

Leptospira canicola 실험적 감염햄스타의 조직절편내 면역조직화학적 균체항원검출

구복경 · 김순복* · 서정향* · 문운경 · 정석찬 · 박정문** · 박용호*** · 문진산

수의과학연구소 · 경상대학교 수의과대학*
한국미생물연구소** · 서울대학교 수의과대학***
(1995년 11월 24일 접수)

Immunohistochemical detection of antigens in tissue sections of experimentally infected hamsters

Bok-gyeong Ku, Soon-bok Kim*, Jung-hang Sur*, Oun-kyong Moon
Suk-chan Jung, Jung-moon Park**, Yong-ho Park**, Jin-san Mun

Veterinary Research Institute, Anyang RDA, Korea
College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University* · Korea Microbiology Lab. LTD**
College of Veterinary Medicine Seoul National University***
(Received Nov 24, 1995)

Abstract : The present study was done to detect *Leptospira canicola* antigens in paraffin sections from experimentally infected hamsters with PAP method.

The anti-*Leptospira canicola* serum used as first antibody was prepared by immunizing rabbits with *Leptospira canicola*.

Positive reactions were detected in interstitium, tubular epithelial cells and glomerulus of the kidney, and in the hepatic sinusoid.

With PAP method, leptospiral antigens were detected at the 48 hours after bacterial infection, but isolation, silver stain, and dark field microscopic examination of the samples did 48 hours later than PAP method.

The results suggested that PAP method is considered as a reliable tool for confirmative diagnosis of this disease.

Key words : *Leptospira canicola*, PAP method.

서 론

렙토스피라병은 전세계에 걸쳐 가축 혹은 야생동물들을 숙주로 하여 이들 동물들이 배설하는 뇨중으로 렙토스피라균이 배출되어 오염된 흙, 물 및 채소 등에 직접 혹은 간접적으로 접촉됨으로써 사람 및 가축에

감염되는 인수공통 전염성 질환이다¹⁻⁴.

렙토스피라병은 매우 다양한 임상증상들을 나타내고 감염된 동물과 사람에서 고열, 간질성 신염, 황달, 간염, 전신출혈 등을 나타내며¹⁻⁹ 소와 돼지에서는 유산과 유량감소를 일으켜¹⁰⁻¹² 경제적 손실을 가져오게 한다.

이 질병의 양상은 렙토스피라 혈청형, 침입한 균수 및 숙주의 저항력과 밀접한 관계가 있으며 임상적으로 패혈증기(septicemic phase) 및 면역기(immune phase)로 분류되며 전기에는 혈액에서 후기에는 뇨중에서 렙토스피라의 분리가 가능하다⁴.

*L. canicola*는 1931년 Klarenbeck 등⁷이 처음 분리하였고 개에서 감염률이 높아^{11,13} 사람에게 전과위험성이 높은 것으로 알려져 왔으나 최근에는 돼지에서도 감염률이 증가된다는 보고가 있어 이들 동물들에 대한 본병의 신속한 진단은 공중보건학적 측면에서도 중요한 의의를 가진다고 하겠다⁴.

일반적으로 실험실 진단은 원인균 배양, 암시야현미경관찰, 혈청학적 방법에 의해 이루어지고 있으나 세균배양은 분리가 어려우며 시일이 많이 걸리는 단점이 있고^{15,16}, 암시야현미경관찰은 다른 *Spirochetes* 속과 감별이 어려워 이것만으로는 확진이 힘들다. 그리고 혈청학적 진단법은 렙토스피라균이 항원학적으로 많은 혈청형이 존재하기 때문에 어려움이 많다^{15,17}.

감염조직에서 직접 항원을 검출하는 면역조직화학법은 특이성이 높고 조작이 간단하며 실험자가 감염위험에서 벗어날 수 있는 등의 많은 장점을 가지고 있어 각종 질병의 효과적인 진단법으로서 오늘날 이 분야에 많은 연구가 행하여지고 있으며^{7,14-15,16,18-20} Sternberger 등²¹은 *Spirochetes* 속 *Treponema pallidum*을 슬라이드에 도말하여 세균을 동정하는 방법으로 PAP 법을 이용하였다.

