

GOVP 19908985

탄저방제요령

A manual of Control & Prevention of Anthrax

국립수위과학검역원 세균과

농림부



목 차

I. 서 언	3
II. 병인론	5
1. 형태	5
2. 배양 및 생화학적 특성	6
3. 생태학적 특성	7
4. 저항력	7
5. 항원구조	9
6. 면역학적 특성	10
7. 변이성	12
8. 탄저균의 plasmid 와 병원성 인자	13
9. 병원성	14
III. 발생역학	17
1. 발생	17
2. 역학	21
IV. 임상증상 및 병리소견	24
1. 임상증상	24
2. 병리소견	28

V. 진단 및 치료	31
1. 임상학적 진단	31
2. 실험실 검사	32
3. 치료	47
VI. 예방	51
1. 역학조사	51
2. 발생지역에 대한 조치	55
3. 소독	56
4. 예방조치	58
VII. 결론	60
VIII. 부록	61
1. 배지제조	61
2. 염색액제조	63
3. ELISA용 buffer제조	65
4. 탄저 병성감정 실시요령	66
5. OIE manual	70
IX. 참고문헌	80

I. 서 언

탄저병은 *Bacillus anthracis*(탄저균)에 의해 주로 포유동물중 초식동물 및 잡식 동물에서 발생하는 급성, 열성전염병으로써 비장의 종대, 피하, 점막하의 부종 및 출혈을 특징으로 하는 가축의 제1종 가축 전염병이며 급성 인수공통 전염병이다. 이는 1876년 Koch에 의하여 탄저균의 인공배양이 성공됨으로써 세균학적 연구의 기초를 확립한 후 세계적으로 본 병의 발생이 보고 확인되었으며, 1879년 Pasteur에 의한 탄저백신 개발의 성공은 이 병으로 위협을 받는 세계 여러 나라에서 탄저 발생을 근절하는데 공헌하였다. 탄저에 대한 연구는 의학사의 발전에 큰 의미를 가져다 주었다. 사람들은 처음으로 미생물이 야기한 인수공통질병을 인식하게 되었다. 그리고 세균학에서 잘 알려진 기본원리를 확인하게 되었다. 저명한 Koch의 4대 원칙도 탄저균을 이용하여 입증하였다. 약독생균백신을 개발하였고 동물면역예방에 성공적으로 사용하였으며 Pasteur의 “약한 것으로 강한 것을 정복한다”는 이론은 다른 생독백신을 개발하는데 이론적인 기초가 되었다.

탄저병은 전세계적으로 발생이 확인된 질병으로 현재 아프리카, 중동, 중국, 몽고, 러시아 등의 지역에서는 다발하고 있으며, 이외 지역에서도 산발적으로 발생하고 있다. 과거 국내에서는 소에서 주로 발생하였고 사람에서도 발병하였으나 국가차원의 지속적인 연구와 동물에 대한 철저한 예방접종으로 발생이 점차 감소하여 1978년까지 상재지역에서 산발적으로 발생하는 정도였다. 그후 1993년까지는 발생이 없다가 최근 들어서 1994년(경주, 홍성)과 1995년(홍성) 소에서 다시 발생하여 관심이 고조되고 있다. 우리 나라에서의 탄저에 대한 연구는 일찍 시작되었다. 1910년 이후부터 탄저백신을 사용하였으며, 1965년부터 이현수 등은 탄저와 기종저 두 질병을 동시에 예방하고자 탄저 기종저 혼합백신 개발에 착수하였으며, 0.01% saponin을 첨가한 탄저 Sterne과 10% toluene을 첨가한 기종저 2묘 백신을 혼합 제조하여 24개월까지 안전하고 효력도 양호함을 확인하였다. 또한 혼합백신

은 18개월까지 본 병에 대한 예방효과가 확인되어 혼합백신의 면역지속성이 인정되었으며 안전성과 효능에서도 우수한 백신을 개발하였다. 개발된 백신이 1970년부터 사용되면서 탄저병의 발생은 급격히 감소하여 1978년까지 매년 1~2두씩 발생하는 정도였다. 1979년 이후부터 한동안 발생하지 않다가 최근에 다시 발생하여 양축농가 뿐만아니라 사람에게도 큰 피해를 주었다. 따라서 탄저병의 신속하고 정확한 검진을 위한 새로운 진단기술과 피해를 최소화하기 위한 방역지침의 작성이 요구되고 있다. 이에 탄저병의 병인학적 특성, 발생역학, 임상증상 및 병리소견, 진단 및 치료, 예방 등에 대하여 전반적으로 검토하고 종합적인 방역대책을 세움으로써 많은 농민들과 수의업무 및 위생방역 종사자들에게 탄저병에 관한 지식과 기술을 제공하고 탄저 예방에 대한 교육 및 홍보자료로 사용하고자 한다.

II. 병인론

탄저의 원인체인 탄저균(*Bacillus anthracis*)은 그람 양성균의 두터운 간균으로서 호기성 조건에서 아포를 형성하는 세균이다. 탄저균 외에 탄저균과 감별을 요하는 *Bacillus*속 균으로는 *Bacillus cereus* 등으로 사람에게도 감염되며, 설사 혹은 기타 조직감염을 유발하기도 한다.

1. 형태

탄저균은 크기가 $1\sim 1.5\mu\text{m}\times 5\sim 8\mu\text{m}$ 이고 양쪽이 평평하며 병원성이 높은 간균이다. 감염동물의 혈액과 조직내에 단간균, 쌍간균 또는 연쇄간균으로서 관찰된다. 균단이 장방형으로서 연쇄간균은 마치 대나무모양(죽절상)으로 관찰된다. 그람염색 양성이고 편모와 운동성이 없다. 조직내의 균체 또는 5~20% CO₂분압하에서 자란 균체는 여러 가지 염색법(Indian ink, Giemsa stain or 10% formalin-crystal violet stain)에 의해서 협막을 관찰할 수 있다. 영양배지에서 성장한 균에서는 긴 사슬모양의 무협막균을 관찰할 수 있으며, 배지에 약 5% 동물혈청 혹은 0.75% sodium bicarbonate를 첨가하고, 10~20% CO₂환경하에서 배양하면 세균에 협막이 형성된 것을 관찰할 수 있다. 체내 혹은 섬유질을 제거한 말혈청, 토끼혈청을 첨가한 배지에서 배양하여도 협막이 생긴다. 협막성분은 D-polyglutamic acid이며 협막 plasmid(pXO2)가 encoding되어 병원성과 밀접한 관련이 있으며, 체내에서 백혈구의 탐식 및 소화작용을 억제하고, 체외에서는 균체벽에 있는 phage receptor를 제어하므로 병균이 체내에서 증식하고 발병하기에 유리하도록 한다. 인공배지에 30~35°C에서 배양하면 전형적인 아포가 쉽게 형성된다. 아포의 형성은 산소가 필요하므로 폐사 몇시간내에 채집한 혈액 도말 슬라이드에서는 아포를 찾을 수 없다. 정지상태에서 활성이 있는 세균이 공기에 노출되면 아포가 형성된다. 형성되는 비율은 습도와 기타 외부 환경조건에 의해 결정된다. 도말염색

슬라이드에서 아포는 균체의 중앙 혹은 변두리에 위치해 있고, 타원형이며, 세포가 팽창하지 않는 것을 알 수 있다. 영양형(vegetative) 세균과 비교해 볼 때 아포는 열, 냉, UV, 화학소독제 및 기타 세균대사 산물에 비교적 강한 내성을 가지고 있다. 따라서 자연계 토양에서 장기간 생존할 수 있으며 생존기간내 발병능력을 상실하지 않는다.

2. 배양 및 생화학적 특성

일반적으로 탄저균은 탄저병으로 인해 죽은 폐사축이나 감염된 동물에서 쉽게 분리 가능하나, 다른 잡균에 심하게 오염된 가죽, 털, 토양 등에서는 분리가 어렵다. 제일 민감한 방법은 역시 파스퇴르가 사용하였던 방법으로 오염된 가검샘플을 실험동물에 접종하여 탄저균을 분리하는 것이다. 탄저균은 호기성이며, 적정발육 온도는 37°C이고 pH 7.0~7.4인 보통 한천배지에서 잘 자란다. 모든 배지에서 잘 자라며, 5% 혈액한천배지에서 발육한 세균집락의 특성은 비용혈성 대형 집락으로 곱슬머리모양의 축모상(Medusa head)을 특징으로 한다. 집락의 내면은 희백색의 불투명한 곰보유리모양으로 평평하고 거칠며, 집락의 높이가 낮으며, 집락의 가장자리는 건조하며 불규칙한 곱슬머리털 모양을 나타낸다. 액체배지에서 배양하면 솜모양으로 자라고, 배지가 투명하며 균막과 벽환이 형성되지 않는다. Frazier gelatin agar를 이용하여 평판배양된 집락의 내면구조와 변연부의 형태에 따라 병원성 균주와 Pasteur No.1 No.2 및 Sterne주와 같은 비 병원성 균주를 구분할 수

표 1. Properties of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus spp.*

Property	<i>B.anthraxis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.megaterium</i>	<i>B.thuringiensis</i>
Capsule formation	variable	-	variable	-
Motility	-	+	variable	+
β -hemolysis	-(or weak)	variable	variable	variable
Growth at 45°C	slight	rapid	variable	slight
Sensitivity of penicillin	S	R	S	R
NA with 0.7% sodium bicarbonate under 10% CO ₂	mucoid colonies	unchanged	unchanged	unchanged

있다. *Bacillus*속균중 다른 종류의 균들과 구분하기 위한 주요 생화학적 성상을 비교해 보면 다음 표 1과 같다.

3. 생태학적 특성

탄저균은 지역적으로 분포하며 이동성이 있다는 것이 알려져 있고, 외부 일광조사를 통해 대부분의 탄저균은 죽고 일부 소수균이 아포를 형성하는 것으로 추측된다. 아포의 형성은 토양의 특성과도 관계가 있다. 높은 pH, 밀질토양의 환경에서 아포형성이 비교적 적으며 상층토양이 하층토양보다 오염이 심하다는 것이 밝혀져 있다. 탄저 유행기간에 반심층토 샘플중의 양성률은 심층토에서 보다 높지만 비유행기간 반심층토에서 채집한 샘플의 양성률은 심층토에서 채집한 샘플보다 낮다. 탄저균과 물과의 관계를 보면 아포의 수는 탄저균의 수량과 비례한다는 것이 알려져 있다. 동물에서 항탄저의 항체를 검사한 결과 초식동물인 경우 항체의 생성량은 비교적 낮다. 탄저에 감염후 초식동물의 대부분이 폐사하고 극소수에서 항체가 생성되어 면역력이 생긴다. 그러나 육식동물은 모두 항체가 잘 생성되며, 면역력이 형성된다. 혈액을 채취하여 협막 항체 분석을 한 결과 탄저 발병 7일 후부터 체내 항체가 나타나기 시작하여 1개월후 항체수준이 최고에 도달하여 8개월 후 항체수준이 하강하게 된다.

4. 저항력

탄저아포는 외부환경에서 장기간 생존할 수 있다. 건조한 조건하에서 아포가 존재할 때 동물제품 즉 피혁, 브러시, 양모 및 골분 등의 오염에 관여한다. 그러나 아포와 자연환경 특히 토양과의 관계는 아직 불명확하다. 토양은 그 자체의 온도, 유기물함량, 물리 화학적 특성, pH, 햇빛을 받는 시간 및 습도에 의해 많은 차이가 있다. 토양중의 습도와 유기물은 탄저아포의 발아과정을 촉진할 가능성이 있으며 이런 요소들은 토양중 고유한 세균의 활성화에 영향을 줄 수 있다. 발아한 탄저균은 토양균들과의 경쟁에서 죽거나, 토양중의 세균들이 생산하는 항생물질, 기타 미생물적 요소 혹은 낮은 pH의 영향을 받아 죽을 가능성이 있다. 년 강수량이 적은 지역과 아주 추운 지역에서 탄저 아포는 동물의 뼈와 토양에서 오랫동안 존재

할 수 있다. 이것은 아포의 발아과정이 건조한 환경과 추운 조건에서 억제되기 때문이다. 그러나 아포의 휴면은 아주 복잡한 현상이며 완전 휴면상태 즉 대사과정이 완전히 정지된 상태의 존재여부는 확실하지 못하다.

아포형성 세균들의 성장조건은 불분명하다. 발아체가 형성되는 비율은 온도, pH, 습도, 공기 및 발아촉진인자의 존재여부의 영향을 많이 받는다. 이런 요소들은 상호간에도 영향을 미친다. 아포 저항력의 원리는 아래에 설명되는 몇 가지 방면으로 설명될 수 있다.

가. 균외막의 구조

세균의 외막은 외부 공격에 저항하는 첫 번째 방위선이다. 균체 표면은 한 층의 세포벽과 한 층의 얇은 세포막으로 둘러 쌓여있다. 세포벽은 상대적으로 연약하며 두께는 $0.01\sim 0.02\mu\text{m}$ 밖에 안된다. 그러나 아포표면에는 다층구조가 있으며 두께는 약 $0.12\mu\text{m}$ 에 달한다.

나. 지용성물질

아포, 특히 아포의 외피부분에 풍부한 지용성물질이 존재하므로 비지용성 물질의 침투를 억제한다.

다. 2가 이온

아포는 많은 2가 이온, 특히 칼슘이온을 가지고 있다. 칼슘의 아포체내에서의 생리작용은 접착제와 같은 구실을 한다. 그러므로 아포는 저 침투성을 유지하며 peptide chain이 풀려 단백질의 변성을 방지한다.

라. pyridiacid의 존재

pyridiacid는 아포 건조 중량의 5~15%를 차지하며, 가열시 단백질이 변성하는 것을 방지하며, 아포의 열에 대한 저항력에도 관여한다고 한다. 그러나 발아한 탄저균에는 존재하지 않는다.

마. 수분

아포중 수분은 17~23%밖에 차지하지 않는다. 핵심부위에 분포된 수분은 비용성 교질과 대분자로 형성된 결합물 중심에 묻혀 있어 아포의 열에 대한 저항력을 증강시킨다.

바. 기타

균체내 효소의 수량과 특성과도 관련될 수 있다. 아포내에 함유한 효소들은 다수가 내열성을 가지고 있다.

5. 항원구조

탄저균의 항원은 구조에 따라 크게 4가지로 나눈다. 즉 협막, 균체, 독소 및 아포이다.

가. 협막항원

협막의 주 구성물질은 γ -bond로 연결된 50~100개의 D-glutamic acid residue가 α -peptide로 구성된 long chain D-glutamic acid residue라는 것이 입증되었다. 협막은 백혈구의 탐식 및 소화작용에 저항하며 균의 독성에 관여하지만 동물에게 면역시켰을 때 방어항체를 잘 생성하지는 않는다. 협막항원을 동물에게 면역시켜 얻은 혈청으로 협막항체를 제조하여 탄저의 감별진단에 보조적인 방법으로 사용할 수 있다.

나. 균체항원

균체항원은 d-glucosamine, d-galactose 및 acetic acid가 함유된 다당류물질이다. 동물에게 면역하여 침강소 혈청을 얻을 수 있다. 이 침강소 혈청은 각종 세균의 다당류 항원과 침전반응이 일어나 백색 침전환이 나타난다. 균체 항원은 열에 민감하지 않으며 부패한 사체에서 장기간 존재하거나 가열하여도 파괴되지 않으므로 균체혈청과 가열침강반응 실험(Ascoli test)을 할 수 있다.

다. 독소항원

탄저 특신은 세 가지로 구성되어 있다. 즉 부종인자(edema factor, EF), 방어항원(protective antigen, PA), 치사인자(lethal factor, LF)이다. PA와 LF는 단백질이고, EF는 지용성 단백질이다. 이 세 가지 성분이 모두 열에 민감하고 산과 알칼리에도 민감하다. EF자체는 독성이 없다. LF는 대량 주입시 치사작용이 나타난다. EF +LF의 독성도 별로 크지 않다. 그러나, EF+PA는 심한 피하부종을 초래하며, LF+PA는 마우스, 랫드, 기니픽을 치사시킬 수 있다. 질병발생 능력이 가장 강한 것은 EF+LF+PA로서 이들은 체내에서 협동작용을 한다. PA는 방어항원이므로 면역원성이 있으며 PA에 대한 항체는 동물이 탄저균에 저항하도록 보호하는 작용이 있다.

라. 아포항원

아포의 외막에는 항원결정그룹이 있는데 이들은 피질층과 더불어 아포의 특이 항원을 형성한다. 이 항원은 면역원성이 있을 뿐만아니라 혈청학적 진단가치도 있다.

6. 면역학적 특성

탄저균은 그 항원구조상 동물 체내에 면역반응을 유도하여 항균, 항독소반응을 유도할 수 있다. 따라서 체액에서 항체를 생성하는 동시에 비교적 강한 세포면역 반응도 일어난다. 이 두 가지 면역반응이 상호 협동하여야만 외부에서 침입한 병균을 소멸하고 독소를 중화하여 탄저감염을 억제할 수 있다.

가. 비특이성 면역

탄저의 비특이성 면역은 유전학적 종속(species) 특이 면역원성에 있다. 조류 이하의 파충류, 양서류와 같은 진화정도가 낮은 동물들은 탄저에 대해 자연적으로 감수성이 낮으며 포유동물들은 탄저균에 감수성이 있다. 그러나 감염과 면역반응은 주로 세균의 독소, 면역원성, 감염경로 및 투약용량에 따라 밀접한 관계가 있다.

나. 특이성 면역

탄저의 면역기능은 항원의 복잡성으로 인해 다른 세균성 면역보다 복잡하다. 일정한 조건하에서 아포와 협막도 있고, 균체에는 lipid polysaccharide endotoxin 이 존재하며 그 외 특정 조건하에서 exotoxin도 생성한다. 탄저의 면역은 면역학에서 중점연구대상이었으며 많은 연구를 통하여 전염 및 면역기전이 밝혀져 있다.

1) 탄저의 자연감염으로 형성된 면역은 종합적인 면역반응을 유도한다. 탄저 자연감염의 대다수는 아포형으로 체내에서 처음으로 인식한 항원은 아포이다. 면역반응은 주로 침입한 항원을 탐식, 소화 및 배출하는 과정으로 이루어진다. 아포항원은 ① 탐식세포에 의해 탐식된다. ② 침입한 국소 조직에서 발아하고 번식한다. ③ 대식세포에 의해 깊은 부위의 임파조직에 들어가 거기서 발아 번식할 수 있다.

2) 체내는 탄저균이 협막을 형성하는 적당한 조건하에 있다. 협막은 탐식세포의 탐식, 소화 및 배출작용을 억제할 수 있다. 따라서, 발아, 번식할 기회가 있는 탄저균은 임파와 혈액에서 다량 번식할 수 있으며 체내는 독소를 생성할 수 있는 적당한 환경이므로 증식하면서 상당히 많은 각종 독소성분을 생산한다. 독소의 축적은 폐사의 원인이 된다.

3) 탄저균 균체항원과 협막항원의 자극에 이어 면역반응을 야기하여 regulation factor, precipitin, lectin 및 보체결합항체를 생성한다. 아울러 체내 세균이 방출한 독소항원은 임파 세포를 자극하며 여기에 대응하는 항독소 항체를 생성할 수 있다. 비급성 감염과정에서도 일정량의 항독소 항체를 생성할 수 있다. 급성과정에서는 독소가 중추신경계에 작용하여 급속히 호흡중추를 마비시키므로 항독소 항체가 생기기전에 호흡기능상실로 폐사한다.

4) 탄저 감염후 자연 면역되거나 혹은 과면역된 개체는 혈청중에 탄저균에 대한 항체와 항독소 항체가 존재할 뿐만아니라 세포성 면역에도 중요한 작용을 한다.

과면역된 개체는 면역과정중 임파세포가 대량 증식하는 양상을 볼 수 있으며 allergen을 재차주사하면 국소조직에서 세포침윤현상을 관찰할 수 있다.

7. 변이성

탄저균의 변이는 집락변이, 형태학적 변이, 독성변이 세부분으로 나눌 수 있다.

가. 집락 변이

탄저균의 집락형태는 배양조건에 따라 차이가 있다. 체내와 유사한 조건에서는 smooth type(S)을 나타낸다. 즉 표면과 가장자리는 반들반들하고 표면은 빛을 반사하여 유백색을 띤다. 균질, 불투명하며 크기는 1.5mm~3mm이다. 일반배지에서 배양시 대부분은 rough type(R)이다. 형태는 평평하고 회백색이며 불투명하다. 테두리는 곱슬곱슬하고 크기는 3mm~5mm이다. 배양조건의 변화에 따라 각종 비전형적인 집락 형태도 나타날 수 있다. 보통 대기조건하에서 일반배지에서 배양할 때 형성된 S형 집락 대부분은 무독주이고 R형 집락은 강독주이다.

나. 형태학적 변이

탄저균은 일반배지에서 여러 차례 계대후 그람염색을 해보면, 연쇄간균 혹은 쌍균체 형태로 균일하지 않게 염색되는 것을 관찰할 수 있다. 오래된 배지 혹은 영양성분이 부족한 배지에서 일부 균체는 그람염색에서 음성을 나타낸다. 43℃의 높은 온도에서 배양할 때, 일부 균주는 아포형성 능력을 상실할 수 있다. 항생제가 첨가된 배지에서 혹은 특정 동물의 위장에서 탄저균은 협막형성 능력을 부분적으로 상실하여 약독주로 변한다. 또 penicillin작용하에 세균 세포벽형성이 억제되어 chain양 균체가 팽대해지며 뚜렷한 구슬목걸이와 같은 형태를 나타낸다. 이러한 탄저균을 L형 탄저균이라 한다. L형 탄저균은 일정한 조건하에서 정상상태로 회복될 수 있다.

다. 독성변이

탄저균은 자연조건이나 인공배양조건을 막론하고 모두 독성이 감소될 수 있다.

