였으나, 8-azaguanine에 대하여는 감수성을 나타내어 집락이 형성되지 않았고, amphotericin B를 배지에 첨가해 본 결과 모든 균주가 증식되어 내성을 나타내었다(Table 2 참조).

(3). 균주의 병독성 : 동물에 대한 균주의 감염능을 비교하기 위하여 5-FU가 함유된 Fletcher 반고체배지에서 3일간 배양한 BG-5 균액을 사용, guinea pig, 마우스 및 다람쥐 각 5마리에 복강으로 접종한 후 2개월간 관찰한 결과, guinea pig의 경우는 마리당 2~4 $\times 10^8$, 2~4 $\times 10^9$ 및 2~4 $\times 10^{10}$ 균수 접종군에서 그 사망수가 각각 1마리, 3마리 및 4마리로서 접종동물 50%를 죽일 수 있는 LD₅₀는 1~2 $\times 10^9$ 균수로 나타났으며 마우스의 경우는 각 균

Table 1. Culture condition

Organism	Stain**		Culture media***			Relation to oxygen	Culture temperature****	
	Gram	Silver	BHI	Nutrient	Fletcher		13°C	37°C
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)	-	+	+	+	+	aerobic	-	+
<i>L. canicola</i> (ATCC)	-	+	+	+	+	aerobic	-	+
<i>L. grippotyphosa</i> (ATCC)	-	+	+	+	+	aerobic	-	+
isolated strains								
BG-5 and 7 strains (1984)	-	+	+	+	+	aerobic	-	+
BD-2* (1985)	-	+	+	+	+	aerobic	-	+

BD: isolated directly from patient blood

BG: isolated from guinea pig inoculated with patient blood

ATCC: American Type Culture Collection

* : code No. of patient

** : (-), negative; (+), positive stain

*** : cultured

**** : (-), not cultured; (+), cultured

Table 2. The effect of 5-FU, 8-azaguanine, and amphotericin B on the growth of 5 strains of bacteria

Organism	Culture in the Fletcher medium containing		
	5-FU(150 μ g/ml)	8-azaguanine(250 μ g/ml)	amphotericin B(2.5 μ g/ml)
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)	+	-	+
<i>L. canicola</i> (ATCC)	+	-	+
<i>L. grippotyphosa</i> (ATCC)	+	-	+
BG-5 strain (1984)	+	-	+
BD-2 strain (1985)	+	-	+

+ : growth - : no growth

Table 3. Susceptibility of animals to the bacteria

Animal	Dose challenged(No. of cells/animal)			
	10 ⁶ *	10 ⁷	10 ⁸ **	LD ₅₀
Guinea pig	1/5*	3/5	4/5	2 \times 10 ⁶
Mouse	1/5	1/5	2/5	2 \times 10 ⁸ **
Chipmunk	0/5	0/5	0/5	>2 \times 10 ⁸ *

* : No. of animal(death/total)

수 접종군에서 1마리, 1마리 및 2마리가 사망하였다. 한편 다람쥐의 경우는 어느 군에서나 사망한 경우는 1예도 없었으며, 이 균의 감염에 대해 매우 높은 저항성을 보였다(Table 3 참조).

(4). 감염동물의 조직병리학적 관찰 : guinea pig에 대한 균주의 병원성을 알아보기 위한 실험으로 Fletcher 반고체배지에서 3일간 배양된 BG-5 균액을 마리당 5 \times 10⁶ 균수로 부강내 접종한 후 3일, 10일 및 20일째에 자기 회생부검하여 장기, 혈액, 방광의 노 및 담즙에서 균 배양 여부를 보고, 조직 표본을 통하여 병리학적 소견을 관찰하는 한편, 간

접면역형광법에 의해서 조직내의 균체를 관찰하였다. 균배양검사에서는 접종후 3일에는 방광내 균을 제외한 혈액, 폐장, 간장 및 신장에서 모두 균이 검출되었으며, 접종 10일째의 경우는 간장 및 혈액 그리고 노에서도 균이 배양되었다. 한편, 종 20일째의 경우에는 노 및 각 장기에서 계속 균이 검출되었으나 혈액에서는 균이 검출되지 않았다. 균접종 10일째의 조직병리소견상, 폐장의 경우 폐포내 출혈과 단백백혈구의 침윤 및 기관지폐염양상을 볼 수 있었으며, 간장에서는 Kupffer cell 과다증식, 간장 동양구조내 울혈, 저산소증변화 및 국소적 허혈성 괴사를 나타내었다. 신장의 경우 수질내 출혈을 볼 수 있었으며, 노에서는 많은 혈구들이 관찰되었다(부도 2 참조).