본 연구는 렙토스피라병에 인공감염된 햄스타 신장과 간의 파라핀포매 조직절편에서 면역조직화학법인 PAP 법을 이용하여 *L. canicola* 균체항원을 검출함으로써 본 병을 조기에 신속하게 확진할 수 있는 진단법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 : 항원으로 사용된 균주는 농촌진흥청수의과학연구소 세균과로부터 분양받은 *Leptospira canicola* Hond Utrecht IV (National Veterinary Services Laboratories, USA)를 5-fluorouracil과 Enrichment (Difco)가 첨가된 Ellinghausen McCullough Johnson Harris(EMJH) Broth 내에서 균수나 균활력이 좋은 것을 선발하여 1,500rpm에서 10분동안 원심하였

다. 상층액 2ml 를 0.45m 여과기에 여과시켜 균상태를 암시 야현미경에서 관찰한 뒤 다시 EMJH Broth(Difco) 0.5~1ml을 분주하여 27℃에서 6일간 배양하였으며, 10mM Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2)로 원침 세척한 균액을 병원성 획득을 위해 50~60일령의 건강한 기니피 18두에다 균액 2 ml씩을 복강주사한 뒤 임상증상을 나타내거나 폐사하기 직전의 기니피심장으로 부터 채취한 혈액과 간 및 신장조직에서 암시야현미경을 통해 나선균을 확인하고, EMJH Broth 에 희석한 후 기니피에 다시 접종하는 방법으로 5계대를 통해 병원성을 획득한 균주를 본 실험의 접종균으로 사용하였으며 다른 2두는 대조로 관찰하였다. 이때 사용한 기니피은 항생제 노출을 방지하기 위해 접종 4일전부터 양배추로 사육하면서 공시하였다.

실험동물 : 몸무게 140~150g의 건강한 햄스타 17두중 14두는 기니피 5계대를 통해 병원성을 획득한 *L. canicola*를 *Leptospira counting technique*으로 0.2% 포르마린에 10배 희석하여 균수를 Petroff-Hauser chamber 로 측정 한 뒤 각각 1ml 씩 복강내로 균수가 *L. canicola* 2×10^7 /ml 되게 주사한 후 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 120시간 및 144시간제에 1-3 두씩 부검하여 시료를 채취하였고, 나머지 3 두는 대조균으로 관찰하였다.

병리학적 검사 : 감염햄스타는 도살하여 병리해부학적 검사를 실시한 후 10% 중성포르마린에 12~24시간 고정시킨 뒤 용해점 56℃인 parplast 에 포매하여 3~6 μ m 두께로 연속절편하였으며, 렙토스피라균체 증명을 위해 Warthin-Faulkner 도 염색을 실시함과 동시에 hematoxylin & eosin (H & E)염색을 병행하여 조직학적 변화상을 관찰하였다.

면역학적 검사 : 인공감염 햄스타의 간과 신장조직의 연속절편을 먼저 탈파라핀하여 Tris-buffer saline(TBS; pH 7.6)에 수세후 3% 과산화수소 증류수 용액에 5분간 3회에 걸쳐 수세한 뒤 비특이 배경염색을 줄이기 위해 1:5로 희석한 정장 산양혈청(Dakopatts)으로 20분간 전처리 하였다.

1차 항체는 수의과학연구소로 부터 분양받은 토끼 항 *L. canicola* 혈청을 TBS로 1:300~1:800으로 희석하여 60분간 반응시킨 후 5분간 3회 수세하였다. 그리고

2차항체로서 항토키 IgG (Vector Lab)를 TBS로 1:100~1:160으로 희석하여 30분간 반응시킨 후 5분간 3회 수세하였다. 이어서 3차항체로서 토키 PAP complex 를 TBS 로 1:300~1:500배로 희석하여 30분간 반응시킨 다음 5분간 3회 수세후, 0.5% 과산화수소 TBS (0.05M/L, pH 7.6)용액에 0.005% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Difco)를 희석하여 5~15분간 발색시켰으며, 이때 광학현미경으로 관찰하면서 적당한 발색정도를 선택하여 슬라이드를 증류수에 수세하였고, 일부는 hematoxylin 으로 대조염색하여 마운팅하였다. 면역염색은 실온에서 수분증발을 막기 위해서 wet chamber 내에서 반응시켰고, 대조로서 건강 햄스타조직을 면역염색한 것과 1차항체 대신 TBS 로 반응시킨 감염 햄스타조직을 서로 비교관찰하였다.