Pasteur(1881)가 처음으로 성공적으로 탄저 감독백신을 만들어낸 이후 Vodkin과 Leppla(1983)은 탄저균의 독소 plasmid를 발견하였고, Green등(1985)은 탄저균의 협막 plasmid를 발견하였다. 나중에 이 두 가지 plasmid를 각각 pXO1과 pXO2라고 명명하였다. 이 두 가지 plasmid에 대한 연속적인 발견은 탄저균의 독성은 염색체 유전자와 두 가지 plasmid와도 밀접한 관계가 있다는 것을 증명하였다.

8. 탄저균의 plasmid와 병원성인자

탄저균의 병원성은 주로 협막 형성과 독소 생성 능력에 의해 결정된다. 탄저균의 독소 plasmid(pXO1)와 협막 plasmid(pXO2)가 확인됨으로서 탄저균의 병원성은 유전자의 조절을 받으며 plasmid를 통하여 전달 혹은 제거된다는 것이 밝혀졌다.

가. pXO1과 독성인자

1983년 Vodkin이 이 독소를 encoding하는 plasmid를 발견한 후 pXO1이라고 명명하였다. 분자량은 185kb 크기이며 방어항원 (Protective antigen, PA, 85kDa, 736aa), 부종인자(Edema factor, EF, 90kDa, 767aa) 및 치사인자(Lethal factor, LF, 89kDa, 767aa)로 구성되어 있는 tripartite toxin이다. 만약 독소 plasmid가 있는 균을 43°C에서 연속 8~10번 계대하면 pXO1 plasmid를 소실할 수 있으므로 온도에 민감한 형태의 세균인 것을 알 수 있다. 따라서 pXO1 plasmid는 균주에 있어서 어떤 gene regulation activity에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추측된다. 이들 독소조절인자는 pXO1 plasmid에 1.4kb크기의 atxA(anthrax toxin gene activator)라는 유전자에 encoding되어 있으며, 이 단백질은 56kDa크기의 soluble, basic polypeptide이다. 이 유전자의 중요성은 atxA유전자의 null mutant를 이용한 mouse model에서도 증명되었다. 이들 독소의 유전자는 온도와 bicarbonate농도에 의하여 상호 조절되면서 발현된다.

나. pXO2와 협막

탄저의 협막(capsule)은 pXO2라는 95Kb크기의 plasmid(capA, capC, capB)에

encoding되어 있으며 중요성분은 poly- γ -D-glutamic acid이다. 이 협막은 탐식 세포들에 의한 식균작용을 방어(저항)하는 기능을 주로 한다. 탄저균을 37°C, 5~20% CO₂조건하에서 혈청 또는 NaHCO₂가 함유된 배지에서 24~48시간 배양하면 점액성 집락이 자라며 이 집락에서 협막을 관찰할 수 있다. neomycin이 함유된 배지에 배양하면 일부분 균주는 pXO2 plasmid를 소실하며 집락은 rough하게 변하고 협막이 형성되지 않는다.

9. 병원성

탄저균의 병원성은 협막형성 및 탄저독소의 생성에 의해서 결정된다. 탄저의 독력은 협막과 독소 2가지 성분으로 결정된다. 협막 물질은 체내에서는 탐식세포의 탐식 소화작용을 방어하고, 체외에서는 phage수용체를 덮어주므로, phage에 의한 splitting을 막아주는 역할을 한다. 독소는 세 가지 인자, 즉 부종인자(EF), 치사인자(LF), 방어항원(PA)으로 구성되어 있다. 탄저균은 독소 AB 구조모델에 부합되며 이런 구조의 형성은 기타 세균 exotoxin의 구조와 유사하다. 차이점은 탄저균의 AB subunits는 상호 분리되어 있지만 noncovalent bond에 의해 연결될 수도 있는 독립적인 단백질 성분이란 것이다. 이들 중 방어항원은 병원성을 나타내기 위한 필수적인 요소이며 세포에 치사 또는 부종인자가 부착하는데 매우 중요한 작용을 한다(그림 1). 이중 C-terminal region이 중요한 작용을 하며 이 항원은 LF또는 EF와 반응하여 세포에 부착할 수 있도록 Furin이라는 자체의 protease 작용에 의해서 63KDa과 20KDa크기의 단백질들로 분해되어서 receptor에 부착될 수 있도록 한다. EF는 중앙부근에 ATP-binding site와 Calmodulin-binding site가 존재하여 이 인자 자체가 Adenylate-cyclase작용을 가짐으로써 세포내 cAMP농도가 증가되어 부종을 유발하게 된다. LF는 C-terminal부근에 zinc-binding site를 가지고 있어서 metallo-protease를 나타내며 대식구와 류대식구 등에 결합하여 이들 대식구를 용해시키는 작용을 한다. 그러나 LF에 대한 정확한 병원성 및 기전에 대해서는 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이들 독소의 독성과 면역원성은 다음 표 2과 같다.

그림 1. 탄저 toxin의 작용기전

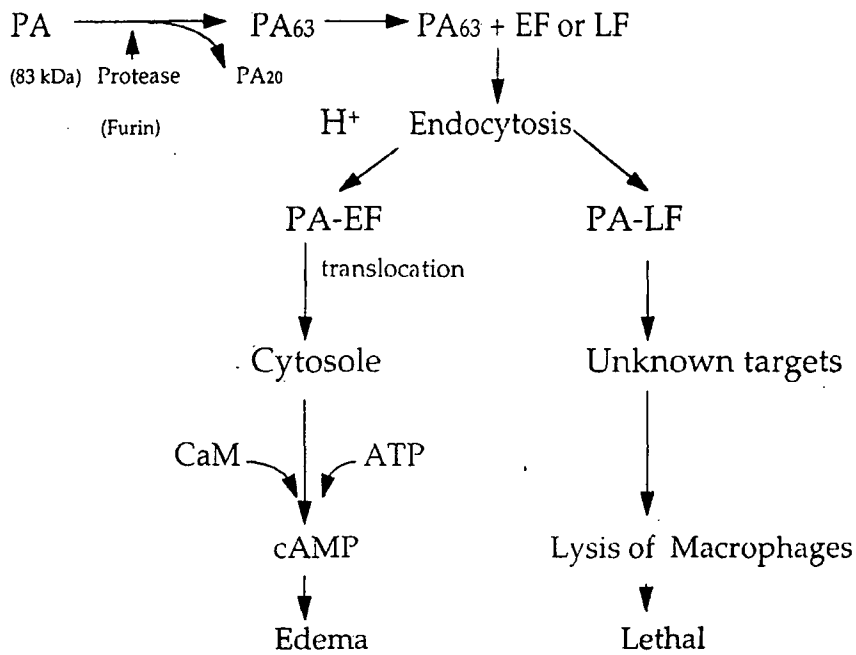


표 2. Toxic and Immunologic properties of *B. anthracis* toxin components

Factors	Toxic activity	Immunologic activity
Edema factor(EF)	Inactive	Serologically active, nonimmunizing
Protective antigen(PA)	Inactive	Serologically active, nonimmunizing
Lethal factor(LF)	Inactive	Serologically active, weakly immunizing
EF+PA	Gross local edema	Strongly immunizing
EF+LF	Gross local edema	Strongly immunizing
PA+LF	Lethal	Immunizing
EF+PA+LF	Edema, lethal	Immunizing

탄저의 감염은 자연조건에서 두 가지 가능성이 있다. 한가지는 환축의 조직, 기관 및 배설물 등 병원성 물질에 직접 접촉하므로 주로 영양형 탄저균 균체에 감염이고 다른 한가지는 오염된 토양, 피모 및 aerosol 등을 접촉함으로써 주로 탄

저균 아포에 감염된다. 탄저아포는 체내에 진입후 우선 발아한다. 균체의 직접 침입과 아포의 발아후는 물론 모두 국부 번식을 거쳐 임파 계통을 통하여 혈액내로 들어가 각 장기에 분포하는 세 단계를 거쳐야한다. 감염이 되면 곧 임상증상이 나타난다. 세균이 혈액에서 대량 번식하면 균혈증이 초래되며 세균의 증식과정에서 각종 독소 인자가 생성된다. 부종인자가 혈관의 삼투성을 증가시켜 장액성 삼출액이 대량 삼출하고, 적혈구가 다량 용해되어 혈장단백과 산소의 결합이 부족하여 산소결핍성 쇼크를 초래한다. 치사독소는 중추신경계에 작용하여 호흡중추의 마비를 야기시켜 호흡곤란으로 인한 폐사를 일으킨다. 이 두 가지 독소는 모두 방어항원이 협동작용하여야 하며 이들 독소의 작용은 폐사의 주요 원인이다.

탄저균의 병원성은 협막과 균체 외독소에 의하지만 독소는 비병원성 무협막형 균주에 의해서도 생성되고 또 협막을 가진 균주라도 꼭 병원성을 나타내는 것은 아니기 때문에 이들 어느 것도 탄저균의 병원성을 단정할 수 없기 때문에 탄저의 확실한 진단을 위해서는 분리균의 병원성 확인이 반드시 실시되어야 한다. 이 진단법은 실험동물(마우스, 기니픽, 토끼)을 이용하여 확인할 수 있다.

Ⅲ. 발생 역학

1. 발생

가. 동물의 발생

1) 국내 발생

우리나라에서 최초로 탄저병 발생이 기록된 것은 1905년이며, 국내에서는 1907년에 최초의 공식보고가 있는 이후 5년간의 발생이 2,562두로써 당시의 피해가 극심했던 것으로 추정된다. 그 이후에도 연간 1,000두이상 발생하여 1924년에 이르기까지 연간 약 500두를 상회하는 발생률을 나타내고 있다. 그러나 Pasteur No.2 백신이 개발(1922)되어서 사용되기 시작하면서 급격히 발생이 감소되기 시작하였다. 계속 발생이 감소되다가 1978년 이후에는 발생이 없었다. 이러한 감소현상은 비협막 약독균주인 Sterne균주를 이용한 생균백신의 개발과 방역에 철저를 기한 결과라고 생각된다. 그러나 최근 1994년에 2두(경주, 홍성 각1두) 및 1995년에 1두(홍성)가 발생하였다. 계절별로는 연중 발생하기는 하나 5월과 8월에 각각 최고의 분포를 나타내었다. 이는 연평균 강우량이 4월과 7~8월에 가장 높은 점을 생각해 보면 오염된 토양이 우기에 노출되어서 초원을 오염시킴으로써 초지를 이용하는 소에 전염원으로 작용하는 것으로 생각된다. 국내 연도별 발생상황은 아래의 표 3와 같다.

우리나라에서 최초로 탄저병 예방에 생물학적제재를 사용한 것은 1907년 9월로 조선농업발달사에 기록되어 있다. 우리나라에서 탄저백신을 사용한 것은 1908년~1909년 전후로 추정되나 계획적인 탄저백신 접종이 이루어진 것은 1910년 한일합병이 실시된 후로 보여지며 탄저백신접종 실시 두수에 관한 통계자료는 1922년 이후부터 기록이 되어있다. 우리나라에서 사용된 탄저백신은 Pasteur의 예방약을 사용하였으며 접종방법은 Pasteur방법인 탄저 1묘와 탄저 2묘의 생균백신을 2회 피하접종하는 방법, 2묘의 피내접종법 및 탄저 2묘와 탄저 면역혈청과의 공동피하

표 3. 국내 가축의 연도별 발생 상황

년도	발생 두수	년도	발생 두수	년도	발생 두수	년도	발생 두수	년도	발생 두수
1907	156	1926	209	1945	-	1964	24	1983	0
1908	275	1927	248	1946	-	1965	28	1984	0
1909	550	1928	184	1947	-	1966	5	1985	0
1910	795	1929	219	1948	45	1967	1	1986	0
1911	876	1930	87	1949	52	1968	1	1987	0
1912	1,342	1931	96	1950	12	1969	2	1988	0
1913	1,373	1932	113	1951	34	1970	1	1989	0
1914	1,754	1933	70	1952	105	1971	0	1990	0
1915	1,397	1934	84	1953	42	1972	2	1991	0
1916	1,383	1935	104	1954	24	1973	1	1992	0
1917	1,163	1936	82	1955	2	1974	1	1993	0
1918	1,284	1937	176	1956	1	1975	1	1994	2
1919	735	1938	133	1957	0	1976	0	1995	1
1920	594	1939	182	1958	2	1977	1	1996	0
1921	784	1940	125	1959	3	1978	1	1997	0
1922	777	1941	57	1960	61	1979	0	1998	0
1923	666	1942	41	1961	28	1980	0		
1924	551	1943	-	1962	57	1981	0		
1925	319	1944	-	1963	9	1982	0		

접종을 병행하여 실시하였다. 1942년에는 탄저 2묘 피하 1회 접종방법도 병행하게 되어 4종의 접종방법이 적용되어 왔으며 해방 후에는 피내 1회 접종법만이 적용되어 왔다. 탄저백신은 1922년부터 1941년까지는 탄저 1묘 및 2묘 백신을 사용하였고, 1942년부터 1969년까지는 탄저 2묘 생아포백신을 사용하여 왔다. 1965년부터 이현수 등은 탄저와 기종저 두질병을 동시에 예방하고자 탄저 기종저 혼합백신개발에 착수하였다. 이들은 0.01% saponin을 첨가한 탄저 Sterne백신과 10% toluene을 첨가한 기종저 2묘 백신을 혼합 제조하여 24개월까지 안정성을 유지하는 백신을 개발하였다. 이 혼합백신은 안전성은 물론 효능도 매우 우수하였으며 백신접종후 18개월까지 면역이 지속되는 우수한 백신이었다. 개발된 백신이 1970

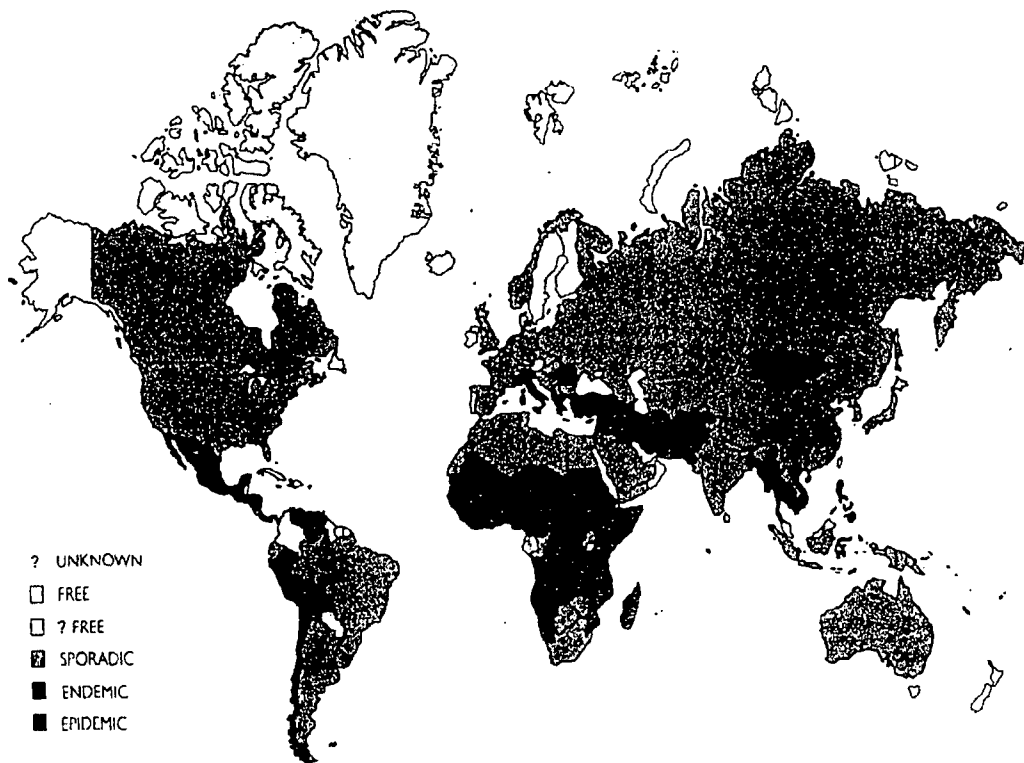
년부터 사용하면서 탄저의 발생은 급격히 감소하게 되어 1978년까지 매년 1~2두씩만 발생하여 오다가 1979년 이후부터 한동안 발생하지 않았다. 그 후 최근들어 1994년 2두(경주, 홍성), 1995년 1두(홍성)가 발생하여 축산농가와 방역당국에 큰 우려를 낳고 있다. 1994년 경주에서 발생한 탄저폐사우의 식육을 인근 주민이 섭취함으로써 많은 사람이 감염되어 오한, 두통, 편도선염 등의 증상으로 입원하였고 그 중 사망한 환자도 있었다.

2) 국외 발생

탄저는 전 세계적으로 발생하는 질병이었다. 특히, 목초를 이용하여 소와 양을 사육하는 지역에서 많이 발생하였으나, 지속적인 연구와 철저한 방역 덕택에 최근에 이르러 급격한 발생감소를 나타내고 있다. 그러나, 아직까지도 개발도상국을 비롯한 저개발국, 특히 방역을 소홀히 하는 지역에서는 지속적으로 발생을 하고 있다. 특히 야생동물이 많은 아프리카를 비롯하여 중국, 동남아시아, 러시아 및 남미의 일부지방에서는 아직까지도 다발하고 있어서 매우 중요한 전염병으로 취급되고 있다. 지난 10년동안 아프리카의 오트볼라, 이집트, 케냐, 말리, 루안다, 세네갈과 수단, 아시아의 이란, 이라크, 태국, 터키, 베트남, 중국, 인도, 유럽의 스페인 등 기타 지역 총 37개 나라에서 탄저 발생이 보고되고 있다. 최근의 자료에 의하면 북미지역에서는 캐나다의 경우 북부 Albert와 북서부 지역 wood buffalo에서, 미국에서는 미시시피의 서북쪽과 Arkansas의 동남지역 및 서부 텍사스지역으로 크게 두지역에서 다발하고 있다. 멕시코의 경우는 미국과 인접한 지역에서 많이 다발하고 있으며 중앙아메리카지역은 과테말라, 온두라스지역에서 다발하고 있다는 최근 보고가 있고, 파나마는 공식보고는 없으나 발생의 증거들은 있는 실정이다. 즉, Belize를 제외하고는 중앙아메리카에서 탄저의 발생은 상당한 상태로 짐작되며 Haiti를 제외한 카리브해 지역에서는 발생이 없는 상태이다. 남아메리카지역에서는 칠레에서 공식보고가 있는 반면, 브라질이나 우루과이는 탄저 비발생지역으로 선언한 상태이나 지속적인 검증이 필요한 지역이다. 유럽의 경우 주로 터키, 그리스, 알바니아, 남부 이태리, 루마니아와 중앙 스페인 등의 지역에서 심각한 문제를 나타내고 있다. 세계적으로 탄저의 발생이 가장 심각한 지역은 아프

리카지역이다. 특히, 서아프리카지역이 가장 심각하다. 아시아 유럽 지역에서는 터키에서 파키스탄에 이르는 지역에서 고전적으로 탄저가 많이 발생하고 아시아 지역에서는 인도, 동남아시아, 중국, 몽고 등 지역에서 다발하고, 한국, 일본 등에서 간혹 산발적으로 발생하는 것으로 나타나 있다(그림 2). 최근 사람에서 탄저의 발병수에 대한 정확한 통계자료는 없지만 WHO의 최신보고서에서는, 매년 전세계에서 20,000~100,000병례가 발생한다고 보고했다. 그러나 실제수치는 정식 발표수치의 2~10배로 예측된다.

그림 2. 탄저의 세계적 발생상황도



2. 역할

가. 동물

1) 감수성

탄저는 가축과 야생동물을 포함하여 초식동물이 가장 감수성이 높으며 잡식동물과 육식동물은 저항성이 비교적 높다. 그러나, 모든 포유동물은 정도의 차이는 있으나 탄저에 감염될 수 있다. 또, 탄저는 다른 세균에 비해 침습성과 증식성이 강하기 때문에 초식동물, 잡식동물, 육식동물 및 조류(닭, 앵무새)에 이르기까지 넓은 숙주영역을 가진다.

2) 감염경로

동물에서 탄저의 주된 감염경로는 오염된 사료 또는 오염된 원료를 가공하는 공장에서 배출한 오수의 섭취나 오염된 환경(토양 등)에 노출 및 피부의 상처 등에 기인한다. 그러나, 아직까지 정확한 감염경로에 대해서는 밝혀져야 할 부분들이 많이 남아 있으나, 통상적으로 동물과 사람 중에서도 일부 노출자만 감염된다. 또한 관리방식이나 사육방식의 차이, 동물의 상대적 수와 동물의 품종이 질병에 관한 저항력과 관련된다고도 한다. 동물에서의 감염, 특히 방목장에서의 감염은 오염된 토양에서 자란 여러 가지 뽕족하거나 상처를 주기 쉬운 조사료의 섭취에 의해서 구강, 식도점막 등으로 균이 침입하게 된다. 그러나, 아포를 직접 토양에서 섭취하는 경우는 드물고, 오염토양 유래건초, 골분, 농후사료, 감염동물의 배설물, 혈액 등으로부터 감염이 쉽게 이루어진다. 토양에 오염된 균은 오염상태를 유지하면서 토양 속에 존재하는 정상세균총의 일부로서 일반적으로 낮은 수준에서 존재하고 있다가 건조기나 우기에 토양의 여러 가지 조건이 탄저균의 증식에 알맞을 때 증식을 함으로써 초지를 오염시키게 된다. 이들 증식에 관련된 주요 환경인자로는 질소유기물, 적당한 칼슘, pH 6.0이상, 기온 15.5℃ 이상, 지형이 낮고 습기가 많은 곳 등을 말할 수 있다. 물의 오염은 주로 피혁공장의 폐수누출, 감염동물의 사체 또는 오염된 지역의 홍수에 의한다. 장마철에는 홍수의 범람으로 흙에 퇴적되었던 탄저아포가 떠올라 흐르는 물을 따라 오염면적이 확대된다. 건조기의 바람

은 탄저의 아포를 먼지와 같이 날리면서 탄저균 aerosol이 형성되며 호흡기 감염을 유발한다.