(5). 혈청학적 검사 : 균주들이 분리된 환자의 혈액과 분리균주에 대한 가토의 항혈청을 표준 *Leptospira* 항원 및 비활성화시킨 분리균주들과 반응시 현미경적 응집반응 및 간접면역형광법으로 관찰 결과 균이 분리된 환자의 혈청은 Denka 연구소

Table 4. Agglutination tests using patient and immunized rabbit sera with reference and isolated *Leptospira* (BD-2 and BG-5 strain)

Antigen	Patients' sera*			Immunized rabbit sera against	
	Subject 5	Subject 6	Subject 7	BG-5	<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)
Inactivated reference <i>Leptospira</i>					
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)	NT	++	NT	++	++
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (Denka)	++	+	++	++	NT
<i>L. autumnalis</i> (Denka)	+	+	+	+	NT
<i>L. hebdomadis</i> (Denka)	+	+	+	+	NT
<i>L. australis</i> (Denka)	++	++	++	++	NT
<i>L. canicola</i> (Denka)	+	+	+	+	NT
Inactivated BG-5 strain	++	+	+	++	++
Inactivated BD-2 strain	NT	NT	NT	++	++

* : Sera of the patients from whom the bacteria (BG-5, BG-6, and BG-7) were isolated.

** : Sera obtained from immunized rabbits with BG-5 and *L. icterohaemorrhagiae* independently.

+ : positive response, ++ : strong positive response, NT : not tested

Table 5. The viability of the bacteria at various temperatures

	Viability after treatment for 30 min at			
	45°C	50°C	55°C	60°C
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)	+	-	-	-
<i>L. canicola</i> (ATCC)	+	-	-	-
<i>L. grippotyphosa</i> (ATCC)	+	-	-	-
BG-5 and 7 strains (1984)	+	-	-	-
BD-2 strain (1985)	+	-	-	-

Table 6. IMViC test, carbohydrates utilization, and nitrate reduction test

Organism	Indole test	Methyl red test	VP* test	Citrate utilization test	glucose	sucrose	lactose	mannitol	Nitrate reduction test
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. canicola</i> (ATCC)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. grippotyphosa</i> (ATCC)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BG-5 strain (1984)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BD-2 strain (1985)	-	-	-	+	-	-	-	-	-

* VP test : Voges-Proskauer test

Table 7. Antibiotic sensitivity test for the isolated and reference *Leptospira*

Organism	Antibiotics	Diameter of inhibitory zone(mm) in disk diffusion method and interpretation			
		Methicillin	Penicillin-G	Oxytetracycline	Erythromycin
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> (ATCC)		9 (R)*	25 (S)**	30 (S)	30 (S)
<i>L. canicola</i> (ATCC)		10 (R)	22 (S)	28 (S)	29 (S)
<i>L. grippotyphosa</i> (ATCC)		9 (R)	23 (S)	31 (S)	30 (S)
BG-5 strain (1984)		10 (R)	20 (S)	25 (S)	35 (S)
BD-2 strain (1985)		8 (R)	23 (S)	26 (S)	32 (S)

* R : Resistant, ** S : Sensitive

부터의 5 혈청군의 항원과 반응하였으며, 5 가지 혈청군중 *Leptospira icterohaemorrhagiae* 및 *Leptospira australis*와 보다 강하게 반응하였다. 한편 1985 년도에 분리된 *Leptospira* (BD-2)는 1984년도 분리 균인 BG-5에 대한 가토의 항혈청과 강한 반응을 나타내어 1984년과 1985년 분리균간의 혈청학적 유사성을 보였다 (Table 4 참조).