결 과

병리학적 소견 : 임상증상으로 식욕결핍, 체중감소 및 체온상승 등을 나타내었고, 육안적으로 감염 24시간째에는 특이소견을 관찰할 수 없었으나 48시간째 부터 폐에서 점상출혈이 관찰되기 시작하여 72시간째 부터는 폐의 출혈정도가 더욱 심하였고 간의 울혈과 신장의 종대가 동시에 관찰되었다. 감염 96시간째는 이러한 소견들이 더욱 심해지는 경향을 보이다가 감염 120시간째 부터는 신장과 주위 지방조직에서 출혈이 관찰되었으며 복벽근육, 소장 및 대장에서도 출혈이 인정되었다. 감염 144시간째, 남은 햄스타 모두 폐사하였고 폐와 신장을 비롯한 모든 실질장기에서 심한 출혈을 관찰할 수 있었으며 복벽과 신장주위의 지방조직에서도 출혈이 심하였다.

병리조직학적 소견 : 폐에서는 시간이 지남에 따라 폐포중격에 산호성백혈구와 중성호성백혈구 등 염증세포 침윤을 관찰할 수 있었고, 폐포중격이 비후되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 시간이 경과함에 따라 출혈의 정도가 심하였으며 림프구, 형질세포 등의 염증세포 침윤을 관찰할 수 있었다.

간에서는 총, 출혈과 한국성 간세포괴사가 있었고, 문맥주위와 중심정맥주위에 중성호성백혈구, 형질세포, 림프구 등과 같은 염증세포 침윤이 현저하였으며 (Fig 1), 혈관 내피세포의 비후도 관찰되었다.

신장에서는 곡세뇨관, 사구체, 간질조직 등 신조직 전반에 걸쳐 심한 출혈을 볼 수 있었고, 간질조직에서 중성호성백혈구, 림프구, 산호성백혈구, 형질세포 등의 한국성 염증세포 침윤을 볼 수 있었다. 그중에서도 특히 소동맥 및 정맥주위에서 현저했다. 곡세뇨관상피세포에서는 변성, 핵농축 및 핵소실 등 괴사가 심하게 관찰되었고 세뇨관상피세포의 세포질내에 초자적, 관강내의 초자원주가 보였으며 상피세포내 공포변성도 관찰되었다. 그리고 세뇨관관강내에 적혈구와 초자물질이 존재 (Fig 2)하는 것으로 보아 혈뇨와 단백뇨가 있음을 알 수 있었다.

도은염색 검사 : 간과 신장조직내에서 균체의 존재와 분포상태를 관찰하기 위하여 도은염색을 실시한 결과 감염 96시간째 부터 균체가 관찰되기 시작하였으며 (Table 1), 144시간째에는 나선형의 흑색 랩토스피라균체를 더욱 쉽게 확인할 수 있었다. 특히 균체들은 신피질부의 간질에서 많이 출현하였다 (Fig 3). 아울러 세뇨관상피세포내에서도 균체를 관찰할 수 있었고 사구체내에서는 사구체낭과 혈관내피세포에서 균체를 확인할 수 있었다 (Fig 4).

간조직에서도 동양혈관을 따라 나선상의 균체를 다수 관찰할 수 있었다 (Fig 5).

면역조직학적 소견 : 파라핀절편에서 균체항원을 검출하기 위해 PAP 면역염색을 실시한 결과 도은염색의 균체증명시간 보다 48시간 빠른 감염 48시간째부터 햄스타의 간과 신장조직내에서 갈색색소의 침착을 보이는 특이적인 랩토스피라균체항원 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Table 1).

감염 72, 96시간째에는 신장의 간질내에서 갈색으로 침착되는 항원 양성반응을 관찰할 수 있었다. 아울러 감염 120시간째에는 간질조직 뿐만아니라 세뇨관상피세포내에서도 양성반응을 볼 수 있었으며 (Fig 6), 감염 144시간째에는 간질조직 세뇨관상피세포 및 사구체내에서도 갈색색소 침착의 균체항원 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig 7).

간조직에서도 감염 48시간째에 부터 균체항원 양성반응을 관찰할 수 있었으며 시간이 경과함에 따라 동양혈관을 중심으로 양성반응이 더욱 현저하게 나타나는 것을 볼 수 있었다 (Fig 8).

그리고 본 실험의 면역염색에서 관찰된 균체항원 양

Table 1. Detection of leptospira canicola in the tissues and blood smears of experimentally infected hamsters

Specimen	Method	Detection time after inoculation (hr)					
		24	48	72	96	120	144
Liver	PAP*	—	+	+	+	+	+
	Silver stain**	—	—	—	+	+	+
	Culture***	—	—	—	+	+	+
Kidney	PAP	—	+	+	+	+	+
	Silver stain	—	—	—	+	+	+
Blood	Darkfield microscopy	—	—	—	+	+	+

* : Peroxidase-antiperoxidase method

** : Warthin-Faulkner method

*** : Cultural isolation in EMJH Broth

성반응부위가 동일조직의 연속절편에서 얻은 도은염색의 균체준재부위와 서로 일치하였으며, 반면에 모든 예의 대조군에서는 양성반응을 볼 수 없었다.