3) 전파경로

동물은 일반적으로 토양중의 아포를 직접 또는 간접적으로 식용하여 감염된다. 또 등에와 파리에 물리면 동물간 기계적인 전파가 가능하다는 사실이 입증되었다. 그렇지만 대다수의 탄저병례는 흙과 물 중의 아포로 인해 유발된다. 일반적으로 감염순환과정은 ① 감염된 동물이 활성이 있는 세균을 배설 ② 아포의 형성 ③ 아포가 다른 동물을 다시 감염시킴과 동시에 이 아포들은 오염물과 바람을 통해 전파된다. 그리고 감수성이 낮은 육식동물들이 탄저 아포를 다른 곳으로 이동시킨다. 아프리카에서는 독수리가 탄저전파에 특수한 역할을 한다고 한다. 이런 육식류의 새들의 배설물에서 수차례 탄저균이 분리되었고 탄저에 감염된 동물의 시체를 먹은 것으로 추정된다. 기타 조류도 탄저 아포를 전파할 가능성이 있다. 일부 동물들 예를 들면 소, 말, 코끼리 등은 땅에서 텅굴다 흙중의 세균을 이 지역에서 다른 지역으로 이동시킬 가능성이 있다. 개, 고양이, 돼지 등 가축들도 이 병의 전파과정에서 중요한 역할을 할 수 있다. 수입한 동물사료 혹은 모피 제품 가공시 배출한 오물과 오수가 강물과 목장을 오염시키는 것이 선진국에서는 탄저를 유발하는 주된 경로이다.

나. 사람

1) 전염원

사람에서의 감염은 주로 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 직업에 관련된 발생이다. 이에선 농부, 도축장 관련 종사자, 피혁 및 피모 취급자, 수의사 등으로 이들이 감염된 또는 오염된 동물의 가죽, 꿀, 털 및 기타 부산물의 처리과정에서 오염되는 것이다. 둘째는 직업과 무관하게 발생하는 경우로써 피부의 손상, 파리 등 곤충에 물림 등에 의한 피부탄저, 오염된 음식물 또는 오염된 물의 섭취에 의한 장탄저 및 탄저의 아포에 오염된 공기에 의한 폐탄저 등을 들 수 있다.

2) 전파경로

사람은 직접 혹은 간접적으로 감염된 동물과 접촉하여 발병한다. 주로 발병가축고기를 식용하거나 탄저 아포에 감염된 aerosol의 흡입으로 감염된다. 아프리카의 단체거주방식은 사람과 사람간의 전파를 유발할 수 있는 방식으로 추정되고 흡혈파리가 주요 전파매개를 한 것으로 나타난 경우도 있다.

3) 유행특징

탄저가 많이 발생하는 지역을 조사해보면 주로 지대가 낮은 곳에 집중되고 목장지역, 반농 반목지역, 농촌지역에 많이 분포되어 있으며 계절적으로는 6~9월에 많이 발생한다. 연령, 성별차이에 무관하며, 접촉기회에 따라 주로 20~49세, 남자가 3.5 : 1정도로 많고, 농민이나 축산 종사자가 주피해자이다. 산발적 혹은 일부 지역에 폭발적으로 많이 발생할 수 있다.

IV. 임상증상 및 병리소견

1. 임상증상

가. 동물의 임상 증상

보통 동물은 오염된 풀, 물 등을 섭취하며 발병한다. 그래서 제일 많이 볼 수 있는 유형은 소화기계 감염이다. 동물에서 탄저의 임상증상은 뚜렷한 증상 없이 돌발적으로 폐사하여 부검에 의해서 탄저로 진단되는 것이 일반적이다. 급성 전신성 패혈증으로 폐사하여 뚜렷한 증상을 관찰할 수는 없으나 드물게 임상증상으로서 동물의 쇠약과 침울, 자연공 출혈, 피부 자색증, 피부부종, 호흡곤란, 식욕부진, 비유량 감소 등을 동반한 고열이 있다. 그러나, 이러한 것들은 특이증상이라기보다 일반적인 증상임으로 탄저로 의심, 진단하기는 매우 어렵다. 탄저는 잠복기가 36내지 72시간으로 매우 급성경과를 취한다. 감수성이 높은 초식동물(소, 양, 말)은 보통 초기에 급성과정을 나타내며, 잠복기간은 1~3일이다. 고열 증상을 보이며 체온이 40°C 이상으로 올라 지속되며, 죽기 전에야 신속히 하강한다. 고열에 동반되는 증세는 전신 떨림, 식욕감퇴이다. 한쪽에 멍하게 서서 머리를 숙이고 우울하며 눈에 생기를 잃고 한곳만 뚫어지게 바라본다. 눈 결막이 붉고 붉은 색을 띠고 심지어 출혈점도 관찰할 수 있다. 점막은 검붉은색을 띠고 심박동이 빨라지고 맥박은 약하며 호흡 곤란을 보이고 호흡수도 증가한다. 초기에는 변비가 있고 후에는 설사를 하며 혈변도 관찰된다. 뇨는 검붉은색이고 간혹 혈뇨를 배설할 때도 있다. 임신중이면 유산된다. 백혈구가 증가하고 적혈구의 유연성이 약하며 이형 적혈구증도 관찰할 수 있다. 병든 가축은 나중에는 호흡곤란, 질식으로 폐사한다. 죽은 후 사체는 잘 굳지 않으며 구강, 비강, 항문 등 천연공에서 출혈한다. 동물의 탄저는 사람의 탄저와 다르게 피부탄저(악성농포)가 관찰되지 않는다. 급성 패혈증으로 폐사한 동물의 부검시 주요 소견은 장막과 모든 장기의 부종성 출혈병변이다. 특히 비장이 종대(3~5배)되고, 흑색의 응고부전 혈액으로 꽉 차있다는 것

이 특징이다. 사체의 모든 임파절은 부종성 종대를 나타내고 위장, 간장, 신장이 출혈성 종대를 보임으로써 동물이 패혈증으로 폐사한 것임을 쉽게 확인할 수 있다. 돼지의 탄저는 탄저로 폐사한 사체를 먹거나 오염된 잔반을 먹을 때 흔히 발생되는데 인두부, 경부 임파절에 국한된 부종 출혈성 종대가 있고 만성경과시 섬유결합조직으로 둘러 쌓인 황색병소를 볼 수 있다.

1) 소: 급성 및 아급성 환우는 체온이 40℃이상으로 오르고 식욕, 반추 및 비유도의 연속에 이어 정지된다. 점막은 검은 자주색을 띠고, 심장이 빠르게 박동하고, 호흡이 곤란하며, 전신증상이 뚜렷하며 복부 팽만감도 많이 나타난다. 발병과정이 비교적 늦은 환우는 목, 가슴, 어깨, 아래, 배, 유방 및 외음부 수종이 많이 나타나며 초기 병소는 온도가 상승하고 팽팽하고 간혹 압통도 있지만 나중에는 발열과 통증이 사라지고 괴사가 나타나며 궤양이 생길 때도 있다. 목수종은 보통 연하염 및 후두 수종과 동반되어 나타남으로 호흡곤란이 가중된다. 급성 경과는 일반적으로 24~36시간, 아급성은 2~5일을 경과한다.

2) 말: 환마는 열증상의 복하, 유방 혹은 어깨와 연후두에 수종이 많이 나타난다. 혀 탄저도 관찰할 수 있으며 호흡곤란, 감청색증 등 증상이 현저하다. 장 탄저도 볼 수 있으며 복통이 뚜렷하다. 급성경과는 24~36시간이고, 탄저 독창일 경우 3~8일을 경과한다.

3) 양: 보통 심급성(뇌출혈)으로 나타나므로, 갑자기 어지럽고 어기적거리며 이를 갈고 경련을 일으켜 몇 분동안 발버둥치다 넘어져 죽는다. 병세가 늦게 진전되는 경우에도 몇 시간밖에 경과하지 않는다. 증상은 고도로 우울하고, 어기적거리고, 덜덜 떨며, 호흡이 어렵고, 입과 코의 출혈, 나중에는 눈의 경련을 일으켜 죽는다.

4) 돼지: 전형적인 증상은 후두부, 귀 아래 및 부근 임파절 종창, 우울, 사료섭취 곤란, 호흡증가 등의 증상을 동반하는 발열성 질환이다. 점막은 감청색을 띠고, 입술에서는 혈성 수포를 관찰할 수 있으며, 먹지 못하고 우리에서 왔다갔다하며 초

조한 모습을 보이다, 나중에는 질식으로 인하여 죽는다. 치유된 사례도 있다. 돼지는 탄저에 대한 저항력이 비교적 강하므로 국부증상이 뚜렷하다. 많은 병례에서는 임상증상이 현저하지 않고 도축 후에야 병변을 발견하게 된다. 실제 진료중 많은 주의가 필요하다.

5) 개와 기타 육식동물: 중증의 위장염과 연하염 증상이 많이 나타나고 열병증상도 관찰할 수 있으며 주로 면부 혹은 발밑에서 탄저 독창을 나타낸다.

6) 가금: 허약, 혈변, 두부 점막, 비슬 및 육표면이 감청색을 띠며 독창과 비슷한 종양이 관찰될 때도 있다.

나. 사람의 임상증상

사람의 탄저는 임상형에 따라서 크게 피부탄저, 장탄저, 폐탄저로 구분할 수 있으며 피부탄저는 피부손상을 통해 감염되고, 장탄저는 위장점막의 손상으로 인해 발생하며, 폐탄저는 탄저아포를 흡입하므로써 감염된다. 외국에서는 피부탄저가 95~99%를 차지한다. 국내에서는 장탄저가 많이 발생하였다. 발병 잠복기는 12시간에서 12일까지이며 평균 2~5일이다. 모두 치사가능성이 높다. 피부탄저는 특징적인 가피와 가피 주위에 수종대가 있다. 접촉 감염부에 12~36시간 내에 구진이 형성되고, 곧 수포와 농포로 변하며 괴사성 궤양이 생긴다. 곧 패혈증으로 진전되어 사망하게 된다. 폐탄저는 초기에 충격염, 패혈증, 뇌막염, 출혈성 폐부종 및 폐렴으로 쇼크사 한다. 장탄저는 장관에 감염되어 심한 복통, 구토, 출혈변이 있다. 장탄저와 폐탄저는 정확한 진단을 내린 후 치료를 시작한다면 너무 늦게 되어버리기 때문에 위험하다. 세 가지 탄저 모두 최종적으로는 패혈증으로 경과하여 사망하게 된다.

1) 피부 탄저

피부 상처를 통하여 혹은 곤충에 물려서 감염되면 처음에는 작은 구진 혹은 수종이 나타나며 보통 2~3일을 거쳐 손상이 커지면서 수포를 둘러싼 환형 홍증이

나타나며, 중앙의 수포는 궤양으로 변한다. 궤양이 점차 괴사하여 가피가 형성되며, 점차 건조해지고 검은 색으로 변해 나중에는 홍중범위 전부에 가피가 형성된다. 만약 계발성 화농성 세균감염이 없으면 손상 부위에 삼출액만 있고 화농이 없다. 이때 상처의 직경은 약 2 cm이다. 간혹 10 cm를 초과할 때도 있다. 주위에는 항상 수종이 동반된다. 5~6일째 아주 두꺼운 가피가 형성되며 밑에 조직과 밀접히 연결된다. 합병증이 없는 피부탄저에서 세균은 여전히 상처에 잠복되어 있으며 일부분 임파절이 종대된 것을 관찰할 수 있다. 합병증이 없는 병례에서는 최초의 농포는 약 10일후 가피가 용해되어 사라진다. 만약 약물처치를 하지 않으면 천천히 사라지며 약 2~6주 경과한다. 절개후 난치성 루관이 생길 가능성이 있으므로 가피와 주위수종을 막론하고 모두 절개하지 말아야한다.

패혈증으로 이미 전환된 병례중 몹서리, 두통과 어지럼증 등 증상이 나타나면, 질병의 급성과 치명성을 예고한다. 체온은 39℃이상으로 올랐다가 몇 시간내에 정상 체온이하로 떨어진다. 환자는 회복할 수 없는 독혈증과 쇼크, 호흡곤란, 감청색의 입술과 전신 쇠약증이 나타나며, 나중에는 사망한다.

2) 장탄저

탄저 아포가 감염된 고기, 우유, 기타음식을 먹은 후 발병한다. 장점막에 특이한 가피 혹은 악성 독창관 같은 탄저증상이 나타난다. 말단 회장 혹은 결장벽에서 많이 나타나며 식도, 위 십이지장, 회장 상단도 감염될 때가 있다. 손상은 소장과 장간막 대부분, 장간막 임파절 종대도 관찰할 수 있다. 오심, 구토, 발열, 복통 및 혈액성 변 등 증상이 많이 나타난다. 상하복부에 축통도 있을 수 있다. 잠복기는 2~5일 경과한다. 조기 진단하면 치유될 수 있다. 그러나 조기진단이 어렵기 때문에 이 유형의 탄저는 피부 탄저보다 치사율이 높다. 위중한 병례에서는 갑자기 불편감이 나타나고 곧이어 쇼크와 허탈이 나타나며 몇 시간내에 사망한다.

3) 폐탄저

아포에 노출 혹은 아포가 있는 먼지를 흡입하여 감염된다. 일반적으로 노출후 2~5일은 병세가 악화되며, 저열, 피로와 불편감이 동반된다. 이러한 경도의 병례

는 초기에는 2~3일 지속되다가 갑자기 급성으로 변하며, 환자는 구토 혹은 피를 토한다. 흉부 청진중 습성라음을 들을 수 있다. X선 검사에서 종격이 넓어지고, 백혈구 수는 중등으로 많아지고, 맥박은 빠르고 미약하며, 급히 호흡곤란, 입술감청, 고열 및 저항력 장애가 나타나며 바로 혼미, 사망한다.

4) 뇌막염형 탄저(피부, 장, 폐형의 합병증)

대부분은 계발성이다. 그러나 피부형 탄저의 뇌막염 합병증은 약 5%로 비교적 드물다. 원발성 뇌막염도 보고된 병례가 있다. 코 점막의 손상후 흡입된 탄저아포가 직접 비연강으로 혈액에 들어가 뇌에 도착하여 발병할 수도 있다. 모기에게 물린 후 직접 뇌막염형으로 발병한 병례에 관한 보고도 있다. 그러나 어떤 유형의 탄저에서나 모두 뇌막염이 야기될 수 있다. 뇌막염의 임상증상과 혈성 뇌척수액이 나타나는 동시에 의식상실 증상이 나타난다. 대부분 병례에서는 현저한 뇌막자극 증후가 있으며, 발병경과가 좀 짧고, 2~4일내 곧 사망한다.

2. 병리 소견

탄저는 패혈증을 유발하는 질병으로서 세균이 거의 전신 모든 혈액에 분포하는 것이 특징이다. 간장, 비장 및 장간막 임파절에 세균이 제일 많고, 심지어 뇌와 근육의 모세혈관에서도 균을 검출해낼 수 있다. 사망후의 특징은 사체가 잘 굳지 않고 혈액이 검붉은 색을 띠며, 사체는 신속히 부패하므로 가검물은 즉시 검사하여야 한다.

가. 동물 탄저의 병리변화

실험적으로 피하에 아포를 주사한 후 2~4시간내 민감성 동물은 모두 감염되고, 협막에 둘러싸인 세균이 모두 세포간액에서 발아 및 번식하며, 감염부위내 삼출물 저류, 소 혈관 종창, 충혈, 적혈구삼출, 모세혈관에 다핵 백혈구 점착 및 삼출, 내피세포종창, 단핵 탐식세포와 섬유단백 침전, 수입 임파관 종창 등의 현상을 관찰할 수 있었다. 임파관은 유동배지와 같이 성장 능력이 있는 세균을 연속 혈액 내에 운송한다. 이런 세균들이 최초에는 비장과 기타 망상내피 계통에서 여과하지만

말기의 10~14시간에는 균혈증의 정도가 이전보다 가중된다. 따라서 가축체내 각 부위의 결합조직중 장액성 삼출 및 출혈, 피하조직의 황색 교양침윤 및 출혈양상이 나타난다. 장막하의 푸석푸석한 결합조직 특히 종격, 장간막, 신장주위 및 연접막 등 부위에는 수종과 출혈이 나타나며 임파절은 종대 및 출혈, 절단면 홍조, 작은 출혈점등 병변이 일어난다. 전형적인 예에서는 비장이 급성 종창되어 몇 배로 종대하고 검은 보라색을 띠며 콜-타르양 비수와 혈액이 충만된다. 심근은 회홍색이고 부드러우며 심내막하에서는 출혈현상을 관찰할 수 있으나 수종은 없다. 소장 점막 혹은 점막하에 충혈, 종창이 있으며 Peyer's patch는 종대, 출혈된다. 장 병변부에서는 종창 및 괴사가 있으며 체강에는 검붉은 액체가 있다. 혈액은 응고 불량으로 진한 자주색 콜-타르양을 보인다.

산양, 염소는 심한 급성경과를 보이며 사망한다. 혈액중 보통 탄저균이 대량 존재하며 비장, 임파절이 조금 커질 뿐 보통 현저한 육안 소견은 없다. 돼지는 인후두부에 염증이 나타나며, 주위 결합조직의 교양수종이 동반되고 출혈성 침윤, 인, 후두 및 임파절 종대, 출혈 및 괴사, 절단면 건조, 무광택, 붉은 벽돌색, 회색 및 황색의 괴사병변 등을 관찰할 수 있다. 편도선에서는 한 층의 황색 딱지가 있고 그 아래 몇 mm조직은 괴사된 것을 볼 수 있다.

실험동물의 탄저는 대부분 인공 감염으로 일반적으로 접종용량이 많아 다수는 조기에 죽는다. 병리 반응이 불충분하고, 부검에서 주사부위 피하조직 침윤, 교양 침윤 및 삼출, 간장, 비장 출혈 종대 등의 소견이 있으며 보통 비장 임파절에서 탄저균을 검출해낼 수 있다.

나. 사람 탄저의 병리변화

1) 피부탄저

주로 탄저용을 형성한다. 병변부위 부근에 조직세포가 침윤하고 중앙괴사부위는 파져 들어가 검은 딱지가 형성된다. 수종이 확산되면 주위 임파절을 침범하여 임파절염이 나타날 때도 있다. 병리 조직 검사에서 피하 봉와조직에 장액 출혈성 염증이 나타나며, 조직 성분의 해리가 나타날 때도 있다. 간질성 수종도 아주 현저하며 혈관의 고도 확장 및 부분적 괴사와 혈전이 형성된 것도 관찰할 수 있다. 피

사부위, 비교적 깊은 조직 틈새 및 임파관 내에서 모두 탄저균을 검출해낼 수 있다. 단순한 탄저성 염증은 화농하지 않는다.

2) 장탄저

주요 병변은 소장내에 있다. 대장이나 위의 병변은 아주 적으며 장벽에 국한성 혹은 미만성 출혈성 침윤이 나타나고, 궤양성 과정 및 주위의 출혈현상도 보인다. 장간막 임파절이 종대되고 출혈성 염증이 보이며 복막에도 출혈성 삼출성 염증이 있고 복강내 대량의 혈성 섬유단백성 삼출액이 있을 수 있으며 삼출액에서 대량의 탄저균을 검출해낼 수 있다.

3) 폐탄저

출혈성 기관염, 기관지염, 기관지폐렴, 소엽성 폐렴 혹은 폐 경색구역이 나타난다. 폐내 출혈이 많으며, 폐문 및 종격 임파절에 혈성 침윤이 있다. 흉막에 출혈성 염증 양상이 존재한다. 흉강과 심낭에 고인 액체와 폐내 삼출물 혹은 혈성 가래중에서 탄저균을 검출해 낼 수 있다.

이외 뇌막염형 탄저는 대부분 계발성이며, 연뇌막, 뇌실질에 모두 출혈성 침윤과 괴사가 있다. 연뇌막에 위치해 있는 뇌조직에 뻗어 들어간 돌출부에 혈관 주위성 뇌내 출혈이 있을 수 있다. 뇌 및 뇌막출혈, 적혈구 삼출이 있을 뿐만아니라 혈관 괴사 및 파열이 있다. 대뇌, 교뇌 및 연수의 절단면에서도 현저한 수종 및 충혈 양상을 관찰할 수 있으며 대량의 탄저균도 검출해 낼 수 있다.

V. 진단 및 치료

1. 임상학적 진단

탄저는 보통 급성경과를 취하지만 경증형과 임상증상이 비전형적인 병례도 있다. 주로 역학자료, 임상증상 및 실험실검사에 근거하여 탄저라고 진단한다. 그 외에도 혈청학적 방법은 보조 진단에 필요한 수단으로 기타 질병과의 감별에 많이 사용된다.

가. 탄저의 임상학적 진단

초식동물에서 특이증상 없이 갑자기 폐사한 경우에는 일단 탄저로 의심하여야 하고, 사체의 구강, 항문, 비강 등으로부터 응고되지 않은 혈액의 출혈이 있을 때는 탄저일 확률이 매우 높기 때문에 탄저로 확진하기 위하여 탄저에 대한 정확한 검사를 실시하여야 한다.

탄저로 의심되면 동물의 흉복강을 열지 말아야 하며 유출한 액체가 환경을 오염하지 않도록 하여 아포 형성을 방지하여야 한다. 이근부 외곽에서 작은 상처를 내거나 혹은 작은 조직을 떼어 혈액을 슬라이드에 도말하여 검사하여야 한다. 혈액은 응고가 아주 늦으며 검은 색을 띠고 용혈성을 보인다. 만약 사체를 절개하면 흑색 응고부전 혈액이 유출되고, 출혈된 비장이 종대된 것을 볼 수 있으며 기타 장기에서는 혈반과 출혈, 장점막 흑홍색과 수종 및 괴사소 등을 관찰할 수 있다. 혈액도말 슬라이드는 반드시 건조후 혐막 염색을 실시한다. 즉시 가열 혹은 Methanol 고정액에 10분간 담갔다가 다색성 polychrome methylene blue액으로 30초간 염색한다. 그리고 차염산 용액으로 세척하고 건조후 현미경으로 자홍색 혐막물질과 짙은 남색 간균을 검사한다. 초식동물에서는 사체의 혈액도말 염색으로 혐막의 존재와 bacilli의 존재로 일단 의사환축으로 진단할 수 있다. 민감성 높은 동물은 사망시 혈액중 균 함량은 $10^8/ml$ 보다 많다. 만약 동물이 항생제를 사용한

적이 없다면 영양배지에서 쉽게 탄저균을 배양해낼 수 있다.