2. 분리균주와 표준균주의 특성 비교

1). 배양조건, 염색상, 형태 및 운동성

배양조건에서 ATCC 표준균주들 (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*)은 분리균주와 차이를 보이지 않아 BHI 평판배지, 영양한천배지 및 Fletcher 배지에서 모두 배양되었다. 이들은 엄격한 호기성이며, 13°C 이하에서는 배양되지 않았고, 30°C 및 37°C에서는 모두 배양되었다. 염색상은 그람음성이었으나 매우 희미하였고, silver 염색으

로 형태의 관찰이 용이하였다. 위상차현미경하에서 분리균주 및 표준균주는 모든 매우 빠른 운동성을 나타내었다(부도 3 참조).

2). 물리·생화학적 특성

(1). 사멸 온도 : 사멸 온도를 알기 위해서 45°C, 50°C, 55°C 및 60°C에서 30분간 열처리를 하였는데, 50°C, 55°C 및 60°C에서 열처리한 경우는 균이 사멸되었고, 45°C의 경우에는 균이 배양되어 실험재료에서 기술된 농도 (1×10^8 /ml)에서 균주의 사멸을 위한 열처리의 온도는 45°C보다 높은 것으로 나타났다 (Table 5 참조).

(2). 5-FU, 8-azaguanine 및 amphotericin B에 대한 감수성 : BG-8을 제외한 모든 균주들은 5-FU에 내성을 보였으나, 8-azaguanine에 대하여는 감수성을 나타내어 집락이 형성되지 않았고, amphotericin B를 배지에 첨가해 본 결과, 모든 균주가 증식되어 내성을 나타내었다 (Table 2 참조).

(3). 생화학적 특성 : 분리균주들 및 ATCC 표준균주들은 모두 그람음성으로 나타났으므로 일반 그람 음성세균과 그 생화학적 성질을 비교하였는 바, 그람 양성 세균의 성장을 억제시키는 bile salt에 대해서 모든 균주가 성장이 억제되지 않았으며, 당이용 검사에서는 모든 균주가 glucose, sucrose, lactose, 및 mannitol을 발효시키지 못하는 것으로 나타났다.

한편, 장내세균일 가능성을 제거하기 위하여 IM-ViC 검사를 실시한 결과, Indole 검사, Methyl-red 검사 및 Voges-Proskauer 검사에서는 음성으로 나타난 반면, citrate 이용 검사에서는 양성으로 나타났다. 또한 질산환원 검사에서도 모든 균주들이 음성을 나타내어 표준균주들과 서로 일치하는 결과를 보이었다 (Table 6 참조).

3). 항생제 감수성 검사

각 균주들은 원판확산법을 이용하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 사용된 항생제 함유원판은 methicillin, oxytetracycline, erythromycin, streptomycin 및 penicillin-G 등이었으며, 이중 oxytetracycline, erythromycin, streptomycin 및 penicillin-G 등에 대해 감수성을 보이었다 (Table 7 참조).

4). 균주들의 시간별 배양에 따른 형태학적 변화

분리균주와 표준균주들은 Fletcher 한천평판배지에서 3일간 배양한 후 silver 염색으로 균의 형태를

관찰한 결과, 단간균이 그 대부분을 차지하였다. 이 상태의 균주를 사용, 무균생리식염수에 균 부유액을 만들어 10개의 Fletcher 반고체배지에서 배양하여 매 2일마다 광학현미경 및 주사전자현미경으로 균의 형태를 관찰하였다.