세균학적검사 : 감염 24시간째와 감염 48시간째에 채취한 혈액을 암시아현미경으로 렙토스피라를 관찰한 결과 균체를 증명할 수 없었다. 그러나 96시간째 부터 나선형의 렙토스피라균을 관찰할 수 있었으며(table), EMJH Broth 내 간조직배양검사 역시, 96시간째 부터 렙토스피라균을 볼 수 있었다.

고 찰

렙토스피라병의 실험실진단은 일반적으로 암시아현미경관찰이나 원인균 분리배양 또는 혈청학적 방법에 의존을 하고 있다. 그중에서 암시아현미경을 통한 렙토스피라균 관찰은 운동성이 좋은 균체를 필요로 할 뿐만아니라 다른 나선균과의 형태학적인 감별이 쉽지 않다. 그리고 배양에 의한 원인균 분리동정은 시일이 많이 걸리며 채취한 시료가 신선한 상태로 보존되어야만 좋은 결과를 기대할 수 있다. 또한 Microscopic agglutination test(MAT)는 렙토스피라병의 혈청학적 진단에 있어 기본이 되는 진단법이지만, 여러 혈청형이 존재하기 때문에 진단에 사용하는 혈청형의 선택이 쉽지 않고 살아있는 균체를 사용함으로써 실험자의 감염 우려를 생각하지 않을 수 없다. 포르말린고정 파라핀 조직절편에서의 균체항원동정은 이 질병이 인수공통 전염병이라는 점을 감안할 때 세균학적 진단과정에서

있을 수 있는 실험자의 감염우려를 배제함과 동시에 시간을 절약할 수 있으며 항원검출부 및 주위에 출현하는 세포의 형태학적 변화를 동시에 관찰할 수 있다. 그리고 파라핀포매조직은 장기간 보존이 가능하여 언제든지 실험에 사용할 수 있는 장점들이 있어^{14,22}, 면역조직화학적 방법은 분리동정이 까다로운 세균이나 바이러스성 질병의 진단법으로 최근 활발히 개발되고 있다.^{14,16,22-27}

Norman 등²⁸이 햄스타 복강내에 *L pomona*를 접종한 후 간조직변성과 동양혈관내 균체증명을 시사하였고, 이것은 본 실험의 결과와 동일함을 보여 주고 있다²⁹. Ellis와 Robertson은¹⁶ 렙토스피라병 자연발생 돼지의 신장조직을 배양, 도은염색, indirect immunoperoxidase(IP)법으로 균체 항원동정을 시도한 결과, 조직배양과 도은염색에는 균체가 검출되지 않은 아급성 간질성신염에서도 IP 법에서는 검출됨을 보여주었다. 그 이후 Scanziani와 Sironi 등⁴이 자연감염되어 만성으로 진행된 돼지의 신장조직에서 도은염색과 Avidin-Biotin peroxidase complex 법을 비교하여 실험한 결과 도은염색에서는 신장세관내에 나타나는 균체에만 검출된 것에 반해 면역염색에는 세포내의 렙토스피라항원과 대식세포내에 탐식된 렙토스피라항원까지 갈색의 양성으로 보여 면역염색의 특이성을 증명하였다. 그후 Scanziani 와 Luini 등⁴은 자연감염된 돼지의 신장조직을 세균학적 진단법과 면역조직학적 진단법을 비교실험한 결과 세균학적 진단과정에서 나타나는 여러가지 단점들 대신에 면역조직학적 진단법의 특이성, 감수성 및 조기진단 등의 장점을 설명하였다.

본 실험에서는 PAP 법을 통한 감염 햄스타조직에서

세균학적 진단과 도염색결과에서 균체가 동정되지 않았던 감염 48시간째 균체동정이 가능하였다. 또한 다른 논문에서는 보고되지 않은^{10,30,31} 사구체의 혈관내 피세포와 사구체낭에서 *L. canicola* 를 관찰할 수 있었다. 즉, 이것은 균주에 따른 병원성의 차이점과 접종량에 관계되는 것으로 향후 균주 및 균점종량과의 관계를 보다 체계적으로 검토할 필요를 보여 준다.