말의 소장 및 실질성 조직은 소, 양보다 감염정도가 좀 경하다. 그리고 피하와 근육조직은 수종이 나타날 가능성이 있다. 돼지 및 육식동물에서는 국소적인 부종(local edema), 림프절(특히 하악 및 인후두 림프절)의 부종증상을 보이고 폐사한 경우에 의심하여야 한다. 만약 목부위에 수종이 있으면, 종대된 아래턱뼈와 연상 임파절에서 임파액을 수집하여 도말하여 현미경으로 검사하여야한다. 만성 국소형 돼지 탄저에서는 일반적으로 턱아래, 연후, 귀아래와 목 임파절중 하나가 병변이 있으면, 종대된 절면은 벽돌홍색이다. 돼지 장형 탄저는 아주 적다. 손상된 소장 점막은 충혈 혹은 괴사양상을 나타내지만 비장은 거의 변화가 없다. 육식동물 중에서는 혀, 연후, 신장과 소장의 염증반응이 나타날 가능성이 있으며 수종이 동반된다.

심하게 부패된 시체에서는 도말과 배양방법으로는 진단할 수 없다. Ascoli는 1911년에 가열침강반응법(Thermo-precipitin reaction)으로 조직중 잔류 탄저균의 항원을 검사하는 방법을 수립하였다. 현재는 탄저균에서 독소 항원을 추출할 수 있는 기술이 개발되어 이 항원을 이용한 특이하고 민감한 ELISA방법이 광범위하게 동물 탄저의 혈청학적 진단에 응용될 수 있게 되었다.

나. 감별진단

탄저는 다른 급성질환과 감별되어야 한다. 급성 고창증과 같은 대사성 질병과 기종저, 악성수종, 출혈성 패혈증과 같은 감염성 질병, 초산염 중독과 같은 중독증과 구별되어야 한다.

2. 실험실 검사

탄저균의 분리, 특이성 항원과 항체의 검사는 본 병의 조기 진단과 최후 확진에 중요한 의미가 있을 뿐만 아니라 탄저의 역학조사, 전염원, 전염경로를 밝히고 외부 환경의 오염구역에 대한 소독효과를 평가하는 중요한 수단이다.

탄저의 실험실적 진단은 크게 원인균의 분리동정 및 혈청학적 방법으로 대별할 수 있으나, 원인체 분리동정이 기본원칙이다. 탄저균의 분리동정은 가검물에서 뿐

만아니라 주위 토양 등 환경에서도 가능하다. 탄저병은 심급성의 경과를 취하기 때문에 대체적으로 폐사한 후 발견되는 경우가 대부분이다. 그러므로 가검물의 병력을 참고하여 원인체를 분리 동정함으로써 진단할 수 있다. 사람의 경우에도 병변부위로부터 원인균의 분리를 시도할 수 있다. 분리된 탄저 의심균은 여러 가지 생화학적 동정, 실험동물을 이용한 병원성검사 및 탄저균의 침강소혈청을 이용하여 동정할 수 있다. 균 분리 동정은 가검물(사체, 장기 등) 및 환경으로부터 탄저균의 분리방법을 이용하여 실시한다. 일단 의심균은 탄저균 특유의 집락형태 (Medusa head) 및 염색성(Capsule, 죽절상 모양) 등에 의해서 일차 확인할 수 있으며, 동정을 위한 혈청학적인 항원검사 방법으로는 면역 가토혈청을 이용한 가열 침강반응(Thermo-precipitin reaction; Ascoli test), 면역확산반응(Agar gel immuno-diffusion test, AGID), 면역형광항체법 (Immunofluorescence antibody techniques), Immunoradiometric assay 등이 있으며, 혈청학적인 검사는 주로 간접적으로 탄저의 감염 또는 감염후 회복이나 백신의 효과를 확인하기 위하여 사용하며 PA를 이용한 ELISA법이나 간접혈구응집반응(Indirect haemagglutination) 이 주로 사용되고 있다.

가열침강반응은 탄저의 진단을 위해서 오래전부터 사용되어온 진단법으로 항원은 사체의 혈액, 부종액, 비장 등의 자발침출액을 사용하고 탄저 침강소 혈청이 항체로 이용되고 있다. Ascoli등은 침강소혈청의 생산은 강독의 생균만을 사용하였을 때 얻을 수 있으며 약독균이나 사균을 사용하였을 때는 얻을 수 없다고 보고한 반면 고수(1955)는 탄저 강독주와 약독주간에 주 침강소의 산생에는 차이가 없으나 강독주 사용시에는 부침강소의 산생이 약하여 교차반응이 나타난다고 보고하였다. 1967년 차연호등은 탄저 침강소혈청 제조에 사용되는 탄저균주간의 항원성과 과민성의 차를 조사하고 균주간의 과민 차이가 있는 균주의 단백질 조성을 조사하기 위하여 탄저 강독 17주와 약독 3주를 배양하여 시험한 결과 균주에 따라 면역원성에 많은 차가 인정되었으나 균주의 독력차에 의한 면역원성에는 차이가 없었다고 보고하였으며 특이성이 우수한 높은 역가의 탄저침강소혈청을 생산하였다. 이후부터 차연호 등의 방법에 의하여 수의과학검역원에서는 탄저침강소혈청을 매년 생산하고 있으며 생산된 침강소혈청은 국립수의과학검역원 각 지원

과 각시도 시험소에 배포하여 탄저 진단용으로 사용하고 있다.

가. 세균학적 방법

1) 가검물 채취

가) 신선한 시료: 탄저의 국부 병소의 삼출액을 멸균된 면봉으로 도말후 혈액한 천배지 혹은 선택 배지(PLET)에 접종하거나 액체 배지에 접종한다. 말초 혈액, 경정맥혈, 비장을 채취하여 위와 같은 배양접종 방법으로 배양한다. 동시에 삼출액, 혈액, 뇌척액 등을 직접 슬라이드에 도말후 협막 염색하여 현미경으로 검사한다. 돼지의 국소형은 인후두부 임파절, 장염형은 병소부근의 임파절을 검사한다.

나) 오래된 시료: 탄저 사체가 이미 부패되었거나 혹은 가죽, 뼈, 발굽부위 혹은 매장한 내장 밖에 찾을 수 없으면 되도록 건조된 혈액 덩어리가 있는 시료를 찾아서 배양하는 것이 좋다. 심하게 오염된 시료는 선택배지(PLET)를 사용하여 기타 잡균의 간섭을 피하는 것이 바람직하다.

다) 외부환경시료: 주로 토양, 오수, 분변, 모피 그리고 공기중 균이 오염된 aerosol에서 채집한다. 토양은 물로 세척할 수 있다. 위에 뜬 상층액을 선택배지에 접종한다. 오수와 분변도 위에서와 같이 물위에 뜬 부분을 시료로 채취하여 접종 배양한다. aerosol은 공기 시료를 채집하는 기계 혹은 배기 펌프로 공기를 뽑아 액체 배지에서 여과되어 나가게 된다. 보통 300~500L(30L/m)속도로 연속 10~20분 뽑는다. 그리고 액체배지를 실온에서 배양한다. 다양한 잡균을 제거할 때 65℃에서 25분 배양하여 선택배지에 재접종한다.

보통배지는 37℃에서 24시간 배양하면 건조하고 회백색을 띠며 올라오지 않고 해성과 같은 양상을 띠는 탄저균 집락을 나타낸다. 저배율로 확대하여 보면 곱슬머리 모양의 Medusa head를 관찰할 수 있으며 경우에 따라 균 주위에 실오리 같은 것이 밖으로 뻗어 나간다. 정지상태에서 배양한 액체배지에서는 솜 같은 것이 발육하고, 배지 자체는 투명하며 균막 혹은 벽환은 없다.

2) 감별실험

탄저균은 주요 유사균들과 감별하여야 한다. 예를 들면 *bacillus cereus*,

mushroom-like bacillus, 거대간균, hay bacillus 등의 균은 형태학적 및 생화학적 특성이 아주 유사하다. 하지만 탄저균은 혈액배지에서 용혈성이 없고, 당 발효에서 포도당, 맥아당, 자당만 분해하고, 살리실산은 분해하지 않는다. 일반적으로 penicillin에 민감하다. 5~10U만 사용하여도 발육이 억제되고, 0.1U를 사용하면 균체에 구슬목걸이 형태가 나타난다. 체내에서는 탄저균의 전형적인 협막을 관찰할 수 있으며 혈청 및 NaHCO₃가 함유된 배지에서 CO₂조건으로 배양하면 점액양상을 띤 집락이 형성되고 다색 polychrome methylene blue나 다른 협막염색법으로 염색하여 협막을 관찰할 수 있다. 탄저균은 bacteriophage에 민감하고 phage splitting assay에서 양성 결과를 나타낸다. 탄저균과 유사균과의 주요감별 진단기준은 표 4에서 보는 바와 같다.

표 4 탄저균과 유사균과의 감별진단

검사항목	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	mashroom-like bacillus	거대간균	hay bacillus
집락형태	혜성모양	변두리불일정	뿌리처럼생장	변두리불일정	변두리불일정
색상	회백색	왁스광	백회색	백회색	주름이 있음
broth 성장	숨모양상층	숨모양/좀흐림	숨모양/좀흐림	숨모양/좀흐림	균막이 있음
용혈반응	무	용혈	용혈/비용혈	용혈	용혈
salicylic acid	분해않함	분해	분해	분해	분해
penicillin	균억제 ⁽¹⁾	발육	발육	발육	발육
Motility	무	무/유	유/무	유/무	유
협막	유 ⁽²⁾	무	무	무	무
phage splitting	+	-	-	-	-
동물실험(치사균량)					
mouse ⁽³⁾	1-30개균	10 ⁵ 개균	대량	대량	대량
rat	100-300개균	대량	대량	대량	대량
rabbit	1000-3000개균	-	-	-	-

주: (1) 탄저균중 간혹 penicillin내성균주가 있다.

(2) 탄저 약독주는 협막이 없을 수 있다.

(3) 기타균도 대량 존재하면 mouse에 치사작용이 있다.

2) 탄저균 검사

각 가검물에서 분리된 의심되는 탄저균을 최종확인하기 위한 주요 검사항목은 표 5와 같다.

표 5. 탄저 주요 검사항목

검사항목	판독시간 (시간)	항목별실험결과		탄저균 판정결과
		탄저균 부정	탄저균불확실	
집락형태	10-16	뿌리모양집락	사자머리모양집락	곱슬머리모양
broth 배양	8-14	균막 형성	숨모양 발육	숨모양 발육
Hemolysis	10-16	+	-	-/+
Motility	8-14	+	-	-
phage splitting	8-16	-	±	+
협막검사 ⁽¹⁾	14-16	-	-	+
penicillin inhibition assay ⁽²⁾	10-16	non-inhibition	inhibition	inhibition
NaHCO ₃ plate CO ₂ 배양 ⁽³⁾	18-24	Rough colony	Rough colony	Mucoid colony

주: (1) 무협막 균주가 존재한다.

(2) penicillin 내성균주는 cephalosporin으로 실험한다.

(3) 무협막 약독주는 R형 집락이 나타난다.

가) 배양검사

탄저균으로 의심되는 균은 혈액 한천배지와 액체배지에 접종하여 37℃에서 8~16시간 배양한다. 유백색의 헤성모양의 집락을 형성하고 저배율로 확대해보면 곱슬머리모양의 Medusa head의 특징적인 형태를 확인한다. 또한 탄저균은 혈액한천배지에서 용혈성을 보이지 않으며 경우에 따라서 집락주위에 미약한 용혈을 보이기도 한다. 정지 상태에서 액체 배지에서 자란 균은 숨모양으로 발육하며 배지 자체는 투명하며 균막과 벽환을 관찰할 수 없다.

나) 염색

백색 집락을 선택하여 백금 루프로 찍어내면 점성이 강하고 실이 뽑히는 것과 같은 현상이 있다. 면양 혈청 액체배지 혹은 섬유질을 제거한 말 혈액, 토끼 혈액에 접종하여 배양한 후, slide에 도말하여 그람염색과 협막염색하고 현미경으로 세균형태나 협막형태를 관찰한다.

많이 사용하는 탄저균 및 아포의 염색방법은 주로 세 가지 방법이 있다.

(1) 그람 염색법

- ① 슬라이드에 도말후 화염 고정하고 crystal violet으로 1~2분간 염색한다.
- ② 물로 헹군 후 슬라이드에 Iodine액을 떨어뜨려서 1~2분간 고정한다.
- ③ Iodine액을 버리고 물로 세척후 95% 알코올로 잠시동안 탈색한다. 이때 슬라이드를 수시로 흔들어주어야 하고 탈색 소요시간은 도말의 두께와 관련된다.
- ④ 물로 세척후 safranin염색액으로 1~2분간 염색하고, 물로 깨끗이 세척하고 물방울을 닦고 현미경으로 검사한다.

탄저균은 아주 전형적인 그람 양성으로 긴 연쇄간균을 관찰할 수 있다. 균단은 장방형으로 연쇄간균은 마치 낚시대모양의 죽절상으로 관찰된다. 배양물 보관시간이 너무 길면 가음성이 나타날 수 있으므로, 특히 배양시간이 긴 배양물은 반드시 주의하여야 한다.

(2) 아포 염색법

(가) malachite green 모래 황색 아포 염색법

- ① 슬라이드에 도말하여 불에서 고정후 malachite green염색액을 떨어뜨리고, 증기가 3~5분간 날 때까지 가열한다.
- ② 물로 세척하고, 다시 모래 황색 염색법으로 0.5~1분 염색한다.
- ③ 물로 깨끗이 세척하고 물방울을 닦아내고 현미경으로 검사한다. 탄저균체는 붉은색으로 염색되고, 아포는 녹색으로 염색된다.

(나) safranin 아포 염색법

- ① 염색전 불에서 도말한 슬라이드를 고정하여 말린 후 염색한다.
- ② 먼저 phenol, carbolic acid safranin으로 염색하고, 증기가 생길 때까지 가열하고 약 5분간 지속하는데 염색액이 마르지 않도록 주의하여야한다.
- ③ 물로 세척후 95% 알콜로 2분간 탈색한다.
- ④ 물로 세척후 methylene blue염색액으로 0.5~1분간 염색한다. 염색시간이 너무 길지 않도록 주의하여야한다.
- ⑤ 물로 세척후 물방울을 닦고 현미경으로 검사한다. 현미경하에서 푸른색 균체, 붉은색 아포를 관찰할 수 있다. 아포 형태는 타원형이고, 균체 중앙에 위치해 있으며 포자낭도 팽대하지 않는다.

(3) 협막 염색법

(가) 다색성 methylene blue 염색법

혈액 혹은 조직액을 슬라이드에 도말하여, 자연적으로 건조된 후 가열하여 고정한다. 혹은 메탄올 혹은 알콜로 1분간 고정하여 말린 후 슬라이드에 다색성 methylene blue 염색액을 크게 한 방울 떨어뜨린다. 접종환으로 균일하게 도말하여 3~5분간 염색한다. 그리고 차염산 용액에서 탈색하고, 물로 깨끗하게 세척하여 물방울을 닦고 현미경으로 검사한다. 그러면 남색 탄저균, 붉은색 협막을 관찰할 수 있다. 염색시간이 너무 길지 않도록 주의하여야 한다. 만약 협막이 뚜렷하게 보이지 않으면 염색시간을 좀 연장할 수 있다.

(나) Indian ink 염색법

조직액 혹은 협막이 있는 균 배양액 한 방울과 접종환으로 Indian ink 한 방울을 따서 혼합한다. 안과 포셉으로 cover glass를 슬라이드에 덮고 저배율 현미경으로 균체를 찾은 후 고배율에서 관찰한다. 광선을 강하게 주면 균체 주위에 뚜렷이 비후된 협막을 볼 수 있다. 먹액이 너무 짙으면 희석하여 사용하여야 하며 접종환을 사용후 불에서 소독하는 것을 잊지 말아야한다.

다) phage splitting assay

피검사균을 agar plate에 접종하고 좀 건조된 후 탄저진단 phage를 떨어뜨린다. 37°C에서 10~18시간 배양하고 결과를 관찰한다. 뚜렷한 plaque가 있으면 phage splitting 양성이라고 판정한다.

라) penicillin inhibition assay

100U/ml penicillin 용액을 45~50°C로 냉각된 agar에 10U/ml 농도로 첨가한 후 페트리디쉬에 즉시 붓는다. 굳은 후 피검사균을 접종한다. 혹은 여과지를 10U/ml penicillin 용액으로 적셔서 피검사균을 접종한 agar plate 표면에 부쳐놓는다. 37°C에서 8~10시간 배양하고 균억제 부위의 유무를 확인한다. penicillin 억제균주 외 일반적으로 모두 선명한 균억제 현상을 관찰할 수 있다.

마) 동물실험

350~400g 체중의 건강한 기니픽 혹은 체중이 2~2.5Kg인 건강한 토끼를 선택하여 탄저균의 병원성을 검사한다. 기니픽의 감염용량은 100~500개 아포이고, 토끼는 1,000~5,000개 아포이다. 피하 주사를 실시하여야 부종 반응의 특성을 관찰하기 편리하다. 탄저 강독균은 보통 72시간 내에 실험동물들을 치사시킬 수 있다. 폐사 동물을 부검하면 비장 충혈, 종대, 피하수종, 주사부위 임파절 종대 등의 양상을 관찰할 수 있다. 비장과 임파절을 impression smear에서 전형적인 협막이 있는 탄저균을 찾아볼 수 있다.

바) Sodium bicarbonate 첨가 배양

0.9% NaHCO₃가 첨가된 한천배지에 접종하고 5~20% CO₂ 조건하에서 18~24시간 배양하면 점액형 집락이 형성된다. 이 집락을 슬라이드에 도말하면 현미경으로 세균 협막을 검사할 수 있다. 탄저균은 무협막 균주가 존재하며 이들은 R형 집락을 형성한다.

3) 균주보관방법

균주를 보관하는 것은 매우 중요한 일이다. 탄저균은 제때에 보존하고 유지하는 것과 함부로 다루거나 처리해서는 안됨을 잊어서는 안된다.

가) 간이 냉동 보관

혈액배지에서 1~2일간 배양한 후 잡균이 없는 탄저균을 긁어 모아 skim milk와 혼합한 후 cryotube에 1ml씩 무균적으로 분주한다. -20℃ 이하에서 냉동 보관한다. 냉동보관한 튜브 중에서 반드시 견본을 뽑아 개봉후 적당한 배지에서 성장검사를 하여 순수함을 확인한 다음 라벨을 붙이고 기록한다.

나) 동결 건조 보관

혈액배지에서 1~2일간 배양한 후 잡균이 없는 탄저균을 긁어 모아 skim milk와 혼합한 후 냉동건조용 유리병에 2~3ml씩 무균적으로 분주한다. 저온에서 신속히 냉동시킨 후 진공을 걸어 감압하여 균액중의 액체가 직접 기체로 변하여 배출되므로 건조하는 목적에 도달한다. 동결 건조 기술의 관건은 적당한 냉동조건 즉 반드시 매체의 공동 용점온도 이하 온도에서 건조하여야만 균액중의 수분이 90% 이상 배출될 수 있다. 잔여 수분은 그 후 수시간내 계속 배출된다. 동결 건조하여 진공 포장한 앰플은 10년이상 보관할 수 있으며 균종의 생물학적 특성, 독력 및 면역원성은 기본상 변하지 않는다. 동결 건조한 유리병중에서 반드시 견본을 뽑아 개봉후 적당한 배지에서 성장검사를 하여 순수함을 확인한 다음 라벨을 붙이고 기록한다.

다) cryobank를 이용한 보관

평판배지에서 순수배양된 세균집락을 cryobank시험관의 beads내에 백금이를 사용하여 무균적으로 접종한 다음 세균이 접종된 cryobank시험관을 vortex를 이용하여 2~3회 혼합한 후 멸균된 피펫을 이용하여 시험관내의 용액을 제거한 다음 라벨링하고 -70℃ 냉동고에 저장한다. 회수할 때에는 배양하고자하는 cryotube를 -70℃ 냉동고에서 꺼내어 실온에 10~20분 방치한 다음 멸균된 백금이를 이용하여 bead를 1~2개정도 꺼내어 적절한 증균배지나 평판배지에 도말하고 배양한다.

cryotube는 다시 -70°C 냉동고에 재차 보관한다.

나. 혈청학적 방법

혈청학 방법에는 탄저 침강소혈청을 이용하여 사람 혹은 동물 탄저 사체 부패 견본, 탄저균 오염모피 등을 검사하여 탄저균 오염여부를 확인하는 방법, 환축이나 환자의 혈액에서 협막항체를 검출하여 임상진단과 추적진단을 하는 면역형광법, 백신접종우 혹은 치유환자의 방어항체(Anti-PA)를 검사하여 체내의 면역수준을 측정하는 ELISA법 등이 있다.

1) 협막 항체 검사법:

협막 항체 검사에는 보통 침전반응법(실험관 가열침강반응과 아가 면역확산반응), 면역형광항체법, 간접 혈구응집반응법이 포함되어있다.

가) Ascoli test

탄저 침강소 혈청은 탄저균을 토끼에 정맥주사하여 면역시킨 후 agar 확산 실험에서 역가가 1:16이상이 되면 채혈하여 분리한 혈청이다.

(1) 가열침강반응: 피검 샘플에 물을 5~10배 넣고 10분간 끓인 후 2,500 rpm에서 원심하여 상층액을 받는다. 0.3~0.5ml 침강소 혈청을 Ascoli test tube에 넣고 파스퇴르 피펫으로 피검 항원을 튜브벽을 따라 가볍게 침전소 혈청위에 첨가한다. 몇 분 후 항원 항체 경계면에 백색 침전환이 나타나면 양성 판정을 내린다.