배양 2일째 균의 형태는 장간균과 느슨한 나선형 간균의 모습을 보였고, 배양후 6일째에 이르러서는 오른쪽으로 꼬인 나선형 균들이 관찰되었으며, 동시에 왼쪽으로 비교적 조밀하게 꼬인 나선형 균들을 볼 수 있었으나, 그 숫자는 오른쪽으로 꼬인 것에 비해 극히 적었다. 배양후 8일째에는 다시 단간균이 그 주종을 이루었으며, 이러한 단간균들 사이로 드물게 구형이 관찰되었다. 배양후 10일째에는 구형이 대부분을 차지하였으며, 배양후 10일째의 균액을 새로운 Fletcher 배지에서 3일간 배양하여 균의 형태를 본 결과, 많은 간균이 관찰되었으며, 구형과 간균이 서로 연결되어 있는 모습도 볼 수 있었다. 한편, 배양후 8일째의 균액(주로 단간형임.)을 새로운 Fletcher 배지에서 3일간 배양한 후의 균의 형태를 보면 구형은 찾아볼 수 없고 간균 및 나선형 균들만이 관찰되었다. 배양 12일째에는 10일째 볼 수 있었던 둥근 구형이 찌그러진 모습을 보이었다. 각 균주들은 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 배양되었으며, 부도에서 볼 수 있듯이 분리균주에서 뿐만

부도 4. 분주 당시의 균의 형태 : 단간형이 주종을 이루고 있다.

부도 5. 배양 6일째 균의 형태 : 오른쪽으로 느슨하게 꼬인 나선형 균들을 볼 수 있다.

부도 6. 배양 6일째 균의 형태 : 왼쪽으로 조밀하게 꼬인 나선형 균들이 관찰됨.

부도 7. 배양 8일째 균의 형태 : 단간균이 다시 주종을 이루고 있다.

부도 8. 배양 10일째 균의 형태 : 구형이 주종을 이루고 있다.

부도 9. 배양 10일째 균의 형태: 구형과 단간균 혹은 구형과 장간균이 서로 연결되어 있는 모습이 관찰됨.

아니라 표준균주에서도 동일하게 형태학적 다양성 및 시간별 배양에 따른 형태의 변화가 관찰되었다 (부도4~부도9 참조).

5) 혈청학적 검사 (Table 4 참조)

분리균의 특성에서 기술된 혈청학적 검사 이외에도, ATCC로부터 분양받은 표준 *Leptospira* 중 혈청군 *L. icterohaemorrhagiae*에 대한 가토의 항혈청을 사용하여, 분리균주와의 혈청학적 연관성을 본 결과, 시험관내 응집반응에서는 강한 반응을 나타냈으며, 간접면역형광법으로는 균의 형태를 형광현미경하에서 관찰할 수 있었다.

고 찰

우리나라에서 유행성 출혈형 폐염양 질환은 1975년 가을, 경기, 강원 및 충북지역을 중심으로 대유행한 이래 산발적으로 중부 내륙지방에서 발생되어 왔다. 이 질환은 주로 논농사에 종사하는 사람에게서 발생하여 추수작업 1~3주 후에 갑작스런 고열, 두통, 오한, 심한 근육통등이 나타나며, 위이여 호흡곤란, 흉부동통 혹은 혈담이나 각혈이 나타나고 열은 대개 38~40°C에 이르러 2~12일간 지속되는데, 검사상 소견으로는 흉부 X-선상 수시간 내에 미만성

간질성 병변이 전폐야에 확대되었다가 급속히 사라지는 양상을 보이며, 기타 검사상 간장, 신장 및 중추신경계에까지 이상 소견을 보이는 전신성 질환이 그 전형적인 모습으로 보고되어 왔다¹⁶⁻¹⁸.

이 질환의 원인규명에 대하여는 1975년 대유행 이후 바이러스일 것이라는 추측만이 있었을 뿐이었고 mycoplasma에 의한 폐염일 것이라는 가능성은 임상적 및 병리학적으로 현저한 차이가 있음이 보고되어, 사회적 문제의 심각성에 비하여 그 원인규명에 관하여는 충분한 연구보고가 없었다. 1984년에는 이 질환이 다시 유행하였고, 본 교실에 의해 환자로부터 분리된 원인균이 *Leptospira*로 밝혀져 과거의 유행성 출혈형 폐염양 질환은 leptospirosis임이 증명되었다^{19,20} 이에 본 교실에서는 분리된 균주의 특성을 규명한 바, 분리된 7주의 병원균은 그람염색상 모두 음성이었으며, 운동성이 있는 절대호기성 세균이었다. 배양조건상 30°C 보다는 37°C에서 보다 빨리 집락형 성형하였는데 이는 *Leptospira*에 관한 Johnson²¹의 기술과 일치하였다. 모든 균주들은 5-FU에 내성을 보이었으므로, *Leptospira* 임이 확인되었고, 13°C 배양 및 8-azaguanine이 함유된 배지에서의 균 집락형성을 관찰한 결과 13°C 이하에서는 균이 배양되지 않았고 8-azaguanine 에는

감수성을 보임으로써 *Leptospira*의 두 가지 종 (sp-ecies)중 *Leptospira interrogans*임을 알 수 있었다.

