

생물테러대비 실험실 대응사업

- 탄저 등 생물테러 발생 가능성에 대비한 능동적인 실험실 대응 능력 함양
- 탄저균 감시사업의 일환으로 부산지역 토양 중 탄저균 서식 실태 파악
- 생물테러 의심병원체 검사 능력 보유로 국가적 실험실 감시망 구축

1. 조사개요

- 근거
2017년 생물테러대비 지자체보조사업 관련 『생물테러대비 실험실네트워크운영 사업계획』
 - 질병관리본부 생물테러대응과-127(2017. 1. 26.)호
 - 미생물팀-307(2017. 1. 31.)호
- 사업 배경
 - 생물테러 위기상황 발생 시 생물테러 의심 검체 및 병원체에 대한 신속·정확한 대응을 통한 국민의 생명 피해를 최소화
 - 관내 우사주변 토양 탄저균 모니터링 및 주요 행사장 생물테러 병원체 감시와 정도평가를 통한 진단 능력 강화로 생물테러 조기인지 체계 유지
- 사업 기간: 2017. 4. ~ 2017. 11.(생물테러 의심 검체 처리는 연중 실시)
- 사업 내용
 - 관내 우사주변 토양 검체 대상 탄저균 모니터링 검사
 - 주요 행사장 생물테러병원체 살포감시
 - 고위험병원체 정도평가 수행
 - 생물테러 의심상황 발생 시 안전한 검체 처리 및 신속·정확한 검사(년 중)

2. 조사방법

- 조사 대상
 - 토양 검체 대상 탄저균 모니터링 검사 : 우사주변 토양 채취
 - 주요 행사장 등 생물테러병원체 살포감시 : 행사장 주위 공기 포집
 - 생물테러 의심신고 발생 시 원인물질 확인 : 신고발생장소에서 수거된 검체
- 조사 항목
 - 토양 검체 대상 탄저균 모니터링 검사 : Bacillus anthracis (탄저균)
 - 주요 행사장 병원체 살포감시 및 생물테러 의심신고 발생시 : B. anthracis(탄저균), Y. pestis (페스트), F. tularensis(야토균), smallpox(두창), Melioidosis(유비저균), 블루셀라균

○ 시험 방법 : 고위험병원체 실험실 진단지침(질병관리본부)

- 토양 검체 대상 탄저균 모니터링 검사

• 검체처리

- : 지표면으로부터 5cm~10cm 깊이, 약간씩 떨어진 5곳의 토양을 모아 건당 100g 정도 채취
- : 채취된 토양 약 10g을 50mL cornical centrifuge tube에 넣고 멸균DW 30mL에 부유 ⇒ shaking(overnight) at 4℃
- : 열처리(70℃, 30min) : 영양세포 비활성화
- : 깔때기에 2겹의 거즈를 올려놓고 검체를 여과 ⇒ 3,000rpm, 15분간 원심분리

• 배양 및 동정검사

- : 상층액을 버린 후 멸균수 2 mL을 가하여 검체 부유
- : 검체를 원액, 10-2, 10-3, 10-4 희석하여 0.1mL씩 Blood agar plate에 접종
- : 35℃에서 24시간 배양: 비용혈성, 불규칙한 가장자리를 갖는 2~5mm의 콤마형태 집락(comma shape colony), 상단은 메두사 머리(medusa-head) 형태를 갖는 전형적인 집락 관찰
- : 의심스러운 집락은 그람.포자 염색, 생화학적 검사(API20E kit) 및 분자생물학적 검사(Real-time PCR)를 실시하여 탄저균 동정

- 주요 행사장 주변 생물테러병원체 살포감시(세균배양법)

• 검체채취(공기포집)

- : MAS 100 Air sampler(Merck) 이용
- : 공기포집량 : 500 L(5분간 흡입)
- : 사용배지 : Blood agar, CIN agar, Chocolate agar 각 5장

• 배양

- : Blood agar : 35℃, 24시간 / CIN : 25℃, 72시간 / Chocolate agar : 35℃, 48시간
- : 의심 colony 감별테스트 실시 (표1)

표 1. 병원체 감별법

		탄저균	야토균	페스트
감 별 테 스 트	oxidase	+	-	-
	catalase	+	+ (약)	+
	ureas	+	-	-
	그 외	감마파아지 +	XV(-), b-lactamase(+), 진단혈청	
생화학테스트		API 50CH + API 20E	Vitek NH(Actinobasillus~99%)	API 20E(48시간 배양)
염색		Gram(+)	Gram(-) (염색잘안됨/ 작음)	Gram(-)
		Malachite green(포자)		Wright-Giemsa(양극단)