본 실험에서는 1차항체의 희석배수를 300, 500, 800배로 각각 희석하여 반응시킨 결과, 면역혈청의 500배 희석배율에서 양성반응이 뚜렷하게 관찰되었지만 300배 이하에서와 800배 이상에서는 비특이 반응이 많이 나타나 좋은 실험결과를 얻을 수 없었다. 이러한 것으로 미루어 볼 때 1차항체의 희석배수가 실험결과에 있어 중요한 요소로 작용함을 알 수 있었다. 그리고 내인성 비특이 peroxidase 반응을 줄이기 위해 3% 과산화수소 TBS 용액으로 처리한 결과 비특이 반응을 줄일 수 있었고 TBS로 여러차례 수세함으로써 더욱 비특이 반응을 줄일 수 있었다. PAP 면역염색의 결과에서 비특이 반응을 최대한 줄여 뚜렷한 양성반응을 얻는 것이 실험의 목적이라 할 때 앞으로 비특이 반응을 최소화하는 부분에 좋은 실험결과들이 나와야 될 것이다.

렙토스피라병은 인수공통전염병으로 다양한 임상증상들을 나타낸다. 그중 가장 특징적인 부검소견은 출혈로서 폐외에 간, 신장 및 대부분의 신체조직에서 광범위하게 관찰되는데 특히 폐에서는 감염된 후 48시간 이내에 이미 점상출혈이 보이며 감염시간이 경과함에 따라 출혈의 정도가 급격심화됨을 알 수 있었다.

이와 관련하여 이 등³²은 현미경적 소견이 본 연구결과와 유사하게 출혈과 함께 혈관염을 동반하는 염증반응으로 비교적 감염초기에 형질세포의 침윤이 있음을 지적하였다.

렙토스피라병에서 주로 관찰되는 심한 출혈의 발생 기전에 대해서는 대체로 혈관벽의 손상이 주 원인이 되는 것으로 믿어지고 있으나 혈관벽손상의 발생기전에 대해서는 아직까지 정립된 이론이 없는 형편이다⁶.¹⁰. Arcan 등³³은 간 또는 신장 추출물에서 출혈을 유발시키는 물질을 관찰하고 이 물질이 체외독소로서 혈관벽손상에 중요한 역할을 할 것으로 보고한 바가 있다. 또한 장 등³은 점종부위에서 심한 출혈이 나타나는 렙토스피라병 초기의 출혈현상이 균의 직접독성작용과 깊은 관계가 있음을 강조하였지만 본 실험결과, 복강

주사부위에서 출혈소견을 관찰할 수 없었다. 그리고 Warthin-Faulkner method 와 PAP method 를 통해 간조직에서 다량의 균체가 확인되에도 불구하고 동양혈관내와 간세포 주위에 출혈의 정도가 그리 심하지 않았다. 따라서 이상의 결과들로 보아 *L. canicola* 직접독성에 의한 것이라기 보다는 렙토스피라가 생산하는 체외독소가 출혈에 중요한 요소로 작용할 것이라 여겨진다.

*L. icterohemorrhage*는 간에서 심한 병원성을 나타내는 반면 *L. canicola*는 신장에 심한 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{7,11}. 사람을 포함해서 대부분의 동물들이 *L. interrogans*에 감염된 경우 급성경과를 보이며 대부분의 장기에 감염이 일어나는데 그중에서도 신장조직에서의 병변이 가장 특징적이다.

급성 렙토스피라병 기간동안 *L. canicola* 항원은 종종 신장조직의 근위 및 원위극세뇨관 상피세포내에서 나타나는데 대부분은 간질조직에 가장 많은 농도로 존재한다^{7,15,35}. 일반적으로 점종한지 7일동안에 폐사하지 않고 남은 동물은 만성으로 진행되다가 회복되어 가면서 세뇨관 관강내에 존재하는 균체가 뇨로 배출된다¹¹.³⁰. 본 실험은 감염 6일째 모두 폐사하였으므로 급성 렙토스피라병을 일으켜 간질조직부위에 렙토스피라균체가 나타나는 전형적인 간질성 신염을 보여주었다.

분리균들은 인공배지에서의 계대배양이 매우 까다롭고 계대배양시 급격히 그 병원성을 잃게 됨으로 병원성 유지를 위해서는 기니픽계대를 유지하는 것이 바람직하다^{1,35}.