상기한 분리 병원균의 병독성시험에서는 guinea pig의 경우는 LD₅₀가 1~2×10⁸인데 반해서 마우스는 1~2×10⁶으로 guinea pig 이 더 감수성이 높음을 확인하였고, 한편 다람쥐 집종균에서는 전혀 사망하는 예가 없어 분리균에 대하여 높은 저항성을 보이었다. Jawetz 등²⁰⁾ 여러 연구자들에 의하면 어린 guinea pig (체중, 150~200g)이나 hamster 등이 *Leptospira interrogans*에 감수성이 높은 것으로 되어 있다. 반면에 rat나 마우스등은 *Leptospira*의 보균자는 되어도 균에 대한 감수성은 높지 않은 것으로 되어 있으며, 이들 동물을 감염시키기 위해서는 cyclophosphamide 등의 면역억제제를 사용하거나 방사선 조사등을 실시한 후에 균을 접종하면 감수성을 높일 수가 있다고 보고하고 있다²¹⁾.

한편, guinea pig에 분리균을 접종한 후 날짜에 따라 혈액, 뇨 및 각 장기에서의 균 증식을 조사한 실험에서 간장, 폐장 및 신장에서는 접종 20일후부터 계속 균이 검출되나 뇨의 경우는 접종 10일째부터 균이 검출되고, 혈액에서는 접종 20 일 후에는 균을 검출할 수 없어 Turner 등²²⁾의 결과와 일치하였다. 조직병리학적 소견에서 간장은 Kupffer cell의 파다증식, 동양구조내의 울혈, 저산소증 변화 및 국소적 허혈성 괴사등을 보였고, 폐장에서는 폐포내 출혈과 다핵백혈구의 침윤 및 기관지 폐염의 양상을 나타냈으며, 신장과 부신에서는 수질내 출혈을, 뇨에서는 많은 적혈구들을 관찰할 수 있다. 이러한 결과는 De Arriaga 등¹⁹⁾ 및 De Brito 등¹⁷⁾의 guinea pig 동물실험 결과와 같은 양상이었고, Boyd²³⁾, Ar-ean¹¹⁾ 및 Turner 등²⁴⁾이 보고한 leptospirosis 환자의 병리적 소견과도 일치하였다.

상기한 병원성 분리균들은 혈청학적 검사 결과 혈청군 *Leptospira icterohaemorrhagiae* 및 *Leptospira australis*와 보다 강한 혈청학적 연관성을 나타내었으나 이들중 어느 혈청군에 속하는지는 확실히 알 수 없었다. 한편 1984년도 분리균주에 대한 가토의 항혈청을 사용하여 1985년도 분리균주와 반응시킨 결과 강한 혈청학적 연관성을 나타내어 1984년도와 1985년도의 leptospirosis는 적어도 같은 혈청군에 의한 것으로 사료되었다.

각 분리균주들은 ATCC로부터 분양받은 *Leptospira interrogans* 3가지 혈청군 (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*) 과 비교하여 그 특성을 관찰하였다. 배양조건중 배지의 적합성 여부에서는 brain heart infusion 한천평판배지, 영

양한천배지 및 Fletcher 배지에서 모두 잘 배양이 되었고, 이는 *Leptospira*는 특별히 까다로운 영양조건을 필요로 하지 않는다는 Johnson 등²⁵⁾의 기술과 일치하였다. 한편 분리균주와 표준균주들은 본 교실에서 고안한 YUMC5050 배지에서 잘 자랐는데, 이 배지는 *Leptospira*가 감염동물이나 환자의 뇨에서 검출됨에 착안하였고, pyruvate 및 non-essential 아미노산이 *Leptospira*의 성장을 증가시킨다는 주장에 근거하여²⁶⁾ MEM 조직배양용 배지와 정상인의 뇨를 각각 동량 혼합하여 사용하였다.