- 국제행사장 등 생물테러병원체 살포감시 및 생물테러의심 신고 발생시(유전자 검사법)
 - 검체채취(공기포집)
 - : Sartorius Airport (MD8) 이용
 - : 공기포집량 : 1000 L(20분간 흡입)
 - : 사용배지 : 수용성의 Gelatin membrane filter 각 5장
 - 검체처리
 - : gelatin-filter를 8등분 한다
 - : Filter 중 1/8조각을 15mL conical tube에 넣고 PBS 1mL 첨가
 - : 15mL tube를 vortex후 37℃수조에서 30분간 정치(10분마다 vortex)
 - : 5,800rpm에서 5분 원심분리 후 상층액에서 DNA추출
- 유전자 검사(토양에서 의심colony 검출 시 및 국제행사장 등 공기)
 - Real-time PCR을 이용한 원인병원체 유전자 검출
 - : 사용시약 : QIAmp® DNA blood Mini Kit(QIAGEN)를 사용하여 DNA 추출, Bioterrorism agent real-time PCR kit(JSB) 사용하여 병원체 확인(PCR 증폭조성물 Total Volume : Template DNA 2μl, Nuclease-Free Water 8μl, 2× Real-time PCR premix 10 μl)
 - : 사용장비 : Real Time PCR(7500 Fast, ABI)
 - : PCR 조건 : Pre-denaturation 95℃, 5분간 1 cycle / Denaturation 95℃ 15초, Annealing 과 Extension 55℃ 45초를 40 cycle 반복함. 결과는 CT값을 기준으로 32 cycle 이하일 경우 양성, 33 cycle 이상일 경우 음성으로 판정

3. 조사결과

○ 토양 검체 대상 탄저균 실험실 감시로 총 120건을 검사하였으며 모두 불검출이었다 (표2)

표 2. 토양 중 탄저균 실험실 감시결과

월 별	검체건수	검사결과	비고
4월	15	음성	○ 탄저균 조사 채취지점 선정(3개) - 강서A지점: 강서구 울만로(대저동) - 금정A지점: 금정구 땅곡길(금성동) - 기장A지점: 기장군 철마면 안평로 ○ 지점 당 5건 토양채취
5월	15	음성	
6월	15	음성	
7월	15	음성	
8월	15	음성	
9월	15	음성	
10월	15	음성	
11월	15	음성	

○ 주요 행사장 등 병원체 살포감시 결과 총 25건을 검사하였으며 모두 불검출 (표3).

표 3. 주요 행사장 등 병원체 살포 감시 결과

행 사 명	채집일	검체 채취 장소	검사대상 병원체	검체 건수	검사 결과
2017 부산국제기계대전	2017. 5. 24.	백스코	탄저균 야토균 페스트 두창 유비저균 브루셀라	공기포집 5건	음성
2017 부산국제광고제	2017. 8. 24.	백스코		공기포집 5건	음성
2017 부산국제영화제	2017. 10. 12.	영화의 전당		공기포집 5건	음성
2017 부산국제음식박람회	2017. 10. 12.	백스코		공기포집 5건	음성
8부두 미군부두 인근	2017. 10. 12.	8부두		공기포집 5건	음성

○ 생물테러 의심신고는 2회 총 3건 검사하였으며 모두 불검출 (표4).

표 4. 생물테러 의심신고 검사 결과

신고명	의뢰일	검체 채취 장소	검사대상 병원체	검체 건수	검사 결과
부산 사하구 대티역 백색가루	2017. 1. 31.	도시철도 1호선 대티역	탄저균 야토균 페스트 두창 유비저균 브루셀라	백색가루 2건	음성
울산 중구 학성공원 백색가루	2017. 6. 5.	울산 중구 학성공원		백색가루 1건	음성

○ 2017년 고위험병원체 정도평가 수행 [고위험병원체분석과-367(2017. 9. 15.)]

- 목적 : 유사시 효과적인 대응을 위한 고위험병원체 시험검사 점검
- 검체 : 환경검체 3건(면봉 3), 균분리동정 5건(균주)
- 시험방법 : Real-time PCR 및 균분리 동정을 이용한 고위험병원체 확인검사
- 평가결과 : 최고의 등급 인 최상등급

4. 기대 효과

- 생물테러 가능병원체의 진단 프로토콜 숙지 및 진단능력 향상
- 생물테러 의심 상황 발생 시 신속한 실험실 대응체계 유지
- 부산에서 개최되는 주요 행사 시 행사장 주변 병원체 감시를 통한 생물테러 조기 인지