(2) 면역확산반응: 순도가 높은 Noble agar를 PBS(pH 7.2~7.4)로 용해하여 1% agar를 만들어 페트리디쉬에 분주한다. 두께는 약 0.3cm이며 응고 후 punch로 agar에 well을 낸다. well직경은 0.5cm, well간 간격은 0.5cm이다. 중앙 well에 항협막 면역 혈청을 첨가하고 주위 well은 피검 항원을 well당 0.1ml씩 첨가한다. 습도가 유지되는 상자에 넣고 37°C 에서 10~24시간 반응시킨다. 육안적으로 관찰할 수 있는 뚜렷한 백색 침전대가 나타나면 양성판정을 내린다.

나) 면역형광항체법

(1) 협막 항원편 제작: 양 혈청 액체 배지(1:1) 혹은 sodium bicarbonate (0.9%) agar plate에 Pasteur No. 2 균주를 접종한다. 그리고 5~20% CO₂ 조건에서 배양하여 균 밀도가 높은 현탁액을 만들어 슬라이드당 8개 도말하여 자연 건조 후 불에서 고정하였다가 사용한다. 그러나 너무 두껍게 도말하지 않도록 주의하여야한다.

(2) 면역 형광법: 고정한 협막 슬라이드를 준비하여 희석된 가검 혈청(1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 희석 비율)을 슬라이드의 7개 도말에 순서대로 첨가한다. 남은 8번째 도말에는 탄저 음성 혈청을 대조군으로 첨가한다. 혈청은 도말 표면을 덮을 수 있을 정도로 첨가하고 젖은 거즈가 있는 박스에 수평으로 놓고, 37°C에서 30분간 반응시킨다. 그 다음 슬라이드를 꺼내서 혈청을 제거하고 0.01M PBS(pH 8.0)로 가볍게 몇번 세척하고 증류수로 가볍게 1분간 세척한다. 말린 후 도말에 FITC anti-sheep(rabbit) IgG conjugate를 첨가한다. 작용시간, 세척 방법은 위와 같다. 반드시 양성 대조군이 있어야 하며 이미 알고있는 양성 혈청을 사용하고 형광 현미경하의 형광 정도를 “++”이상인 것을 양성 대조군으로 삼는다. 형광 현미경 검사 결과의 판정 표준은 다음과 같다.

“++++” 협막 비후, 밝은 녹색 형광, 중간 균체 무 형광

“+++” 협막 비후, 밝은 황녹색 형광, 중간 균체 무 형광

“++” 협막 비후, 좀 약하고 뚜렷한 황녹색 형광, 중간 균체 무 형광

“+” 협막 뚜렷하지 않고, 균 형태가 어렵듯이 분명하지 않음

“-” 무 황녹색 형광, 균 형태가 어렵듯이 분명하지 않음

“++” 이상을 양성으로 판정한다.

2) 방어항체 측정법

혈청학적인 검사는 주로 간접적으로 탄저의 감염 또는 감염후 회복이나 백신효과를 확인하기 위해 사용한다.

가) ELISA

ELISA로 탄저 Tripartite 독소중 PA에 대한 항체를 측정한다.

(1) PA항원 준비

개량된 RM 또는 R-medium 배지에 Sterne균주를 접종하여 37°C에서 23~28시간 배양한 후 즉시 여과하여 균체를 제거한다. 여과한 항원을 ammonium sulfate를 첨가하여 침전 농축시킨 후 Anion-exchange, Gel-filtration, Hydrophobic-interaction column을 사용하여 high performance column chromatography system을 이용한 정제 또는 항 PA혈청 IgG affinity column으로 정제하여 고순도의 PA를 만든다.

(2) coating 및 반응

coating buffer(pH 9.6)로 PA를 0.5~1 μ g/ml의 농도로 희석하여 96 well EIA plate에 well당 100 μ l씩 넣고 4°C에서 overnight하여 coating한다. 항원을 제거하고 0.05% Tween20이 포함된 PBS로 세 번 세척한다. 2% bovine serum albumine 또는 1% skim milk로 1시간 blocking한다. 다시 세 번 세척한다. 원하는 배수로 희석한 혈청을 well당 100 μ l 넣고 37°C에서 1시간 동안 incubation한 후 혈청을 제거하고 세 번 세척한다. HRP-IgG를 well당 100 μ l 넣고 37°C에서 1시간 동안 incubation한 후 세 번 세척한다. Substrate를 well당 100 μ l 넣고 실온에서 정치하면서 반응을 지켜본 후 적당한 시간이 되었을 때 3M H₂SO₄용액 50 μ l를 넣어 반응을 중지시킨다.

(3) 결과판독

P/N value가 2이상일 때 양성으로 판정한다.

다. 분자 생물학적 방법

전통적인 그람 염색, 협막 염색, 동물감염 실험, 면역학적 실험과 phage splitting assay는 비교적 오랜 시간이 필요하다. 급성경과를 취하면서 인수공통질병인 탄저는 고도로 민감하고, 신뢰도가 높으며, 신속하고 간편한 탄저균 검색방법을 수립하는 것이 필요하다. 현재 우리 나라에서도 분자 생물학적 방법을 이용한 탄저균 검색방법이 개발되어 사용되고 있다.

1) Multiplex PCR

PCR은 선택적으로 체외에서 DNA를 증폭하는 방법으로서, 아주 미량의 genome DNA를 template로 하고, 한 쌍의 primer의 인도하에 polymerase DNA의 반복적인 작용을 통하여 몇 시간내 필요한 DNA fragment를 100만~200만 배로 증폭한다. 이 방법은 이미 많은 질병의 진단에 많이 응용되고 있다. 성공의 관건은 primer를 작성하는데 있다. 일반적으로 primer를 설계하는 원칙대로 primer를 선택할 수 있고, 필요할 때에는 컴퓨터로 구조분석을 할 수도 있다. 탄저균 혐막 plasmid와 독소 plasmid중의 각각의 특이 fragments를 PCR방법으로 증폭하고 두 가지 primer의 특이성과 민감성을 확인하였다.

가) DNA분리(Genomic DNA purification kit. Promega A1120)

탄저균 배양액을 12,000~15,000 rpm으로 원심하여 균을 회수한 후 50mM EDTA 480 μ l를 넣고 완전히 부유시킨 후 10mg/ml Lysozyme 120 μ l를 넣고 잘 부유시킨다. 37 $^{\circ}$ C water bath에서 30~60분간 반응시켜 cell을 lysis시킨 후 12,000~15,000rpm으로 원심하여 pellet을 회수한다. 여기에 Nuclei lysis sol.을 600 μ l 넣고 잘 부유시킨 뒤 80 $^{\circ}$ C water bath에서 10분간 반응시켜 핵막을 lysis시킨다. 여기에 RNase solution 3 μ l을 첨가하고, 완전히 섞은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 15~30분간 반응시키고, 실온으로 식힌다. Protein precipitation sol.을 200 μ l 넣고 20초간 격렬하게 잘 섞은 후 얼음에 5분간 정치시켜 protein을 침전시킨다. 12,000~15,000rpm으로 원심하여 상층액 600 μ l를 조심스럽게 다른 튜브로 옮긴다. 여기에 Isopropanol 600 μ l를 넣고 가볍게 튜브를 흔들어 DNA가닥이 보일 때까지 섞어준다. 12,000~15,000rpm으로 원심하여 DNA를 회수하고 여기에 70% Ethanol을 넣고 원심 침전시켜 DNA pellet을 washing한다. pellet의 수분을 제거하고 TE buffer(pH8.0)로 부유시킨 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

나) DNA증폭

멸균된 PCR tube에 반응액을 만든다.

10 \times PCR buffer	5 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l

10mM dNTP s	1 μ l
primer(forward & reverse)	각 1 μ l
template DNA	1 μ l
Taq DNA polymerase	1 μ l
D.W	to 50 μ l

94°C에서 5분간 initial denaturation하고 아래와 같은 반응조건으로 증폭순환한다. 94°C에서 denaturation 1분, 58°C에서 annealing 1분, 73°C에서 extension 1분을 30번 반복한다. 다시 73°C에서 extension을 5분간 하고, 4°C에서 보관한다.

다) 증폭산물의 확인

1% agarose gel을 만들고 2 μ l의 loading buffer에 10 μ l의 증폭산물을 섞어 전기영동한다. 염색한 후 결과를 관찰한다.

라) Primer

탄저균의 주요 병원성인자인 협막과 독소의 유전자를 암호하고 있는 Capsule plasmid(pXO2)와 Toxin plasmid(pXO1)에 대한 특이적인 primer를 합성하였고, 이들 primer의 염기서열은 표 6과 같다.

표 6. Nucleotide sequences of primers

primers	nucleotide sequence	location	size(bp)
CAP 9	ATGTATGGCAGTTCAACCCG	617-636	778
CAP 102	ACCCACTCCATATAACAATCC	1394-1375	
PA 8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	2452-2471	597
PA 5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	3048-3029	
EF 3	CAACCTAATCCATGTCACTG	42-56	1248
EF 4	TTCCACACCTTCTTTCTTC	1271-1289	
LF 10	AGCCACAGCATCGATGTT	1460-1479	861
LF 11	ATCCTGCTCGAGTATCTGGT	2320-2339	

마) PCR 사진

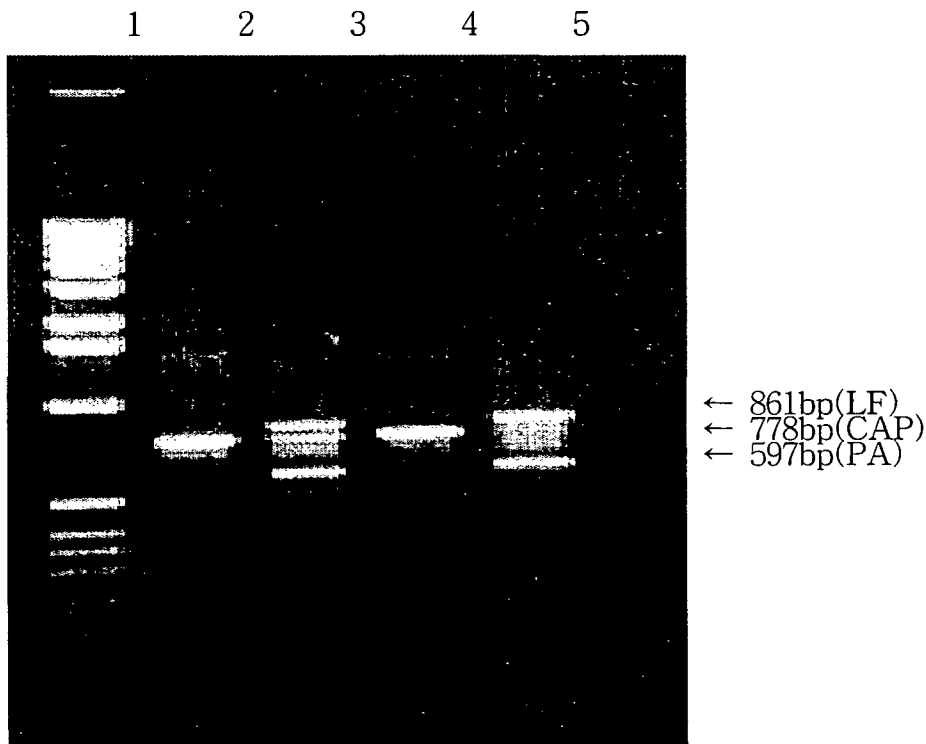


그림 3. *B. anthracis* Genomic DNA에서 Multiplex PCR에 의한 lethal factor (LF), protective antigen(PA), capsule(CAP) gene을 동시 검출
lane 1. 1kb ladder, lane 2. *B. anthracis* Bongchun strain, lane 3, *B. anthracis* Kyungju strain, lane 4. *B. anthracis* ATCC 14578 and lane 5. *B. anthracis* Sterne strain

2) plasmid electrophoresis map analysis

plasmid analysis는 균주 감별, 전염원 및 전파 경로를 추적하는 한가지 기술로서 탄저균의 두 가지 plasmid에는 각각 encoding된 독소와 협막이 있다. plasmid에 근거하여 균주의 독력의 정도를 판정할 수 있으므로 plasmid electrophoresis map analysis는 유사 탄저 균주를 분석하고 감정하는 아주 유용한 방법이다. 방법은 아래와 같다.

plasmid를 추출하려는 균주를 5ml broth배지에 접종하여 37°C water bath에서 12시간 동안 진탕하면서 배양한다. 1ml을 따서 5ml의 새로운 배지에 접종하여 3

7°C water bath에서 진탕하면서 배양한다. 최고로 배양이 되었을 때 1.5ml을 따서 8,000 rpm에서 5분간 원심하여 상층액을 버리고 한 번 반복한다. Solution I [lysozyme 10mg, 0.5mM EDTA 20 μ l(pH8.0), 1mM Tris-HCl(pH8.0) 200 μ l, 60% saccharose 1.25ml, H₂O 3.53ml] 100 μ l를 넣고 잘 혼합한 후 Solution II [1mM Tris-HCl 200 μ l(pH8.0), 60% saccharose 2.5ml, 10N NaOH 180 μ l, 20% SDS 1.5 ml, H₂O 5.32ml] 200 μ l를 넣고 가볍게 흔들어 혼합하고 60°C water bath에서 30 분 동안 반응시킨다(10분 간격으로 흔들어 줌). 2mM Tris-HCl (pH7.0) 100 μ l를 넣고 얼음에 10분간 둔다. 다시 5mM ammonium acetic acid를 200 μ l넣고 얼음에 20분간 둔다. 15,000rpm에서 20분간 원심한 후 상층액을 새 튜브에 옮기고, 2배량의 알콜을 첨가하여 -25°C에서 2시간 방치한다. 15,000rpm으로 15분간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 75%알콜로 1~2번 세척한 후 진공 건조하여 10~20 μ l 1X TE로 용해하고, 5 μ l loading dye로 혼합하여 전기영동한다. 만약 enzyme excision 혹은 cloning등 분석을 할 경우 product를 phenol/chloroform으로 추출하여야 한다. 탄저균 plasmid를 전기영동한 결과를 보면, 강독균은 두 가지 plasmid, 하나는 독소를 encoding하는 plasmid(pXO1)로서 분자량은 185kb이고, 다른 하나는 헵막을 encoding하는 plasmid(pXO2)로서 분자량은 95kb이다.

3. 치료

탄저균은 체내에서 다량 번식하여 독소를 생성하고 독성의 작용으로 인하여 호흡중추가 기능을 상실하여 최종 폐사에 이른다는 것으로 알려져 있다. 따라서 탄저에 대한 치료 원칙은 반드시 환축을 격리시키고 될 수 있는 한 신속히 치료해야 한다. 조기에 체내의 탄저균의 증식을 억제하고 살균시키며 생성된 독소를 중화시켜야 한다. 근육의 경련을 완화시키고 호흡기능을 유지시키며 감염 후에는 2차감염을 방지해야 한다.

동물탄저 치료는 반드시 발병초기에 penicillin, sodium salt를 정맥주사 하여야 한다. 용법, 용량에 따라 kg체중당 12,000~17,000U을 투약한다. 6~8시간후 일반 표준량의 penicillin을 재차 투약한다. 혹은 procaine penicillin을 투약할 수도 있는데 kg당 6,000~12,000U을 사용한다. 반드시 24~48시간후 재차 주사한다. 급성경

과가 아닌 경우 혹은 예방적 처치를 위해서는 근육주사 투여로도 효과를 기대할 수 있다. 발병후기에 penicillin에 대한 내성 발현을 억제하고 세균 살균효과를 높이기 위해 Gentamicin, Tetracycline계, Quinolone제제와 병용하면 좋다. 동일한 동물의 항혈청을 사용하여 세균을 억제하고 독소를 중화할 수도 있다. 그러나 항혈청은 단독 사용할 수 없다. 반드시 항생제와 함께 사용하여야한다. 표 7과 표 8은 최근 국내 분리균주와 표준균주에 대한 항생제 감수성 결과로 Sulfa제를 제외한 그람양성 간균에 유효한 항생제들에 모든 높은 감수성을 보였다. 하지만 최근 국내 분리균주에서 보듯이 Penicillin제제에 대해 비교적 높은 농도에서 살균효과를 보이며 내성 획득 가능성도 우려된다. 따라서 탄저의 치료 및 예방을 목적으로 항생제를 적용할 때 Penicillin제제 뿐만아니라 감염 후기에 탄저균에 대한 살균력이 높은 Quinolone제제, Gentamicin, Cephalosporin계통과 함께 병용하여 사용하는 것이 바람직하다.

표 7. 항생제 Disc검사

항 생 제	표 준 균 주				분 리 균 주			기 준	
	14578	14185	Sterne	육균2묘	봉천	경주	홍성	WHO ¹	NCCLS ²
Penicillin(10U)	32 ³	25	25	27	29	30	25	11-17 ⁴	13-17
Ampicillin(10 μ g)	30	28	26	26	30	29	25	20-29	19-20
Amoxicillin(30 μ g)	38	34	33	31	34	33	34	13-21	13-18
Methicillin(5 μ g)	35	25	30	28	30	30	33	9-14	9-14
Norfloxacin(10 μ g)	30	19	28	27	30	27	26	14-17	12-17
Chloramphenicol(30 μ g)	30	24	21	25	21	20	20	12-18	12-18
Cephalothin(30 μ g)	36	31	30	34	34	30	32	14-18	14-18
Tetracycline(30 μ g)	34	30	31	35	35	32	30	14-19	14-19
Oxytetracycline(30 μ g)	33	29	30	31	32	30	30	14-19	14-19
Gentamicin(10 μ g)	36	22	24	25	24	25	25	12-15	12-15
Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1.25 - 23.75 μ g)	0	0	0	0	0	0	0	10-16	10-16

1. WHO: World Health Organization
2. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
3. zone diameter: mm
4. susceptible \geq intermediate(표시된 수치) \geq resistant

표 8. MIC₅₀ & MIC₉₀ 검사

균 주	농도(μg) ¹	항 생 제 ²						
		AMC	CLXC	OTC	GM	CHP	CPLT	NFLX
ATCC 14578	MIC ₅₀	0.13	1	0.13	0.5	8	1	0.25
	MIC ₉₀	2	4	16	1	16	2	0.5
ATCC 14185	MIC ₅₀	0.13	1	0.13	0.25	8	1	0.5
	MIC ₉₀	8	4	16	0.5	16	4	1
Stereon	MIC ₅₀	0.13	1	0.13	0.25	16	2	0.25
	MIC ₉₀	4	8	16	0.5	32	4	0.5
육군2묘	MIC ₅₀	0.13	1	0.13	0.25	8	2	0.5
	MIC ₉₀	2	2	32	0.5	16	4	1
봉 천	MIC ₅₀	0.13	2	0.13	0.5	16	2	0.5
	MIC ₉₀	8	16	16	2	32	4	1
경 주	MIC ₅₀	0.13	2	0.13	0.5	16	2	0.5
	MIC ₉₀	32	64	16	1	32	8	1
홍 성	MIC ₅₀	0.13	1	0.13	0.5	16	2	0.5
	MIC ₉₀	16	32	16	1	32	4	0.5
WHO기준 ³	MIC ₅₀	32-8 ⁴	32-8	16-4	8-4	32-8	32-8	16-4

1. MIC₅₀, 50% minimum inhibition concentration;

MIC₉₀, 90% minimum inhibition concentration

2. AMC, Ampicillin; CLXC, Cloxacillin; OTC, Oxytetracycline;

GM, Gentamicin; CHP, Chloramphenicol; CPLT, Cephalothin;

NFLX, Norfloxacin

3. WHO: World Health Organization

4. susceptible ≤ intermediate(표시된 수치) ≤ resistant

VI. 예 방

1. 역학조사

탄저병이 발생한 유행범위, 심각성, 유행특징을 파악하고 전염원과 전파경로를 탐색하여 예방 치료 대책을 과학적으로 수립하기 위해서는 역학조사가 선행되어야 한다.

가. 과거발생 상황조사

1) 조사목적

탄저병이 발생한 지역 혹은 목장에서 탄저의 과거발생 유무를 조사하는 것이 목적이다. 당초 유행한 상황, 발병원인, 전염상황, 현재상태, 사람과 가축의 건강과 다른 산업에 초래한 영향을 정확히 조사하여야 한다. 이는 예방치료대책을 수립하고 향후 장기적 예방 조치를 정하는데 과학적인 근거를 제공한다.

2) 조사내용

(1) 일반자료

① 지리적 위치

② 자연조건: 토양, 수자원, 초원, 식물종류, 년 평균기온, 습도 및 년 강수량, 교통 상황등 포함

③ 역사적 자료: 홍수, 가뭄 등 자연피해, 혹은 근년에 가축이 급성전염병 발생 여부 등 포함

④ 가축 사육현황: 초식동물의 종류, 가축의 사육두수, 사육방식, 예방접종, 가축의 이동상황 등 포함

(2) 탄저자료

① 사람의 탄저병 발병상황: 과거 탄저발생 사람수, 사망수 및 전파범위; 조사

당시 최근 탄저 발병상황 및 전파범위; 탄저 발생시 현지에서 전파가능한 경로 및 전염원; 발생한 탄저의 임상학적 종류와 병원학적 검사결과; 탄저 발생후 발생지역에 대한 처리상황 및 예방치료 조치 등 포함

② 동물의 탄저병 발병상황: 과거 탄저병 발생상황; 현지 고유 혹은 외부유입 여부; 발병상황 동태 추이와 오염된 면적에 대한 예측; 조사당시 탄저 첫 발병부터 종료 때까지 기간 및 전파범위; 경제 손실에 대한 예측

나. 탄저 발생시 역학조사 방법

1) 역학조사의 목적

발병상황 실태조사와 역학자료를 수집하는 중요한 수단이다. 그 목적은 ① 발병상황실태조사와 정확한 진단; ② 환자 및 환축, 폐사축의 피 감염장소 및 발병지점을 확정하고 그 지역이 탄저 발생지역인지를 판단하는데 근거자료 제공; ③ 더욱 광범위하게 역학자료를 수집하며 발병지역, 범위, 유행종류, 유행강도, 역학 특성을 파악하기 위한 기초자료를 제공한다.

2) 조사방법과 내용

① 폐사축이나 환축 사육농가를 방문하여 발병결과를 상세히 알아낸다.