ATCC로부터 분양받은 *Leptospira* 균주와 분리된 균주는 13°C 이하에서는 배양되지 않았고, 30°C 및 37°C에서는 잘 배양되었는데 균집락형성 속도는 37°C에서 더 빠른 것으로 나타났다. 한편 일반적으로 *Leptospira*를 배양할 때 30°C로 하는 경우 37°C 배양이 생존능(viability)에 영향을 줄 수 있기 때문이라 하나²⁷⁾, 본 교실에서는 수 개월 이상 37°C에서 균주를 배양하였으나 제대배양시 생존능(viability)에 문제가 있었던 경우는 경험할 수 없었다. 생리 식염수 균부유액으로 위상차현미경하에서 분리균주 및 표준균주를 관찰한 결과, 모두 매우 빠른 운동성을 보이었으며 운동은 전방돌진의 양상이 대부분이었다. 한편 균주들의 물리생화학적 특성중 열에 대한 내성을 알아보는 시험에서는 분리균주 및 표준균주들은 50°C, 55°C 및 60°C에서 30분간 열처리한 경우는 균이 사멸되었고, 45°C의 경우에는 균이 배양되어 실험재료에서 기술된 농도(1×10⁶/ml)에서 균주의 사멸을 위한 열처리의 온도는 45°C보다는 높은 것으로 나타났는데 이는 Sonnenwirth 등²⁸⁾의 결과와 일치하였다. 분리균주 및 표준 균주는 모두 그람음성으로 나타났으므로 일반 그람음성세균과 그 생화학적 성질을 비교하였는데, 당이용성, IMViC 검사 및 질산환원검사상 장내세균과의 감별이 가능하였고 그 결과는 분리균주와 표준균주에서 동일하였다. 각 균주들은 항생제 감수성 검사를 통하여 oxytetracycline, streptomycin, erythromycin 및 penicillin-G 등에 감수성을 보였으나, 생체 내에서 이러한 항생제들의 효능은 의심스러운 것으로, Sonnenwirth 등²⁹⁾은 leptospirosis의 치료에 있어서 tetracycline이나 penicillin-G 등은 발병 48시간 이내에 투여하면, 그 효과를 기대할 수도 있다고 기술하고 있다. 또한 일정기간이 지나 leptospiremic stage에서 leptospiric stage로 넘어가면 *Leptospira*는 신장의 근위세뇨관 세포내에 위치하여 증식하므로, 약제의 침투 및 그 효능의 발휘는 더욱 어려워질 것이다. 한편 각 균주들은 다양한 형태, 즉, 나선형, 단간형 및 장간형등이 광학