렙토스피라병은 혈청형의 type에 따른 질병양상의 차이점이 있으므로 혈청형에 따른 진단이 요구된다. 만약 단크론성 항체를 사용하면 PAP 면역염색을 통해 혈청형에 따른 감별진단이 가능하기 때문에 진단과 치료에 더욱 좋은 결과를 기대할 수 있을 것이다.

결 론

조직절편내에서 *L. canicola* 균체항원을 동정함으로써 신속하게 확진할 수 있는 면역조직화학적 진단법을 개발하기 위하여 렙토스피라 배양균액(Hond Utrecht IV strain)을 복강점종한 인공감염 햄스타의 간과 신장조직에 대하여 Peroxidase-antiperoxidase 법을 적용하였으며, 일반적인 방법에 따라 파라핀 절편을 제작하여 1차항체로서 토끼항 *L. canicola* 혈청으로 반응시킨 다

음 항토끼 IgG와 PAP complex 로 각각 처리하였다.

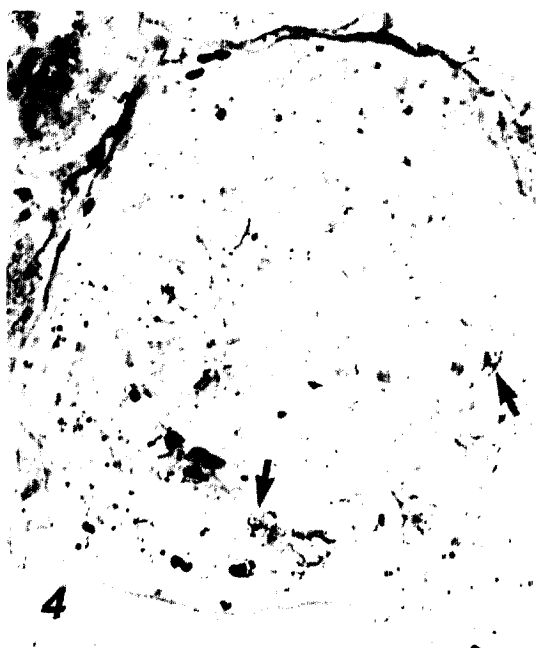
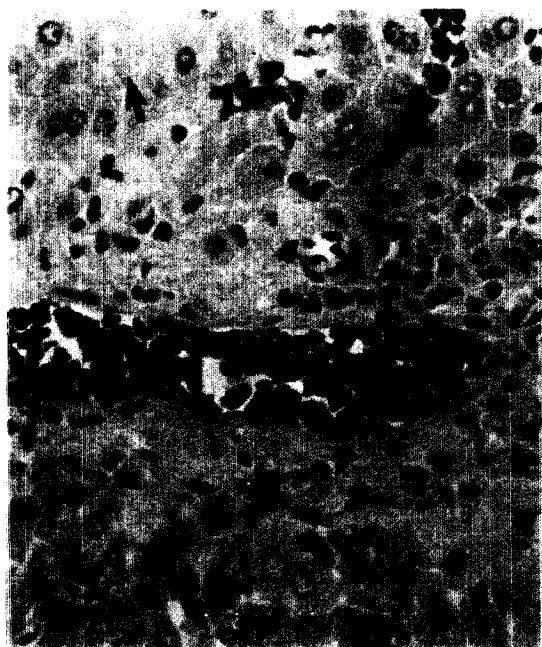
면역염색에서 신장의 간질조직, 세뇨관상피세포 및 사구체 그리고 간의 동양혈관내에서 특이적인 균체항원 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 항원검출부위는 도은염색의 균체 증명부위와 일치하였다. Peroxidase-antiperoxidase 면역염색에서는 감염 48시간째에 양성