폐사축이나 환축의 일반자료(축종, 품종, 연령, 암수), 예방접종 유무, 가축의 사육현황, 발병상황(발병일, 폐사일, 임상증상, 동거축의 이상유무), 과거병력(발병 유무, 유사증상유무), 외부가축 유입현황, 폐사축의 처리 등을 조사한다. 또한 인근의 가축 및 주위마을 가축중에 발병상황유무, 발병범위, 혹은 폐사축의 식용여부 등을 자세히 조사하여야한다.

② 현장 관찰.

발생농장의 지리적 환경, 사육환경(사료 및 조사료 종류, 오염가능성유무, 축사에 대한 차량접근정도, 소독조 설치 유무, 소독제의 종류 등)에 대한 종합적인 관찰을 해야하며 가능한 전염원 및 전파경로를 파악하고 오염가능한 범위와 정도를 예측해야한다.

③ 환축이나 동거축의 검사.

환축이나 동거축의 임상증상 발현 및 예후, 중독증상의 존재여부를 정확히 파악하고 다른 축종의 가축들도 정밀하게 검사한다.

④ 가검물채취.

필요에 따라 환축이나 폐사축의 혈액, 분비물, 배설물 등을 채집하여 세균학적, 혈청학적 검사에 사용한다. 만약 부검하였다면 폐사축의 실질 장기(비장 등)나 혈액 등을 채취하고 발병한 가축이 접촉가능했던 수원, 사료, 조사료, 토양 등을 채집한다. 각 샘플마다 명확히 표시하고, 병성감정기관에 즉시 보내서 검사하고, 환축이나 폐사축이 주위환경을 오염시키는 것을 피해야 한다. 검사결과를 제고하기 위하여 샘플을 저온 혹은 냉동상태로 보관하고 그 관리를 철저히 한다.

3) 처리 절차

① 진단 확인

과거 발생기록, 현재 발병 상태, 임상증상, 역학자료와 실험실검사 결과를 확인하여 종합적인 판단을 한다. 필요시 임상수의사와 실험실 검사자가 함께 조사하여 진단하며 간혹 필요하다면 추가조사를 실시한다.

② 폐사축과 환축의 처리

탄저로 의심되는 폐사축의 해체는 아포형성을 막기위해 가급적 피하는 것이 좋으며 예후 불량한 환축은 즉시 살처분하고 가축전염병예방법 시행규칙에 따라 즉시 소각 매몰 처리한다.

③ 예방 치료 조치

환축 격리, 치료 방법, 감염 위험군에 대한 예방적 처치, 전염원 파악과 소독 처리, 그리고 오염가능한 지역, 관련 시설기구의 철저한 소독을 실시한다.

동물 탄저 역학 조사표

1. 출장자 소속: _____ 성명: _____
2. 축주 주소: _____
성명: _____ 전화번호: _____
3. 현지 조사일: _____ 년 _____ 월 _____ 일 (기간: _____ ~ _____)
4. 사육 현황: 소: (유우) _____ (육우) _____
돼지: _____ 기타: _____
5. 발병일시: _____ 감염두수: (축종) _____ (두수) _____
6. 주요 임상증상:

7. 임상학적 진단결과: _____
8. 폐사축 및 환축의 처리: (장소) _____ (방법) _____
9. 발병지역 소독: (유, 무) 소독제: _____ 소독방법: _____
10. 동거축 및 인근 가축의 건강상태: _____
11. 과거 21일간 가축의 이동상황: (판매) _____
(구입) _____
12. 과거 7일간 농장 접촉상황:
(방문자) _____ (방문차량) _____ (기타) _____
13. 가능한 전염원 _____ 전파경로 _____
14. 기타 조치사항

2. 전염병 발생 지역에 대한 조치

탄저의 전염상황이 확대 만연되는 것을 방지하기 위하여 가축간 전염상황과 사람 전염상황은 물론이고 전염병 발생지역에 대하여 철저한 관리를 하여야 한다. 이를 위해 관련기관 종사자는 전염상황을 즉시 상급기관에 보고하고 전염지역 현장 조사 및 전염지역에 대한 처리를 실시한다.

가. 가축간 탄저 전염지역 처리

탄저병에 걸린 가축은 격리 사육해야 하고 즉시 치료해야 한다. 동거축에 대한 검사 및 응급처치를 실시해야 하며 필요시 예방적 투약도 권장된다. 발병 가축의 분비물, 배설물과 주위환경등 오염지역에 대해서는 즉시 아포를 죽일 수 있는 소독제로 소독해야 한다. 완치된 소의 주위는 완벽하게 소독을 실시하며, 폐사축의 사체는 다른 가축이나 동물이 접근할 수 없도록 반드시 완전하게 처리해야 하며 탄저아포 형성을 방지하기 위해 함부로 부검하는 것을 금지해야 한다. 폐사축은 탄저병 확진이 나오는 대로 즉시 철저히 소각하여 매몰처리한다. 감염후 치료를 거쳐 회복된 가축이나 동거축에 대해서는 반드시 철저한 임상관찰을 하고 재검사를 하여 음성이어야 한다.

나. 탄저 사체 처리

탄저병으로 인한 폐사축의 처리는 소각과 매몰로 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 소각과 매몰 장소로는 사체를 소각하거나 매몰할 수 있는 시설을 가진 사체 취급장이나 가옥, 수원지, 하천, 도로에 인접하지 아니한 장소로서 일상사람 또는 가축이나 동물이 접근하지 아니하는 장소로 선택하고 사체에 대한 소각방법이나 매몰은 가축전염병예방법 시행규칙에 따라 실시한다. 사체이동시 우선 5% formalin으로 사체 표면을 소독한 후 운반해야 하며 좋고 운반과정에서 도로나 장비의 오염을 피해야 한다.

일반적으로 가장 좋고, 완벽한 방법은 소각하는 방법이다. 소각시 반드시 목재 혹은 불에 타기 쉬운 재료로 사체를 받친 후 완전히 소각하고 매몰해야 한다. 생석회를 첨가하여 매장하는 방법은 전염원을 남겨 놓을 수 있는 우려가 있으므로

매우 신중히 처리해야 한다. 최소한 매몰 구덩이는 사체를 넣어도 지표까지 1m 이상 남도록 깊게 파고 향후 탄저아포가 표면에 돌출될 수 있으므로 발굴금지기간 내에 발굴을 엄격하게 금지하고 사후관리를 철저히 해야 한다. 조금이라도 탄저균에 오염되었을 것으로 추정되는 모든 시료 즉, 축사, 분뇨, 토양, 각종 축산기구, 부검기구 등은 철저히 소각하거나 소독하여야 하며 나중에 가검물을 채취하여 재 검사하고 음성임을 확인하여야 한다.

3. 소독

가. 소독 목적

소독은 예방을 주로 하는 위생방침을 관철하는 구체적인 조치이다. 소독과 전염병의 유행은 밀접한 관계가 있다. 소독은 탄저병의 전파경로를 차단하고 탄저의 만연을 예방하는데 있다.

탄저병의 자연감염은 주로 초식동물인 소, 양, 말에서 일어나며 인수 공통전염병으로 사람에서도 발병할 수 있다. 탄저 아포는 오염된 물, 오염된 토양중 10년 이상 오랫동안 생존할 수 있으므로 탄저 발생지역내에서는 장기간에 걸쳐 발생될 수 있다. 따라서 탄저를 예방하기 위해서는 발생지역내에서는 철저한 소독을 실시하여야 하며 발생지에 대하여는 보다 철저한 소독과 예방적 처치를 실시하여야 한다.

나. 소독방법

탄저균은 자연계에서 쉽게 아포를 생성한다. 탄저 아포가 외부환경에 특별히 강한 저항력이 있기 때문에 부패된 물질 중에서도 장기간 생존할 수 있을 뿐만 아니라 대다수 살균방법에 대한 저항성도 강하다. 따라서 오염을 제거하는 방법이 아주 많이 있지만 선택된 방법은 모두 아포를 사멸하는 것을 중심으로 고려하여야 한다.

1) 물리적 소독

물리적 요소를 이용하여 탄저아포를 사멸 혹은 제거한다. 이 방법은 소각하는

방법, 고압증기 멸균법 등의 방법이 있다.

2) 화학적 소독

소독제를 이용하여 탄저 아포를 사멸시키는 방법이다. 주요 방법으로는 분무, 도포, 침지, 훈증소독하는 방법이 있다.

(1) 소독제 선택 방법 기준

①유효농도가 낮고 작용속도가 신속한 것 ②성질이 안정하고 조제하기 편리한 것 ③아포 사멸효과가 좋은 것 ④외부요소의 영향을 적게 받는 것 ⑤물품에 부식성이 없고 잔류 흔적을 쉽게 제거할 수 있는 것 ⑥사람과 가축에 독성이 적고, 쉽게 불 붙거나 폭발하지 않는 것 ⑦가격이 합리적이고 운송하기 편리한 것 ⑧사용방법이 다양하고 특수설비가 필요없는 것

(2) 탄저 소독에 흔히 사용하는 소독제의 성능 및 용도

주위 환경의 탄저 아포 등 오염원 제거를 목적으로 사용하는 소독제로는 Iodophorus계통, Aldehyde계 단일 또는 혼합제제, 생석회 등의 소독제들이 사용되고 있으며 이들의 사용방법에 대한 자세한 내용은 소독제의 종류에 따라서 그 지시사항에 따라서 사용하면 된다.

① chlorine함유된 소독제: 탄저아포를 사멸할 수 있고, 사용하기 편리하고 가격이 저렴하다. 표백 및 부식작용이 있으며 효과는 유기물과 pH의 영향을 쉽게 받는다. 유효농도는 3,000~10,000ppm이며 작용시간은 10~60분으로 세균사멸효과가 있다. 이런 종류의 소독제는 오수, 분뇨, 오염된 벽과 용기 등의 소독에 사용할 수 있다.

② 과산화물형 소독제: 살균력이 강하고, 사용하기 편리하며, 염색되지 않고 잔류독성이 없다. 그러나 표백 및 부식작용이 있다. 6%농도로 30분간 작용했을 때 제한된 아포살균효과를 볼 수 있다.

③ aldehyde류 소독제: 아포살균효과가 아주 좋으며 안정하고 오랫동안 보관할 수 있으며 유기물의 영향을 적게 받는다. 그러나 온도에 불안정하고 냄새가 이상

하며 자극성이 있다. 흔히 사용하는 Formaldehyde는 1~10%농도로 사용하며 Glutaraldehyde는 0.5%~2.5%농도로 사용하며 장시간 효과를 발휘할 수 있다. 또한 훈증소독용으로도 사용할 수 있다. 축체, 축사나 축산기구 소독에 적합하다.

④ Iodine이 첨가된 소독제: 독성이 적고, 보관하기 편리하며, 작용이 신속하고, 탄저아포에 대한 작용이 비교적 강하다. 그러나 가격이 좀 비싼 편이다. 피부에 사용할 때 농도는 150mg/L로 사용하며 부검기구 소독 등에 사용할 수 있다.

⑤ 생석회: 물기가 있는 축사 밑바닥이나 토양은 생석회를 직접 살포하고 건조한 곳은 5%생석회 유제액을 만들어 살포한다. 살포후 약 5일정도 가축의 출입을 제한하는 것이 좋다.

3) 소독 작업시 주의사항

(1) 소독시 흡연, 음수 및 음식물 섭취를 삼가야 하며 전염병 발생지역내에서는 함부로 이동하지 않으며 비관련자의 접근을 금지하여야 한다.

(2) 소독은 엄격하게 실시하고 빠짐없이 철저히 진행하여야 한다. 사람과 가축이 소독약물에 중독되지 않도록 주의해야 하며 이미 소독한 물품과 소독이 되지 않은 물품을 엄격히 구분하여 재오염되지 않도록 한다.

(3) 소독 작업이 끝난 후 축주나 관련된 사람들에게 주의사항을 자세히 설명하여야 하며 사후 소독 효과를 점검하여야 한다.

4. 예방조치

가. 전문교육

탄저는 우리 나라에서 1종 가축 전염병에 속하며 이 질병의 발생전파 및 유행을 방지하는 것은, 현재 위생방역 종사자와 수의 관련 종사자들의 중요한 의무중의 하나이다.

1) 위생교육

탄저병의 관리와 예방에 있어서 위생교육은 제일 경제적이고 간편하고 효율적인 방법이다. 교육은 탄저병의 특징 및 방역 위생, 예방에 맞추어 과학적이고 체

계적으로 진행해야 하며, 탄저의 위험성을 인식하고, 환축 및 폐사시의 임상증상을 이해하고 일단 발견되면 즉시 관련기관에 조기 신고하도록 적극적인 조치를 취해야 한다. 축주들에게 탄저병 예방에 관한 인식을 향상시키고, 적절한 위생습관을 양성하도록 한다.

2) 전문교육실시

임상 수의사와 각 시도 가축위생담당자에 대해 전문교육을 실시하여야 한다. 탄저병의 임상진단, 감별진단, 역학조사, 발병지역 조사, 검사 및 예방 등 방역지식을 교육시켜 예방 및 대처능력을 향상시켜야 한다.

나. 예방접종

탄저병을 예방하려면 근본으로 외부 환경 오염문제를 해결해야 하지만 가장 효율적이고 간편한 조치는 발병지역에 대해 계속적으로 탄저 예방접종을 하는 것이다.

우리 나라에서는 1922년부터 1941년까지는 탄저 1묘 및 2묘 백신을 사용하였고, 1942년부터 1969년까지는 탄저 2묘 생아포백신을 사용하여 왔다. 국내에서 현재 사용하고 있는 탄저백신은 0.01% saponin을 첨가한 탄저 Sterne아포백신과 10% toluene을 첨가한 기종저 2묘 백신을 혼합제조하여 만든 백신이다. 현재 생산은 ml당 아포가 약 1,000만개 함유하며 매년 한번씩 주사하면 좋은 예방효과를 기대할 수 있다. 약독 생백신에 존재할 수 있는 부작용을 최소화하기 위해서 백신을 사용할 때는 주의사항을 엄격히 지켜야 한다. 예방주사와 치료 작업은 반드시 수의사와 함께 실시하여야 한다. 소는 탄저·기종저 혼합백신 2ml를 피하주사하고 주사후 2~8일 동안은 계속해서 관찰 보호하고, 사료를 충분히 섭취할 수 있도록 하며, 불량한 환경에 노출되지 않도록 주의하여야 한다.

VII. 결 언

탄저병은 탄저균의 감염에 의한 동물과 사람에서 모두 치명적인 피해를 주는 질병이며, 급성 경과를 취하기 때문에 발병후 치료보다는 사전 예방에 각별한 신경을 기울여야 하는 질병이다. 탄저병의 방제는 백신의 예방접종과 주위 환경의 개선 등에 의한 방법에 의할 수 있다. 동물에서는 과거 발생이 있었던 상재지를 중심으로 매년 철저한 예방접종을 실시하여야 하며, 일단 탄저로 의심이 되는 환축이 발견되면 즉시 격리하고 관계기관에 신고하여 그 지시에 따라서 처리하여야 한다. 가축의 이동을 제한하고 사육시설, 토양 등 주위환경은 아포까지 파괴할 수 있는 소독제로 철저히 소독해야 한다. 사람에서는 의문사한 가축의 고기는 절대로 먹어서는 안되며, 직업상 가축과 접촉이 많은 사람들은 가능한 한 예방접종을 받아서 탄저를 미리 예방하여야 할 것이다.

VIII. 부 록

부록 1. 배지제조

1. PLET agar medium

조성: Difco heart extract	25ml
EDTA	0.03g
Thallium acetate	0.004g
ddH ₂ O	100ml

pH 7.4로 맞추고 121℃에서 20분간 멸균하여 45~50℃까지 냉각한 후 아래 시약들을 첨가한다.

polymyxin B	30U/ml
lysozyme	300U/ml

즉시 혼합하여 페트리디쉬에 분주한다.

2. indicative 선택배지

조성: protein peptone	2.0g
sodium chloride	0.5g
broth(or yeast extract)	0.5g
EDTA	0.03g
thallium acetate	0.004g
citric acid	1.0g
0.2% BTB	1.2ml
agar powder	1.8g
ddH ₂ O	100ml

pH 7.6으로 맞추고 121℃에서 20분간 멸균하여 45~50℃까지 냉각시킨 후 아래 시약들을 첨가한다.

polymyxin B(3000U/ml 수용액)	0.1ml
lysozyme(30000U/ml 수용액)	0.1ml

3. Sodium bicarbonate agar plate

조성: 기초 배지를 녹인 후 45~50°C로 냉각시킨 후 고체 sodium bicarbonate를 최종농도가 0.9%로 되도록 첨가한다. 혼합후 즉시 페트리디쉬에 분주한다.

4. RM-medium

Composition	10× stock (mg/50ml)	Solvent	5 Liter
L-tryptophan	350	a little 1M HCl	25ml
Glycine	650	Distilled Water	25ml
L-tyrosine	1440	1M HCl	25ml
L-lysine HCl	2300	Distilled Water	25ml
L-valine	1730	1M HCl	25ml
L-leucine	2300	1M HCl	25ml
L-isoleucine	1700	1M HCl	25ml
L-threonine	1200	Distilled Water	25ml
L-methionine	730	1M HCl	25ml
L-aspartic acid	1840	1M HCl	25ml
L-glutamic acid	6120	HCl(37%), 4ml	25ml
L-proline	430	Distilled Water	25ml
L-histidine HCl	550	a little 1M HCl	25ml
L-arginine HCl	1250	Distilled Water	25ml
L-phenylalanine	1250	1M HCl	25ml
L-serine	2350	Distilled Water	25ml
Adenine sulfate	21	1N NaOH	25ml
Uracil	14	1N NaOH	25ml
Thiamin HCl	10	a little 1M HCl	25ml
Cysteine	250	Distilled Water	25ml
CaCl ₂ 2H ₂ O	74	Distilled Water	25ml
MgSO ₄ 7H ₂ O	98	Distilled Water	25ml
MnCl ₂ 4H ₂ O	10	Distilled Water	25ml
NaCl			14.6g
KCl			18.5g
KH ₂ PO ₄			2.3g
Tris base			45.3g
Glucose			25.0g
NaHCO ₃			40.0g
Distilled Water			4.3L

Adjusted to pH 8.0 and filter sterilization

부록 2. 염색액제조

1. preparation of gram's dye solution

가. Solution I : crystal violet dye solution

Sol. A: crystal violet	2.0g
95% alcohol	20ml
Sol. B: ammonia oxalate	0.8g
ddH ₂ O	80ml

사용할 때 Sol. A를 5배 희석, 즉 sol. A 20ml을 80ml sol. B에 첨가하여 혼합하여 사용한다. 이 solution을 장기간 보관하고 사용할 수 있다.

나. Solution II: Gram's Iodine solution

Iodine	1g
KI	2g
ddH ₂ O	300ml

우선 KI를 30~50ml의 증류수에 녹인 후 Iodine을 넣고 힘껏 흔들어 섞는다 Iodine이 완전히 녹은 후 증류수를 300ml될 때까지 첨가한다. 오랫동안 보관하지 말고 사용하기 직전 만들어 사용한다.

다. Solution III: 95% alcohol를 탈색제로 사용한다.

라. Solution IV: Safranin dye solution

safranin	0.1g
증류수	100ml

2. Preparation of methylene blue dye solution

가. Solution A: methylene blue	0.3g
95% alcohol	30ml

나. Solution B: 0.01% KOH 100ml

Solution A 와 SolutionB를 혼합하여 갈색병에 보관하여 사용한다. 장기간 보관이 가능하고 낡은 염색액은 다색을 띠며 효과가 좋다.