현미경으로 관찰되었고, 주사전자현미경으로 관찰한 바, 전형적인 오른쪽으로 꼬인 나선형외에도 왼쪽으로 꼬인 나선형 및 구형등이 관찰되었다. 이에 이러한 여러 형태들이 한 배지내에서 시간이 감에 따라 어떠한 양상을 보이는지 알아보기 위해, 분리균주 및 표준균주를 서로 비교하여 일정시간이 지남에 따른 형태학적 변화양상을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 처음 분주 당시에는 단간균이 주종을 이루던 것이 제 2일에는 장간형 혹은 느슨한 짧은(8 μ m 이하) 나선형, 제 6일에는 긴 나선형(12 μ m 이상) 제 8일에는 다시 단간형으로 이어지는 세균의 생활환을 생각해 했으며, 제 10일에 이르러서는 구형이 나타나 이때의 배지상태가 세균에게는 적당치 않은 외부환경임을 알 수 있었다. 구형의 크기는 2 μ m에서 6 μ m에 이르기까지 다양하였으며, 이들 크고 작은 구형들은 염주알을 깨어놓은 듯한 모습을 보였다. Czekałowski 및 Eaves 등¹⁰⁾은 *Leptospira*의 형태에 대한 전자현미경적 관찰에서 이미 장간형, 구형 및 나선형등 다양한 *Leptospira*의 형태에 관하여 보고한 바 있으나, 구형이 서로 연결되어 있는 형태에 관한 언급은 없었다. 한편, 구형과 단간형, 구형과 장간형, 혹은 구형과 나선형이 서로 연결되어 있는 모습은 분리균주 및 표준균주에서 모두 관찰되었고, 이는 Czekałowski 및 Eaves 등¹⁰⁾의 결과와 일치하였다. 이러한 시간별 배양에 따른 *Leptospira* 형태의 다양성은 분리균주 및 표준균주에서도 두 관찰되었고, 구형의 생성시기도 역시 같은 10일째로서 적어도 Flecher 반고체배지의 경우 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였을 때, 배지의 조건은 접종후 10일이면 *Leptospira*에 적당치 않은 환경이 됨을 알 수 있었다. 또한 접종 6일째의 경우 오른쪽으로 꼬인 나선형과 왼쪽으로 꼬인 나선형이 동시에 관찰되었고 왼쪽으로 꼬인 것이 그 빈도상 매우 드물게 관찰되는 것으로 보아 왼쪽으로 꼬인 나선형은 세균증식과정에서 자연발생하는 변종이라고 생각되었는데, Carleton 등¹¹⁾ 역시 *Leptospira*의 나선형의 방향에 대한 관찰에서 왼쪽으로 꼬인 나선형이 극히 적음을 지적하였다.

혈청학적 검사상, 분리균주들은 ATCC의 표준 *Leptospira* 중 *L. icterohaemorrhagiae*에 대한 가토의 항혈청과 강하게 반응하여 이들간의 혈청학적 연관성을 나타내었다.

결 론

유행성 출혈형 폐염양 질환 환자들로부터 분리한 병원균에 대한 세균학적, 물리생화학적 및 혈청학

적 성상을 조사, 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리된 병원균은 1984년에 7주, 1985년에 1주로, 총 8주였다.

2. 분리균주는 절대호기성이며, 그람음성인 운동성 세균으로서 5-FU에 내성을 보이었고, 13°C 이하에서는 자라지 않으며, 8-azaguanine에 감수성을 나타내, *Leptospira* 중에서도 병원성인 *Leptospira interrogans*임을 확인하였다.

3. 형태학적으로는 분리균주는 오른쪽으로 꼬인 나선형외에 단간형, 장간형, 구형 및 왼쪽으로 꼬인 나선형등 다양성을 보였다.

4. 혈청학적으로 분리균주는 *Leptospira interrogans* 중 혈청군 *L. icterohaemorrhagiae* 및 *L. australis*에 강한 혈청학적 반응을 나타내었다.

5. 항생제 감수성 검사상 분리균주는 penicillin-G, oxytetracycline, erythromycin 및 streptomycin 등에 감수성을 보였다.

6. 열처리시 분리균주의 사멸온도는 45°C 보다는 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과들을 종합하고, ATCC로부터 분양 받은 *Leptospira interrogans*를 분리균주와 동일한 조건에서 배양하여 그 형태를 관찰한 결과, 동일한 형태학적 다양성을 보임으로써 분리균주는 *Leptospira interrogans*임을 확인하였다.

참 고 문 헌

- 1) 김기호, 홍순조, 이효식, 강문원, 김호연, 정규원, 정희영, 전중휘, 김선무, 이종무, 김정진 : 폐염양 질환의 임상적 관찰, 대한의학협회지, 19: 4, 1976.
- 2) 김정순, 이주원, 오대규, 인선동, 이용호, 조우현 : 폐염양 질환(유행성 폐출혈열)의 원인구명을 위한 역학적 연구, 대한의학협회지, 28: 77, 1985.
- 3) 노영무, 육순재, 윤홍진, 최정수, 조환구, 한봉섭, 김근상, 박찬일, 한홍식 : 급성폐출혈열, 대한의학협회지, 19: 4, 1976.
- 4) 박승철, 이정희, 김복현, 박한철, 민수홍 : 폐염양 질환의 역학적 조사, 대한의학협회지, 19: 4, 1976.
- 5) 박용휘, 김춘열, 박석희, 석영관 : 폐염양 질환의 X-선 소견, 대한의학협회지, 19: 4, 1976.
- 6) 심영학, 심봉섭, 최경훈, 김두식, 신제철, 이강용, 이용우, 김영중, 진춘조, 이종태, 채일석 : 폐염양 질환 : 유행성 폐출혈열(가칭), 대한의