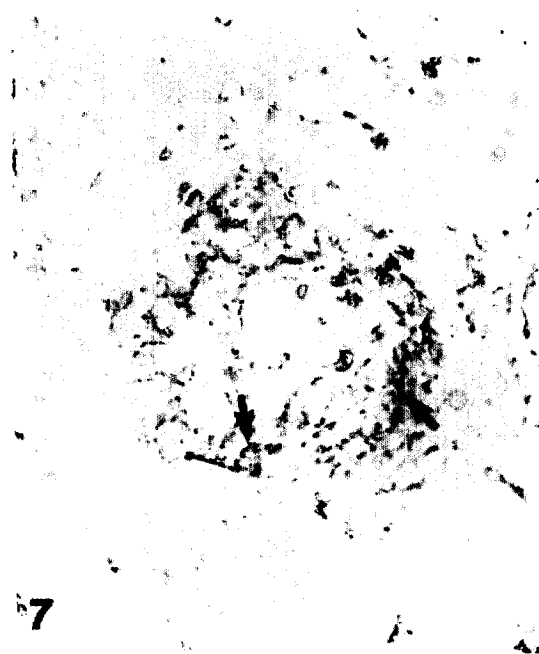
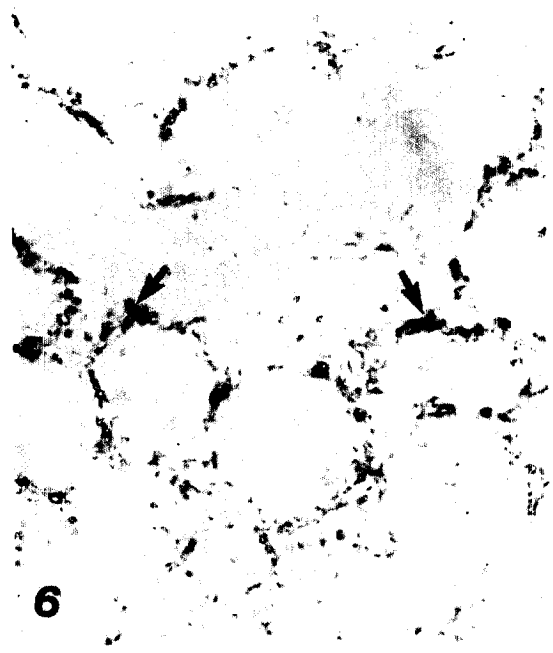
반응이 확인되었고 혈액도말, 간조직배양, 도은염색에서 이러한 결과보다 48시간이 늦은 96시간째 부터 균체가 증명되기 시작하였다.

이상의 결과에서 면역조직화학적 방법은 렙토스피라병을 조기에 신속하게 확진할 수 있는 진단법으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Legends for figures

1. Focal necrosis (arrows) is seen and a vein shows focal perivascular infiltration of inflammatory cells (arrows) in the liver, 144 hours after infection. hematoxylin & eosin, $\times 400$.
2. Severe hemorrhage (arrows) and infiltration of inflammatory cells (arrows) in the kidney, 144 hours after infection. hematoxylin & eosin, $\times 400$.
3. Warthin-Faulkner silver staining of the kidney, 144 hours after infection. Spirochetal leptospire (arrows) in the interstitium. $\times 400$.
4. Silver staining of the kidney, 144 hours after infection. Spirochetal leptospire (arrows) in the glomerulus. $\times 400$.
5. Silver staining of the liver, 144 hours after infection. Numerous leptospire shows (arrows) in the sinusoid. $\times 400$.
6. Peroxidase-antiperoxidase(PAP)-stained paraffin section of the kidney, 120 hours after infection. Strong positive reactions (arrows) for *Leptospira canicola* antigens in the interstitium. $\times 400$.
7. PAP-stained paraffin section of the kidney, 144 hours after infection. Strong positive reactions (arrows) for *Leptospira canicola* antigens in the glomerulus. $\times 400$.
8. PAP-stained paraffin section of the liver, 144 hours after infection. hematoxylin counterstain. Positive reaction (arrows) in the sinusoid. $\times 400$.