3. malachite green모래 황색 아포 염색액 조제

가. Solution I : malachite green	5g
증류수	100ml

나. Solution II: 모래 황색	0.5g
증류수	100ml

부록 3. ELISA용 buffer제조

1. Coating buffer(pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
D.W	1,000ml

2. Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)

NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.19g
KCl	0.2g
D.W	1,000ml

3. PBS tween 20 buffer

0.05% tween 20 in PBS(0.5ml/D.W 1,000ml)

4. Blocking buffer

2% Bovine serum albumin in PBS(2g/PBS 100ml)

5. Substrate

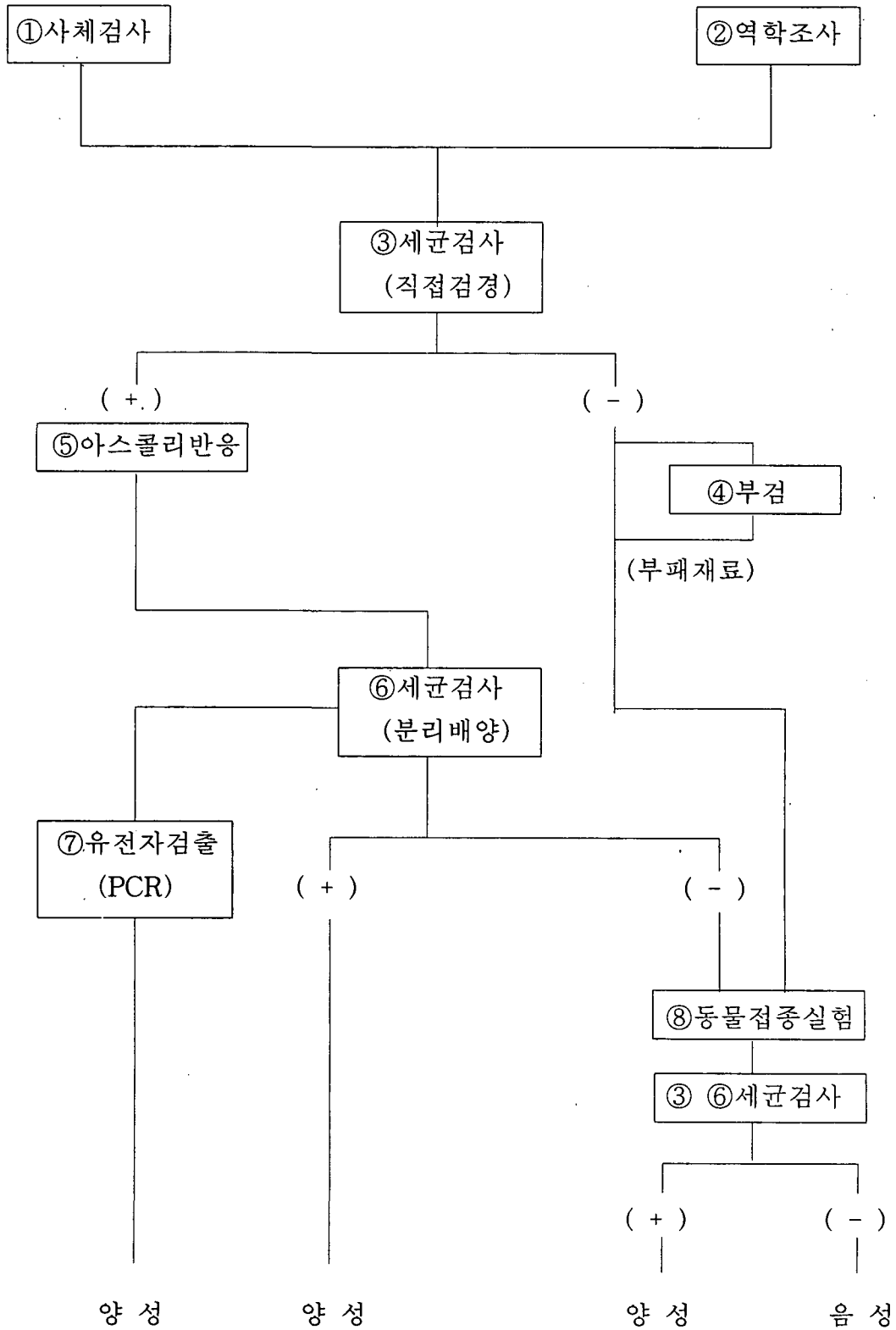
0.1M Citric acid(9.6g/D.W 500ml)	25ml
0.2M Na ₂ HPO ₄ (14.2g/D.W 500ml)	25.7ml
OPD(O-phenylene diamine)	40mg
30% H ₂ O ₂	40μl
D.W	50ml

6. Stopping solution

3.0M H₂SO₄(H₂SO₄ 147ml/D.W 353ml)

부록 4. 탄저 병성감정실시요령

{ 검사도표 }



(1) 사체검사

- 향문, 비공 등 천연공의 출혈 및 혈액응고 부전
- 경정맥이 심하게 부풀어 오름
- 국소성 탄저는 인후두부 부종 (돼지의 경우 많음)

(2) 역학조사

- 예방접종(탄저, 기종저) 유무
- 과거 인근에서 탄저 발생유무
- 최근 축사내외의 흙, 모래 옮김
- 경과가 급성, 심급성(돼지 : 만성경과가 많다.)
- 시설내 혹은 주변에 소 또는 다른 가축의 급사가 있었다.
- 동거우 임상검사 (발열, 혈변, 점막의 cyanosis)

(3) 세균검사

원인균 : *Bacillus anthracis*

- 말초혈, 경정맥혈, 비장(돼지의 국소형은 인후두부의 임파절, 장염형은 병소 부근의 임파절)의 직접도말 표본을 헤파막염색 또는 Giemsa염색하여 3~5개의 연쇄상간균(죽절상)이며 뚜렷한 헤파막을 갖고 있는 균 증명(직접 검경은 시료 채취후 신속히 실시)
- 돼지의 국소형은 인후두부 임파절, 장염형은 병소 부근의 임파절을 검사한다.
- 직접 검경에서 탄저가 의심되는 경우 부검소견의 오염방지를 위해 인축의 접근을 금지한다.

(4) 부검소견

- 혈액응고 부전
- 비장은 암적색 및 tar양으로 3~4배 증대
- 돼지의 경우 인후두부의 부종과 편도의 충출혈, 장관의 비후, 주변 임파절의 종창
- 장관점막의 암적색 비후, 주변 임파절의 암적색 종창, 궤양, 비장종대

(5) 아스콜리 반응 (Ascoli test)

- 말초 혈액, 경정맥혈 또는 비장유체(5~10배)에서 항원을 만든다. (균수가 적지 않은 경우 탄저에 있어서 음성도 된다. 한편, 부패진행이 현저한 재료에서는 비특이 반응이 나올 수 있다.)

(6) 세균검사 (분리 배양)

- 혈액 및 비장(돼지는 편도, 인후두, 장간막임파절)을 보통 한천배지에 분리배양 (37°C에서 24시간)
- 곰보유리 또는 축모 모양의 콜로니 형성 (직경 3~5cm 편평, 옅은 회색)
- 분리균 성상
B. anthracis : 그람(+)
연쇄상간균 운동성과 용혈성은 없다.

(7) 유전자 검출법 (Polymerase chain reaction : PCR)

- 탄저균이 갖고 있는 Capsule. Tripatite toxin gene을 유전자 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의한 검출
- primer 제작

capsule(778bps): forward ATGTATGGCAGTTCAACCCG
 reverse ACCCACTCCATATACAATCC
 PA(597bps): forward GAGGTAGAAGGATATACGGT
 reverse TCCTAACACTAACGAAGTCG

- 반응액 : 10×PCR buffer 5μl
 25mM Mgcl₂ 3μl
 10mM dNTPs 1μl
 primer(forward, reverse)..... 각각 1μl
 template DNA 1μl
 Taq polymerase 5μl
 증류수로 총량을 50μl가 되도록 한다.

- 반응조건 : 최초 denaturation 94°C 4분
 denaturation 94°C 1분
 annealing 55°C 1분 30초
 extension 73°C 1분 30초
 마지막 extension 72°C 5분
- } 30회 반복

(8) 동물 접종 시험

- 부패가 현저한 재료에 대해서 실시
- 재료 : 혈액 및 비장 유제를 가검물당 2회 이상 실시
- 심하게 부패한 검체에 대해서는 가열 (70°C 15분)한 재료 이용

- 방법 : 마우스 또는 기니픽의 피하 또는 근육내에 0.2 ~ 0.5ml씩 접종
- 결과 : 급성 경과로 사망
- 동정 : 사망예의 심장혈에서 세균 분리배양

(9)감별진단

- 기종저
- 악성수종
- 초산염중독
- 금성고창증
- 헤모필러스감염증
- 괴사성장염
- 출혈성패혈증

부록 5. OIE Manual, chapter 3.1.1.A. Anthrax

SUMMARY

Anthrax is primarily a disease of herbivorous animals, although all mammals including humans, and at least some avian species can contract it. Mortality can be very high, especially in herbivores. The aetiological agent is the spore-forming, Gram-positive rod-shaped *Bacillus anthracis*. The disease has world-wide distribution and is a zoonosis. Anthrax is not only of importance to the livestock industry, certain populations of wildlife and humans, especially occupationally exposed people, it also supplies numerous models of historical as well as present-day significance to the current understanding of bacteriology, molecular biology, toxicology, immunology, and the pathogenesis and epidemiology of infectious diseases.

The disease is mediated by exotoxins. Peracute, acute, subacute and, rarely, chronic forms of the disease are reported. Ante-mortem clinical signs may be virtually absent in peracute and acute forms of the disease. Subacute disease may be accompanied by progressive fever, depression, inappetence, weakness, prostration and death. Chronic disease may show localized swelling, fever, enlarged lymph glands; death may occur if the airway becomes obstructed. Post-mortem examination of recently dead animals may show any number of lesions, none of which is pathognomonic or entirely consistent. Lesions most commonly seen are those of a generalized septicaemia often accompanied by an enlarged spleen having a 'blackberry jam' consistency and poorly clotted blood. Haemorrhage from the nose, mouth and/or anus at death is a common sign.

Identification of the agent : Visualization of the capsulated bacilli, usually in large numbers, in a blood smear stained with polychrome methylene blue (M'Fadyean reaction) is fully diagnostic. *Bacillus anthracis* is readily isolated in relatively high numbers from blood or tissues of a recently dead animal that died of anthrax, and in pure culture, on any nutrient agar incubated aerobically at 37°C. Its characteristic appearance on blood agar makes this the medium of choice. As the carcass decomposes, especially in a warm climate, the putrefactive bacteria tend to overgrow and eventually eliminate the infective organism within the carcass. Confirmation of anthrax in these cases may depend on isolation from soil contaminated by the terminal discharges.

Colony morphology of *B. anthracis* is quite characteristic after overnight incubation on blood agar. The colony is relatively large, measuring approximately 0.3~0.5cm in diameter. It is white to grey-white, nonhaemolytic with a rough, ground-glass appearance and has a very tacky, butyrous consistency. Prominent wisps of growth trailing back toward the parent colony, all in the same direction, are sometimes seen. This characteristic has been described as a 'medusa head' appearance.

The vegetative cells of *B. anthracis* are large, measuring 3~5 μ m in length and approximately 1 μ m in width. Ellipsoidal central spores, which do not swell the sporangium, are

formed at the end of the exponential cell growth phase. The cells stain strongly Gram positive, and long chains are often seen in vitro, while paired or short chains are seen in vivo. The bacilli in infected tissues are encapsulated, but this characteristic is lost when the bacterium is grown aerobically in vitro. The capsule can be induced by incubating in defibrinated horse blood for at least 5 hours, or by culturing the isolate on nutrient agar containing 0.7% sodium bicarbonate with incubation at 37°C in the presence of CO₂.

Additional useful laboratory confirmatory tests are the absence of motility, susceptibility to the specific diagnostic ('gamma') bacteriophage and sensitivity to penicillin. Primers are now available that can be used to show the presence of the toxin and capsule genes by polymerase chain reaction as confirmation of virulence, replacing animal inoculation. A thermoprecipitin test described by Ascoli in 1911 is still used in some countries to supply retrospective evidence of anthrax in decomposed carcasses or animal products.

Serological tests : Antibody detection in serum from infected animals is rarely used for diagnostic purposes and is essentially a research tool. The predominant procedure today is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Requirements for vaccines and diagnostic biologicals : The most widely used anthrax vaccine for immunizing livestock is a suspension of live spores prepared from the noncapsulated Sterne strain of *B. anthracis*. An equivalent strain is used in Russia (strain 55). The older Pasteur vaccine is still used in Italy. A list of producers is given in the World Health Organization anthrax guidelines.

There are no standardized requirements for diagnostic biologicals. Well quality-controlled polychrome methylene blue (M'Fadyean) stain is becoming increasingly hard to obtain; in some parts of the world, this is already leading to missed diagnosis. Diagnostic 'gamma' phage may be obtained from, for example the United States Centre for Disease Control (CDC) or various central veterinary or anthrax reference laboratories. ELISA tests are usually based on purified protective antigen, one of the three components of the anthrax toxins. Commercially available antiserum for the Ascoli test is only available from certain East European centres.

A. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Anthrax is primarily a disease of herbivorous animals, although all mammals including humans, and at least some avian species can contract it. Mortality can be very high, especially in herbivores. The aetiological agent is the spore-forming, Gram-positive rod-shaped *Bacillus anthracis*, the only obligate pathogen within the genus *Bacillus*. Most of the other species of *Bacillus* are common ubiquitous environmental saprophytes, although a number, notable *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis*, are occasionally associated with food poisoning in humans and with other clinical manifestations in both humans and animals.

Animal anthrax occurs in at least three different forms : peracute or apoplectic form, acute form, and subacute to chronic form. Ruminants are most likely to manifest the peracute and acute forms, horses the acute form, and dogs, cats, and pigs a subacute to chronic or localized condition. In the peracute disease, signs preceding death often go unobserved. The clinical history usually describes the animal to be in good health a few hours before death. If the animal is observed shortly before death, fever up to 42°C (107°C), muscle tremors, dyspnoea,

and mucosal congestion are the most frequent signs. Shortly afterwards, the animal will often have terminal convulsions, collapse and then die. Following death, unclotted blood may exude from the anus, vulva, nostrils, or mouth. Incomplete rigor mortis is also common.

The acute form may occur in cattle and clinical signs, such as depression, anorexia, fever, rapid respiration, increased heart rate, congested mucous membranes, or edematous swellings, may be observed up to 48 hours before death. The acute form, however, is usually seen in horses and varies with the site of exposure. Enteritis and colic are accompanied by high fever and depression. Death usually occurs within 48~96 hours. Spores introduced subcutaneously, for example by biting insects, result in a hot, edematous swelling at the site that spreads to the throat, thorax, abdomen, prepuce or mammary gland. Dyspnoea due to throat swelling with resulting compression of the trachea may also be apparent. The course of the disease is usually 1~3 days, with some animals surviving for 1 week or more.

The subacute to chronic form of anthrax occurs in domestic and wild pigs, dogs and cats. The infectious bacteria are usually ingested when the host feeds on a contaminated source. The organism tends to localize in the regional lymph nodes of the pharyngeal area, where severe swelling may occur, resulting in death by occlusion of the airway. In cases where this does not occur, a fatal bacteraemia may develop, although recovery after a few days of illness is not uncommon. An intestinal form with severe acute gastroenteritis is also seen in carnivores and omnivores.

Suspicion of anthrax will depend on signs, such as sudden death with haemorrhaging from the orifices and incomplete rigor mortis, or on the history of the site, herd, etc. If anthrax is suspected, a thin smear, made on a microscope slide from a small drop of blood obtained with a syringe from any available vein, is air-dried, fixed by immersion in 95% to 100% alcohol for 1 minute and stained with polychrome methylene blue (further details below). The presence of the capsulated 'box-car' bacilli in pairs or short chains, usually in large numbers, is definitive for anthrax. Smears made from swabs of the blood emerging from any of the orifices will also reveal the capsulated bacilli, but may be contaminated with other organisms or artefacts. Samples of the blood can also be taken for culture.

It is best not to perform a necropsy in order to prevent environmental contamination. In opening up the carcass, vegetative *B. anthracis* are exposed to the air allowing them to sporulate and contaminate the premises wherever blood or other body fluids have been spilled. In some countries post-mortem is forbidden. Post-mortem findings are well documented, however. There are no consistent pathognomonic lesions and considerable similarities are seen to other infectious and toxin causes of acute death. Poorly clotted dark blood, enlarged pulpy spleen with a 'blackberry jam' consistency, and multiple petechial haemorrhages characteristic of a septicaemia are usual. In horses, post-mortem findings may be similar to those of ruminants, but sometimes may just consist of edematous lesions confined to the throat and neck with no involvement of internal organs. In omnivores (pigs) and carnivores, findings of septicaemia as described for ruminants may occur, but more often there is extensive edema and inflammation in the pharyngeal area. If the focus of infection is in the gastrointestinal tract, severe inflammation, sometimes with haemorrhage and necrosis, may be seen in the stomach, intestines, and mesenteric lymph nodes, accompanied by peritonitis and excessive

peritoneal fluid.

Natural decomposition of a carcass destroys most of the vegetative organisms through the action of putrefactive bacteria. This can occur within a day or two in hot climates. The capsulated bacilli may not be readily seen in smears of blood sample taken after this has occurred, though the blood may remain culture positive for a day, or so more. Some sporulation may have occurred in fluids exuded through natural body openings, and, particularly if a carcass has been opened by scavengers, many spores may be dispersed into the environment. Swabs of congealed fluids or samples of soil contaminated by the fluids are likely to yield *B. anthracis* on culture. Culture of soil samples may be the best way to confirm that death was due to anthrax in well putrefied carcasses.

- **Disposal after sample collection**

Proper disposal of an infected carcass by incineration (although labour intensive and fuel consumptive) is the most desirable method and is often required by law. The contaminated soil, bedding, etc. should be incinerated together with the carcass and, ideally, the site should also be chemically disinfected for extra certainty. In some countries, it is considered that the best approach is to take the carcass for rendering. Contaminated soil, bedding, etc. would still need to be incinerated. Where incineration or rendering are not feasible, deep burial and covering with quicklime is the alternative, although periodic recovery of anthrax spores at old carcass burial sites have shown that this is the least satisfactory alternative.

- **Risk factors for handlers of anthrax carcasses**

More than 95% of human anthrax cases take the cutaneous form and result from handling carcasses or hides, hair, meat or bones from such carcasses. *Bacillus anthracis* is not invasive and requires a lesion to infect. Protection for veterinarians and other animal handlers involves wearing gloves and other protective clothing when handling specimens from suspected anthrax carcasses. The risk of pulmonary anthrax from airborne spores is negligible for these types of occupations; the potential for inhalation of infectious doses is near zero. The risk of gastrointestinal anthrax only arises if the individuals go on to eat the meat or other food which has been cross-contaminated.

The risk of inhaling infectious doses becomes significant in occupations involving the processing of animal by-products for manufacturing goods (industrial anthrax). These include the tanning, woollen, carpet, bone processing, and other such industries, where the potential for aerosolisation of substantial numbers of spores within particles of less than 10 μ m increases the risk of inhalation exposure to infectious doses. Laboratory workers should use good laboratory practice when working with specimens from suspected anthrax cases and when culturing *B. anthracis*. Use of a safety cabinet is desirable for diagnostic procedures, becoming mandatory if the need for manipulation of broth cultures or spore suspensions arises. As soon as they are finished with, tissues and cultures should be binned or bagged for autoclaving, followed by incineration. There is little need nowadays to use laboratory animals for diagnostic purposes, but if they are used, the bedding and cages should be autoclaved after use and the bedding incinerated afterwards. Care should be taken not to create dusty aerosols when handling the bedding.

1. Identification of the agent

Demonstration of encapsulated *B. anthracis* in smears of blood or tissues from fresh anthrax carcasses and growth of the organism on blood agar plates is relatively uncomplicated and within the capability of most bacteriology laboratories. Difficulty may be encountered in the case of pigs and carnivores in which the terminal bacteraemia is frequently not marked, or in animals that received antibiotics before death.

Recovery of *B. anthracis* from old decomposed carcasses, processed specimens (bone meal, hides), or environmental samples (contaminated soil) is also often difficult, requiring demanding and labour-intensive procedures.

a) Fresh specimens

• Capsule visualization

As described above, virulent encapsulated *B. anthracis* present in tissues and blood and other body fluids from animals that have died of anthrax should be looked for in smears of these specimens that have been dried, fixed and satined with polychrome methylene blue (M'Fadyean's reaction)/ The capsule stains pink whereas the bacillus cells stain dark blue. The cells are found in pairs or short chains and are often square-ended (the chains are sometimes likened to a set of railway carriages-so-called 'box car' appearance). The Gram and regular Giemsa stains do not reveal the capsule. The capsule is not present on *B. anthracis* grown aerobically on nutrient agar or in nutrient broths, but can be seen when the virulent bacterium is cultured for a few hours in a few milliliters of blood (defibrinated horse blood seems to work best). Alternatively, the capsule is produced when the virulent *B. anthracis* is cultured on nutrient agar containing 0.7% sodium bicarbonate and incubated in the presence of CO₂ (20% is optimal, but a candle jar works well). The agar is prepared by reconstituting enough nutrient agar base powder for 100ml of agar in 90ml of water. Autoclave and cool to 50°C in a water bath. Add 10ml of a filter-sterilized (0.22~0.45µm filter) 7% solution of sodium bicarbonate. Mix and pour into Petri dishes. The encapsulated *B. anthracis* will form mucoid colonies and the capsule can be visualized by making thin smears on microscope slides, fixing and staining with polychrome methylene blue as before.

• Polychrome methylene blue (M'Fadyean's stain)

Polychromethylene blue is prepared as follows : 0.3g of methylene blue is dissolved in 30ml of 95% ethanol ; 100ml of 0.01% potassium hydroxide (KOH) is mixed with the methylene blue solution. Ideally, this should be allowed to stand exposed to the air, with occasional shaking, for at least a year to oxidise and mature. Addition of K₂CO₃ (to a final concentration of 1%) hastens the 'ripening' of the stain, but before it is regarded as diagnostically reliable, its efficacy should be established by testing it in parallel with an earlier, functional batch of stain on bona fide samples. It has now been found that stains that give positive reactions with cultures of *B. anthracis* cultured artificially in horse blood sometimes do not give positive results in the field.

In making smears for staining, only small drops of blood or tissues fluid are needed and a thin, small smear is best. After fixing and drying, a small (approximately 20µl) drop of stain is placed on the smear and spread over it with an inoculating loop. After 1 minute the stain is

washed with water into a hypochlorite solution (10,000 ppm available chlorine). The slide is blotted, air-dried and observed initially using the $\times 10$ objective lens under which the short chains appear like short hairs; once found, these can be observed under oil immersion ($\times 1,000$) for the presence of the pink capsule surrounding the blue/black-staining bacilli. To avoid laboratory contamination, the slide and blotting paper should be autoclaved or left for some hours in hypochlorite disinfectant.

· **Culture and identification of *Bacillus anthracis***

Bacillus anthracis grows readily on most types of nutrient agar; 5~7% horse or sheep blood agar is the diagnostic medium of choice, however. Swabs of blood, other body fluids or swabs taken from incisions in tissues or organs can be spread over blood agar plates. After overnight incubation at 37°C, *B. anthracis* colonies are white or grey-white, 0.3~0.5cm in diameter, nonhaemolytic, with a ground-glass moist surface, and very tacky when teased with an inoculating loop. Tailing is sometimes seen, and prominent wisps of growth trailing back toward the parent colony, all in the same direction are sometimes seen. This characteristic has been described as a 'medusa head' appearance. Confirmation of identity as *B. anthracis* can be accomplished by testing for diagnostic 'gamma' phage and penicillin susceptibility and capsule induction. Absence of motility is an additional test that can be done.

The susceptibility of *B. anthracis* to the gamma bacteriophage was first described by Brown & Cherry in 1955. The phage is available from CDC (see footnote 1), various national central veterinary laboratories and other anthrax reference laboratories. The procedure for the test is simply to streak a blood or nutrient agar plate, or portion of a plate (several tests can be done on one plate) with the suspect organism and place a 10~15 μ l drop of the phage suspension to one side of the streaked area. A 10-unit penicillin disk can be placed to the other side. Allow the drop of phage suspension to soak in and incubate the plate at 37°C. A control culture should be included; the vaccine strain can be used for this. After several hours incubation, if the culture is *B. anthracis*, the area under the phage will be devoid of bacterial growth, due to lysis of the *B. anthracis*, and a clear zone is seen around the penicillin disk also. (Note : phage-resistant *B. anthracis* isolates are encountered very occasionally; similarly, there are a few reports in the literature of penicillin-resistant strains.)

