

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
2016년 생물테러대비 지자체보조사사업 관련 『생물테러대비 실험실 대응사업 사업계획』
 - 질병관리본부 생물테러대응과-62(2016. 1. 15.)호
 - 미생물팀-146(2016. 1. 19.)호
- 사업 배경
 - 생물테러 위기상황 발생 시 생물테러 의심 검체 및 병원체에 대한 신속정확한 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 : 2016. 4. ~ 2016. 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 생물테러병원체 살포감시 : 행사장 주위 공기 포집
- 조사 항목
 - 토양 검체 대상 탄저균 모니터링 검사 : *Bacillus anthracis* (탄저균)
 - 주요 행사장 병원체 살포감시 : *B. anthracis*(탄저균), *F. tularensis*(야토균), *Y. pestis* (페스트)
- 시험 방법 : 고위험병원체 실험실 진단지침(질병관리본부)
 - 토양 검체 대상 탄저균 모니터링 검사

- 검체처리
 - : 지표면으로부터 5 cm ~ 10 cm 깊이, 약간씩 떨어진 5곳의 토양을 모아 건당 100 g 정도 채취
 - : 채취된 토양 약 10 g을 50 mL conical centrifuge tube에 넣고 멸균 DW 30 mL에 부유 ⇒ shaking(overnight) at 4°C
 - : 열처리(70°C, 30min) : 영양세포 비활성화
 - : 깔때기에 2겹의 거즈를 올려놓고 검체를 여과 ⇒ 3,000 rpm, 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°C에서 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
 - 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°C, 24시간 / CIN : 25°C, 72시간 / Chocolate agar : 35°C, 48시간
 - : 의심 colony 감별테스트 실시 (표 1)

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 NHI(Actinobasillus~99%)	API 20E(48시간 배양)
염색		Gram(+)	Gram(-) (염색잘안됨/ 작음)	Gram(-)
		Malachite green (포자)		Wright-Giemsa (양극단)

- 유전자 검사(토양 및 공기포집에서 의심colony 검출 시)
 - 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 2 μ l, Nuclease-Free Water 8 μ l, 2 \times Real-time PCR premix 10 μ l)
 - : 사용장비 : Real Time PCR(7500 Fast, ABI)
 - : PCR 조건 : Pre-denaturation 95 $^{\circ}$ C, 5분간 1 cycle / Denaturation 95 $^{\circ}$ C 15초, Annealing 과 Extension 55 $^{\circ}$ C 45초를 40 cycle 반복함. 결과는 CT값을 기준으로 32cycle 이하일 경우 양성, 33 cycle 이상일 경우 음성으로 판정

3. 조사결과

- 토양 검체 대상 탄저균 실험실 감시로 총 120건을 검사하였으며 모두 불검출이었다 (표 2)

표 2. 토양 중 탄저균 실험실 감시결과

월 별	검체건수	검사결과	비 고
4월	15	음성	○ 탄저균 조사 채취지점 선정(3개) - 탄1 : 강서구 대저1동 - 탄2 : 금정구 금성동 죽전2길 - 탄3 : 기장군 철마면 이곡리 ○ 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 병원체 살포감시 결과 총 20건을 검사하였으며 모두 불검출 (표 3).

표 3. 주요 행사장 병원체 살포 감시결과

행 사 명	채집일	검체 채취 장소	검사대상 병원체	검체 건수	검사 결과
2016 국제의료관광컨벤션	2016. 9. 7.	백스코	탄저균 야토균 페스트	공기포집 5건	음성
제5회 부산 MICE 페스티벌	2016. 9. 26.	백스코		공기포집 5건	음성
제21회 부산국제영화제	2016. 10. 12.	영화의 전당		공기포집 5건	음성
2016 부산국제신발·섬유 패션전시회	2016. 11. 4.	백스코		공기포집 5건	음성

- 2016년 고위험병원체 정도평가 수행 [병원체방어연구과-1608(2016. 9. 28.)]
 - 목적 : 유사시 효과적인 대응을 위한 고위험병원체 시험검사 점검
 - 검체 : 3건(전혈 1, 면봉 2)
 - 시험방법 : Real-time PCR을 이용한 고위험병원체 확인검사
 - 평가결과 : 최상

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