참 고 문 헌

1. 박경석, 오회복, 이명숙 등. 한국에서 분리된 렙토스피라균의 생물학적 특성에 대한 연구. 대한미생물학회지, 21(3):331~336, 1985.
2. Inada Ryokichi. The Etiology, mode of infection, and specific therapy of well's disease (spirochetosis icterohemorrhagica). *J Exp Med*, 23:377~409, 1919.
3. 장우현, 김익상, 이우곤 등. 실험적으로 기니피에 유발시킨 렙토스피라병에 대한 미생물학적 및 병리학적 연구. 대한미생물학회지, 21 : 211~227, 1986.
4. 김주덕, 이태윤, 이원영, 등. 유행성 출혈열 폐염양 질환의 병원체에 관한 연구. 대한미생물학회지, 21:191~204, 1986.
5. Auran, NE, Johnson RC and Ritzi DM. Isolation of the outer sheath of leptospira and its immunogenic properties in hamsters. *Infection and Immunity*, 5 : 968~975, 1972.
6. Decker, M. J. Evaluation of mechanisms of leptospiral hemolytic anemia. *Am J Vet Res*, 31 : 873~879, 1970.
7. Imbabi, S. E. Experimental leptospirosis : *Leptospira canicola* infection in calves. *Am J Vet Res*, 28 : 413~419, 1967.
8. 정석찬, 김종만, 박정문 등. 동물에서 분리된 *Leptospira* 균의 생화학적 성상에 관한 연구. 농시논문집, 33 : 1~10, 1991.
9. 이원영, 이봉기, 김주덕 등. 폐염양 출혈열 환자로 부터 분리된 *Leptospira*의 세균학적 특성과 병인론적 증명. 한국역학회지, 6 : 36~46, 1984.
10. Cheville NF, Huhn R, Cutlip RC, et al. Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute leptospirosis caused by *Leptospira pomona*. *Vet Pathol*, 17 : 338~351, 1980.
11. Jubb KVF, Peter C, Kennedy, et al. Leptospirosis. Pathology of domestic animals. 3 : 144~149, 1985.
12. Roha T, Perestrelo R, Vieira. Experimental infection of pregnant gilts with *Leptospira interrogans serovar mozdok*. *Vet Rec*, 131 : 197~199, 1991.
13. Thiermann AB. Canine leptospirosis in detroit. *Am J Vet Res*, 41(10) : 1659~1661, 1980.
14. Scanziani E. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res Vet Sci*, 50 : 229~232, 1991.
15. Champagne MJ. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can J Vet Rec*, 55 : 239~245, 1990.
16. Ellis TM. Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aus Vet J*, 60(12):364~367, 1983.
17. 조민기, 민창홍, 김운원 등 강원도 일부지역의 렙토스피라 감염에 관한 혈청학적 연구. 대한미생물학회지, 21 : 205~210, 1986.
18. Delellis, Ronald A. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol*, 71 : 483~488, 1979.
19. Heyderman Eadie. Immunoperoxidase technique in histopathology : applications, methods, and controls. *J Clin Pathol J*, 33 : 971~978, 1979.
20. Taylor. Immunoperoxidase techniques. *Arch Pathol Lab Med*, 102:113~120, 1978.
21. Sternberger LA. The unlabeled antibody enzyme-method of immunohistochemistry : preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*, 18 : 315~333.
22. 김순복, 서정향, 문운경. Avidin-biotin complex for diagnosis of aujeszky's and hog cholera. 대한수의학회지, 30 : 435~440, 1990.
23. 문운경, 조희택, 김순복. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 복합체법을 이용한 돼지콜레라의 면역조직화학적 진단. 대한수의학회지, 30(2) : 215~221, 1990.
24. 노환국, 서정향, 김순복. Indirect immunoperoxidase 법을 이용한 조직내 뉴캐슬병 바이러스 항원동정. 대한수의학회지, 30, 1990.
25. 서정향, 김순복. Dexamethasone 전처리후 *Listeria monocytogenes*를 인공감염시킨 랫드의 조직절편

- 내 균체항원 동정. 대한수의학회지, 32 : 91~98, 1992.
26. Scaziani EG, Sironi G, Mandelli. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. *Vet Pathol*, 26 : 442~444, 1989.
 27. Thompson, Janice CBW, Manktelow. Pathogenesis renal lesion in haemoglobinaemic and non-haemoglobinaemic leptospirosis. *J Comp Pathol*, 101 : 201~214, 1989.
 28. Miller Norman G, Richard B Wilson.. Electron microscopic of the liver of the hamster during acute and chronic leptospirosis. *Am J Vet Res*, 27 : 1071~1081, 1966.
 29. Bishop, L Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospire. *Am J Vet Res*, 40:839~844, 1979.
 30. Miller Norman G, Richard B. Wilson. Electron microscopic study of the relationship of *Leptospira pomona* to the renal mtuble of the hamster during acute and chronic leptospirosis. *Am J Vet Res*, 28 : 225~235, 1967.
 31. Sterling CR, Thiermann AB. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet Pathol*, 18 : 628~637, 1981.
 32. 이정상, 김성권, 윤성철 등. 한국에서 미생물학적으로 확인된 렙토스피라병의 부검례. 대한의학회지, 28(4) : 373~380, 1985.
 33. Arean Victor M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease), 40 : 393~423, 1962.
 34. Baker. The prevalence of leptospirosis and its association withmultifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. *Can J Vet Res*, 53 : 290~294, 1989.
 35. Hamdy AH. Virulence of *Leptospira pomona* in hamsters and cattle, *Am J Vet Res*, 35~43, 1957.
-