- 학협회지, 19: 4, 1097.
- 7) 이봉기·유주현, 이원영, 김주덕: 유행성 출혈형 폐렴양 질환의 병원균 분리화 세균학적 특성, 한국미생물학회지, 23: 3, 1985.
 - 8) 이봉기, 유주현, 이태윤, 박전환, 이원영, 김주덕: *Leptospira*(Korea)의 병원성 및 leptospirosis 환자 조직과의 특이성, 한국미생물학회지, 23: 4, 1985.
 - 9) 이원영, 이봉기, 김주덕, 김정순, 김상욱: 폐렴양 출혈열 환자로 부터 분리된 *Leptospira*의 세균학적 특성과 병인론적 증명, 한국역학회지, 6: 1, 1984.
 - 10) Adler B, and Faine S: Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona, Infect. Immun., 14: 703, 1976.
 - 11) Arean VM: The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis(Weil's disease), Am. J. Pathol., 40: 393, 1962.
 - 12) Boyd DH: Leptospirosis canicola presenting as pneumonia, Br. J. Dis. Chest., 54: 91, 1960.
 - 13) Carleton O, Charon NW, Allender and O'Brien, S: Helix handedness of *Leptospira interrogans* as determined by scanning electron microscopy, J. Bacteriol., 137: 3, 1979.
 - 14) Clark G: Stains for microorganisms in smears, 407, Clark G, Staining procedures, 4th edition, Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1981.
 - 15) Czekalowski JW and Eaves G: Formation of granular structures by *Leptospirae* as revealed by the electron microscope, J. Bacteriol., 67: 619, 1954.
 - 16) De Arriaga AJD, Rocha AS, Yasuda PH and Brito TE: Morphofunctional patterns of kidney injury in the experimental leptospirosis of the guinea pig (*L. icterohaemorrhagiae*), J. Pathol., 138: 145, 1982.
 - 17) De Brito T: On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis, Rev. Inst. Med Trop., 10: 238, 1968.
 - 18) Hübener and Reiter: Beiträge Zur Aetiologie der Weilschen Krankheit, Deutsche Med. Wchnschr., 42, 1 and 131, 1916.
 - 19) Inada R Ido, Y Hoki, R, Kaneko R, and Ito, H: The etiology, mode of infection and specific therapy in Weil's disease(spirochaetosis icterohaemorrhagica), J. Exper. Med., 23, 377, 1916.
 - 20) Jawetz E, Melnick JL, and Adelberg EA: Spirochetes and other spiral microorganisms, 267, Jawetz E, Melnick JL, and Adelbeag EA, Review of medical microbiology, 16th edition, LANGE medical publications, California, 1984.
 - 21) Johnson RC: Aerobic spirochetes: the genus *Leptospira*, 582, Starr, Stolp, Truper, Balows, and Schlegel, The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, 1st edition, Springer-Verlag, New York, 1981.
 - 22) Johnson RC, and Faine S: Spirochetes, 62, Krieg, NR, Holt JG, Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st edition, Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1984.
 - 23) Mandell GL: *Leptospira* species(Leptospirosis), 1338, Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, Principles and practices of infectious diseases, 2nd edition, John Wiley and Sons Inc, New York, 1985.
 - 24) Sanford JP: Leptospirosis, 1048, Petersdorf, RG, Adams RD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Wilson JD, Harrison's principles of internal medicine, 10th edition, McGraw-Hill book company, New York, 1983.
 - 25) Sonnenwirth AC: The spirochetes, 1862, Sonnenwirth AC, Jarett L, Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis, 8th edition, The C. V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
 - 26) Turner LH: Leptospirosis, Br. Med. J., 1: 537, 1973.
 - 27) Weir DW: Immunologic methods in bacteriology, 39. 1, Weir DW, Handbook of experimental immunology, 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1978.