Propagation of the diagnostic 'gamma' bacteriophage

· The bacteriophage can be propagated and concentrated by the following protocol:

Stage one

i) Spread a blood agar plate of the Sterne vaccine strain of *B. anthracis*. Incubate at 37°C overnight.

ii) Inoculate approximately 10ml of nutrient broth with growth from the blood agar plate and incubate at 37°C for about 4 hours (until just cloudy), then refrigerate.

iii) Spread 100 μ l of the culture from step ii on three predried blood agar plates and incubate at 37°C for 30~60 minutes.

iv) Spread 100 μ l of the phage suspension to be amplified over the same plate. Incubate at 37°C overnight.

v) Harvest the phage-lysed growth on the blood agar plate in 5ml of nutrient broth followed by a second 'wash' of 5ml nutrient broth. Incubate at 37°C overnight.

vi) Filter (0.45 μ m) and count by dropping 20 μ l drops (3 drops per dilution) of tenfold dilutions of the filtrate in saline onto lawns of the *B. anthracis* culture prepared as in step iii.

Stage two

This is essentially the same procedure as Stage one, only using the filtrate from step vi to harvest the phage from the plates i.e..

vii) Prepare three Steme strain lawns on blood agar, as in step iii. Incubate at 37°C 30~60 minutes.

viii) Spread 100 μ l phage from step vi Incubate at 37°C overnight.

ix) To 9ml of filtrate from step vi, add 1ml of 10 \times concentrated nutrient broth.

x) Harvest the phage from step viii with 5ml of the solution from step ix, followed by a second 5ml wash, with the rest of the solution from step ix.

xi) Add 10ml of 1 \times nutrient broth.

xii) Incubate at 37°C overnight, filter and count.

Stage three

xiii) Inoculate 100ml of brain-heart infusion broth with approximately 2.5ml of the culture from step ii. Incubate on a rotary shaker at 37°C until just turbid.

xiv) Add the 20ml of filtrate from step xii and continue incubation overnight.

xv) The resultant filtrate is checked for sterility and titrated in tenfold dilutions on lawns of the vaccine strain as in step vi to determine the concentration of the phage. This should be of the order of 10⁸~10⁹ plaque forming unites per ml.

• Confirmation of virulence with the polymerase chain reaction

Full confirmation of virulence can be carried out using the polymerase chain reaction (PCR). The following instructions are taken from reference 13. Template DNA for PCR can be prepared from a fresh colony of *B. anthracis* on nutrient agar by resuspension of a loopful of growth in 25 μ l sterile deionized (or distilled) water and heating to 95°C for 10 minutes. Following cooling to approximately 4°C, and brief centrifugation, the supernatant can be used for the PCR reaction.

Suitable primers for confirming the presence of the pX01 and pX02 plasmids are given in the table below.

Target	Primer ID	Sequence 5'-3'	Product size	Concentration
Protective antigen (PA)	PA 5 3048-3029	TCC TAA CAC TAA CGA ACT CG	596bp	1mM
	PA 8 2452-2471	GAG GTA GAA GGA TAT ACG GT		
Capsule	1234 1411-1430	CTG AGC CAT TAA TCG ATA TG	846bp	0.2mM
	1301 2257-2238	TCC CAC TTA CGT AATCTG AG		

PCR can be carried out in 50 μ l volumes using the above primers, 200mM each of dATP, dCTP, dTTP and dGTP, 1.5mM MgCl₂ and 2.5 units of amplitaq polymerase, all in NH₄ buffer, followed by the addition of 5 μ l of template DNA.

Alternatively, 'Ready-To-Go'™ beads are available from Pharmacia Biotech. These are premixed, predispensed, dried beads, stable at room temperature, containing all the necessary reagents, except primer and template, for performing 25 μ l PCR reactions. The template can be added in a 2.5 μ l volume.

The following PCR cycle can be used : 1 \times 95 $^{\circ}$ C for 5 minute; 30 \times (95 $^{\circ}$ C for 0.5minute followed by 55 $^{\circ}$ C for 0.5minute followed by 72 $^{\circ}$ C for 0.5 minute); 1 \times 72 $^{\circ}$ C 5 minutes; cool to 4 $^{\circ}$ C.

b) Agent identification from old, decomposed specimens, processed material, and environmental samples, including soil

These specimens more often than not have saprophytic contaminants that outgrow and obscure *B. anthracis* on nonselective agars. The following procedure is suggested.

i) The sample is blended in two volumes of sterile distilled or deionized water and placed in a water bath at 62.5 \pm 0.5 $^{\circ}$ C for 15 minutes.

ii) Tenfold dilutions to 10⁻² or 10⁻³ are then prepared. From each dilution, 10~100 μ l are plated on to blood agar (optional) and 250~300 μ l on to PLET agar (polymyxin, lysozyme, EDTA, thallos acetate) (7,13). All plates are incubated at 37 $^{\circ}$ C.

iii) Blood agar plates, if included, are examined for typical colonies as previously described after overnight incubation, and the PLET plates are examined after 40~48 hours. Confirmation of the identity of suspect colonies as *B. anthracis* is done as described above. (It is rare, following this scheme, to find *B. anthracis* on blood agar plates and not on the PLET and the costs of inclusion of the blood plates may not be considered to be justified by the relatively poor returns they supply.)

PLET medium(7,13) is prepared by using heart infusion agar base (DIFCO) made up to the manufacture's instructions with the addition of 0.25~0.3g/l EDTA and 0.04g/l thallos acetate. (NOTE: thallos acetate is poisonous and should be handled with care.) The mixture is autoclaved and uniformly cooled to 50 $^{\circ}$ C before adding the polymyxin at 30,000units/l and lysozyme at 300,000 units/l. After mixing thoroughly, the agar is dispensed into Pertri dishes.

Reports of procedures for direct detection of *B. anthracis* in soils and other environmental specimens using the PCR are emerging. None of these has become routinely applicable at the present time and sensitivity levels remain at least 100-fold less than the conventional PLET-based procedure given above.

Animal inoculation may be considered for recovery of *B. anthracis* if all other methods fail. Examples of when this might occur are specimens from animals that received antibiotic therapy before death or environmental samples containing sporostatic chemicals. Due to the increasing concern to eliminate the use of animals for biological testing, this approach should be used as a last resort and only if justified. Adult mice or guinea-pigs are the choice. If the samples involved are soil, the animals should be pretreated, the day before testing, with both tetanus and gas gangrene antiserum. The samples are prepared as described for culturing

(Section A.1.b above), including heat shocking at 62.5°C for 15 minutes. Mice are injected subcutaneously with 0.05~0.1ml; guinea-pigs are inoculated intramuscularly with up to 0.4ml (0.2ml in each thigh muscle). Any *B. anthracis* present will result in death in 48~72 hours and the organism can be cultured from the blood as described above.

c) Immunological detection and diagnosis

It needs to be borne in mind that *B. anthracis* is antigenically very closely related to *B. cereus*, which is an almost ubiquitous component of the environmental microflora. The only unshared antigens that lend themselves to differentiating these two species by immunological approaches are the anthrax toxin antigens, produced during the exponential phase of growth, and the capsule of *B. anthracis*. This places considerable constraints on the extent to which immunological methods can be used in routine detection methodology.

• Ascoli test (1)

In 1911 Ascoli(1) published a procedure for the detection of thermostable anthrax antigen in animal tissue being used for by-products. This uses antiserum raised in rabbits to produce a precipitin reaction. The test lacks high specificity, in that the thermostable antigens of *B. anthracis* are shared by other *Bacillus* spp., and is dependent on the probability that only *B. anthracis* would proliferate throughout the animal and deposit sufficient antigen to give a positive reaction. Nowadays, it appears to be used in Eastern Europe only.

To perform the Ascoli test, put approximately 2g of sample in 5ml of saline containing 1/100 final concentration of acetic acid and boil for 5 minutes. The resultant solution is cooled and filtered through filter paper. A few drops of rabbit antiserum(see preparation below) are placed in a small test tube. The filtrate from the previous step is gently layered over the top of the antiserum. A positive test is the formation of a visible precipitin band in under 15 minutes. Positive and negative control specimen suspensions should be included.

Antiserum prepared in rabbit by the subcutaneous inoculation of Sterne strain anthrax vaccine on days 1 and 14. On days 28 and 35, the rabbits receive 0.5ml of a mixture of several strains of virulent *B. anthracis* not exceeding 10⁵ colony-forming units(cfu)/ml suspended in saline. Alternatively, the live virulent bacteria can be inactivated by prolonged suspension in 0.2% formalized saline, but the antigen mass needs to be increased to 10⁸~10⁹ cfu/ml. The suspension should be checked for inactivation of the *B. anthracis* before animal inoculation by culture of 0.1ml into 100ml of nutrient broth containing 0.1% histidine and, after incubation at 37°C for 7 days, subculture on to blood or nutrient agar. The dose regimen for the formalized suspension after initial vaccination on days 1 and 14 is increasing doses of 0.1, 0.5, 1, and 2ml given intravenously at intervals of 4~5 days. Following either procedure, a test bleed at 10 days after the last injection should determine whether additional 2ml doses should be administered to boost the precipitin titre.

• Immunofluorescence

While some success has been achieved with immunofluorescence for capsule observation in the research situation (4), it does not lend itself routine diagnosis.

2. Serological tests

Historically, there has been little need for serological support for the diagnosis of anthrax in animals. Either the animal had anthrax, recognized from the recent history of the herd or site, and was treated accordingly, or it died. Most of the interest in developing serological testing has been for research on humoral responses in humans, and to a lesser extent in animals, for evaluating vaccines and for epidemiological studies involving naturally acquired seroconversion in humans, livestock and wild mammals.

Currently accepted as the best serological procedure is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microtiter plates coated with the protective antigen (PA) component of the anthrax toxin at 3~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in high pH (9.5) carbonate-coating buffer. The toxin antigens appear to be truly specific for *B. anthracis*, although there is at present no commercial source of these. This means that anthrax serology is currently confined to a few specialist laboratories. Various versions of the ELISA exist and can be found in standard laboratory manuals; any version will do for anthrax serology, although certain sera appear to be more 'sticky' than others. A useful tip is to use reconstituted dried milk as the blocking agent and to raise its concentration until control negative sera are giving reliable negative results. For bovine sera, this may be a 10% suspension or higher.

<참고사항: 본 OIE manual은 2000년에 개정예정인 자료를 수록한 것입니다>

IX. 참고문헌

1. AOAC : Official methods of analysis, Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs, Volume One, 15th edition. Association of official analytical chemists, 133-146
2. Beall FA, Taylor MJ and Thorne CB : Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol*, 83 : 1274-1280, 1962
3. Berkeley RCW and Good Fellow M: The aerobic endospore-forming bacteria: Classification and Identification. *Academic Press, New York*. 1981.
4. Beyer, W, Glockner P, Otto J, and Bohm R : A nested PCR method for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples collected from former tannery sites. *Microbiol. Res.* 150: 179-186, 1995.
5. Bowen JE, Henderson I, Turnbull PCB. Selective systems for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental specimens. Proceedings of International Workshop on Anthrax, *Salisbury Medical Bulletin-special supplement* NO. 87 : 40-42, 1995.
6. Brachman, PS. Anthrax. In:Warren KS. Mahnoud AF. eds. Tropical and geographic medicine. *New York: McGraw-Hill*. 1984:826-30.
7. Bragg, TS and Robertson, DL : Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene from *Bacillus anthracis*. *Gene* 81. 45, 1989.
8. Briggs, PM, Delta, BG, and Keener SR. : Human cutaneous anthrax. *MMWR* 37, 41, 1988.

9. Burans, J, Keleher, A, O'Brien, T, Hager, J, Plummer, A, and Morgan, C : Rapid method for the diagnosis of *Bacillus anthracis* infection in clinical samples using a hand-held assay. *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*, 36, 1995.
10. Carl, M, Hawkins R, Coulson N, Lowe J, Robertson DL, Nelson WM, Titball RW, and Woody JN : Detection of spores of *Bacillus anthracis* using the polymerase chain reaction. *J. Infectious Diseases* 165, 1145, 1992.
11. Carman, JA, Hambleton, P, and Melling, J : *Bacillus anthracis*. In Collins, CF and Grange, JM(eds). Isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance. *Society for Applied Bacteriology*. Technical Series No.21, pp 207-219, Academic Press, London, 1985.
12. C.H. Collins : Disinfectants, Their use and evaluation of effectiveness. *Academic press*. 33-36
13. Chul-Soon Choi, Sang-In Chung, Ki-Jeong Kim, Chan-Ho Chung, Won-Yong Kim and Yong-Tae Yang : Study on the antigens for cell free vaccine and retrospective diagnosis of anthrax: Production of protective antigen of *Bacillus anthracis*. *J. Korean Soc. Microbiol*, 31(6) : 631- 641, 1996.
14. Claus, D, and Berkeley RCW 1986. Genus *Bacillus*, Bergey's manual of systemic bacteriology. Vol. 2. ed. pp1105-1139. Peter H. A. Sneath, Williams & Wikins.
15. Conrad P. Quinn, Clifford C. Shone, Peter C. B. Turnbull and Jack Melling : Purification of anthrax-toxin components by high-performance anion-exchange, gel filtration and hydrophobic interaction chromatography. *Biochem. J*; 252 : 753-758, 1988
16. Corinne Pezard, Patrick Berche and Michele Mock : Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infec. Immun*, 59(10) : 3472-3477, 1991

17. Curtis B. Thorne, Dorothy M. Molnar and Richard E. Strange : Production of Toxin in vitro by *Bacillus anthracis* and its separation into two components. *J. Bacteriol*, 79 : 450-455
18. Doyle, RJ, Keller, KF, and Ezzell, JW : Bacillus. In:Lennette EH. Balows A. Hausler WJ. Shadomy HJ. eds. Manual of Clinical Microbiology 4th ed. Washington D.C: *American Society for Microbiology*. 211, 1985.
19. Escuyer,U, Duflot,E, Sezer,O, Danchin,A, and Mock,M : Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene* 71.293, 1988.
20. Ezzell JW and Abshire TG : Immunological analysis of cell-associated antigen of *Bacillus anthracis*. *Infec. Immun*, 56 : 349-356, 1988
21. F. C. Jackson, George G. Wright and James Armstrong : Immunization of cattle against experimental anthrax with alum-precipitated protective antigen or spore vaccine. *Am. J. Vet. Res*, 1957
22. Ferrier, GR, Spencer, TL and Patten, B : Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Bacillus anthracis* in serum from sheep and cattle. *Proceedings of International Workshop on Anthrax*, 77, 1989.
23. Fujikura, T : Current occurrence of anthrax in man and animals. *Proceedings of International Workshop on Anthrax, Salisbury Medical Bulletin-special supplement* N0.68 : 1, 1989.
24. Gebhart, LJ, Ward, GE,and Murtaugh, MP. : Species specific cloned DNA probe for the identification of *Campylobacter hyointestinalis*. *J. Clin. Microbiol*. 27, 2717, 1989.
25. G.R. Carter and John R. Cole, Jr. : Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, Fifth edition. Academic press, 221-228, 1990

26. Gray L. Andersen, Jenny M. Simchock and Kenneth H. Wilson : Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol*, 178(2) : 377-384, 1996
27. Hugh-Jones, ME : World situation 1993/94. *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*, 1, 1995
28. Hutson, RA and Duggleby, C : DNA probes for anthrax detection. *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*, 27, 1989.
29. Ivins BE, Ezzell JW, Jemski J, Hediund JW, Ristroph JD and Leppla SH : Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. *Infec. Immun*, 52 : 454, 1986
30. Joanne M. Bartkus and Stephen H. Leppla : Transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Infec. Immun*, 57(8) : 2295-2300
31. Johns M, Harrington L, Titball RW, et. al. Improved methods for the detection of *Bacillus anthracis* spores by the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 18 : 236-238. 1994.
32. Joseph D. Ristroph and Bruce E. Ivins : Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new defined culture, medium. *Infec. Immun*, 39(1) : 483-486, 1983
33. Kelly DJ, Chulay JD, Mikesell P and Friedlander AM : Serum concentrations of penicillin, doxycycline and ciprofloxacin during prolonged therapy in rhesus monkeys. *J. Infect. Dis.* 166(5) : 1184-1187, 1992
34. Kim IJ, HA GY, Cheong HK, et. al. Isolation of *Bacillus anthracis* from patient blood. *J Kor Soc Microbiol* 29(3) : 245-248, 1994.
35. Kim KJ, Hong SJ, Chung SI. Identification of *B. anthracis* isolated from patients with acute septicemia in Kyungjoo city. *Chung-Ang Journal of Medicine* 19(3) : 265-277, 1994.

36. Klein-Albers, C, Honicke, E, Bohm R. and Pfisterer, RM: The detection of antibodies against the protective antigen of *Bacillus anthracis* in infected persons by enzyme-immunoassay (EIA). *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*, 75, 1989.
37. Laemmli E.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970
38. Leppla, SH, Ivins, BE, and Ezzell, JW. : Anthrax toxin. In Leive L,ed. Microbiology, Washington, DC: *American Society for Microbiology*. 63, 1985.
39. Little SF and Knudson GB : Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infec. Immun*, 52 : 509-512, 1986
40. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193 : 265-275, 1951
41. Makino, SI, Uchida, I, Terakado, N, Sasakawa, C, and Yoshikawa, M. : Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol*. 171,722, 1989.
42. Makino S, Yumiko I, Tsutomu M, et.al. Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(3) : 547-551, 1993.
43. Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD and Dreier TM : Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infec. Immun*, 39 : 371-376, 1983
44. Mogollon,JO,Pi Joan,C, Murtaugh,MP, Kaplan,EL, Collins,JE, and Cleavy PP. : Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol*. 28, 2462, 1990.

45. Niederwohrmeier, B and Bohm, R : Enzyme immunoassay for rapid detection of *Bacillus anthracis*. *Proceedings of International Workshop on Anthrax*, 24, 1989.
46. Patra, G, Sylvestre, P, Rammise, V, Therasse, J, and Guesdon, J-L: Specific oligonucleotide primers for rapid identification of *Bacillus anthracis* strains. *Proceeding of International workshop on Anthrax, Salisbury Medical Bulletin-special supplement* N0.87 : 45-46, 1995.
47. Peter C. B. Turnbull : Anthrax vaccines : past, present and future. *Vaccine*, 9 : 533-539, 1991
48. Quinn, CP, Shone, CC, Turnbull, PCB and Melling, J : Purification of anthrax-toxin components by high-performance anion-exchange, gel-filtration and hydrophobic-interaction chromatography. *Biochem. J.* 252, 753, 1988.
49. Ronald M. Atlas : Handbook of Microbiological media. CRC press, 817-818, 1993
50. Sambrook, J, Fritsch, EF, and Maniatis, T : Molecular cloning, a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
51. Sanger, F, Nicklen, S, and Coulson, AR : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74: 5463, 1977.
52. Sjøstedt A, Eriksson U, Rammise V, et. al. Detection of the vegetative form of *Bacillus anthracis* in soil by PCR. *Proc Int Workshop on Anthrax, Salisbury Medical Bulletin-special supplement* N0.87 : 50, 1995.
53. Stephex H. Leppla : Production and purification of anthrax toxin : 103-116
54. Tebbe CC, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environm Microbiol* 59 : 2657-2665, 1993.

55. Thorne, CB : Biochemical properties of virulent and avirulent strains of *Bacillus anthracis*. *Ann NY Acad Sci* 88: 1024-1033,1960.
56. Towbin H., T. Staehelin and J. Gordon : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 4350-4354, 1979
57. Turnbull PCB, Broster MG, Carman JA, Manchee RJ and Melling J : Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Infec. Immun*, 52 : 356-363, 1986
58. Victor Lorian M.D. : Antibiotics in laboratory medicine, Third edition. Williams & Wilkins press, 1-105, 1991
59. Vincent ·Ramisse, Guy Patra, Henri Garrigue, Jean-Luc Guesdon and Michele Mock : Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbio. Lett*, 145 : 9-16, 1996
60. Welkos SL and Friedlander AM : Comparative safety and efficacy against *Bacillus anthracis* of protective antigen and live vaccines in mice. *Microbial Pathogenesis*, 5 : 127-139, 1988
61. Welkos, SL, Lowe, IR, McCutchan, FE, Vodkin, M, Leppla, SH, Schmidt, IJ. : Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene*. 69, 287, 1988.
62. Williams, DR, Rees, GB, and Rogers, ME : Observations on an outbreak of anthrax in pigs in north Wales. *Veterinary Record* 131: 363-366, 1992.
63. 농촌진흥청 : 가축위생과 질병, 소독. 58-70, 1992
64. 농촌진흥청 가축위생연구소 : 한국의 가축위생연구-가축위생연구소 80년사 : 59-63, 1991

65. 박근식, 최철순, 문재봉 : Frazier-Gelatin 한천배지상의 *Bacillus anthracis* 지락의 특성. 농사시험연구보고. 15(가위) :19-23, 1973
66. 양옥동, 동수림, 소동루 : 炭疽 防治 手冊. 중국농업출판사, 1995
67. 윤충근 : 가축질병의 예방관리(1). 축산진흥 3: 99-104, 1996
68. 이영옥 : 소독제제의 효과적 이용과 국내현황. 대한수의사회지, 20(9) : 528-537, 1984
69. 이준규, 이은미, 차우양, 김정화, 김영환, 이양수, 김우현, 정종식 : 경주에서 분리된 탄저균에 대한 연구. *Korean J. Vet. Serv*, 18(1) : 41-56
70. 이지연, 유한상, 전용수등. 중합효소 연쇄반응을 이용한 탄저의 진단법 개발. 한국수의공중보건학회지. 21(1) : 15-24, 1997.
71. 이현수, 하민식, 박정문, 박근식 : 탄저 및 기종저 예방약 개량에 관한 연구. 시험연구보고서, 1965
72. 조성근, 박정문, 최영길 등. 생화학 및 혈청학적인 기술에 의한 한국에서 분리된 탄저균의 특성. *대한미생물학회지* 31(4) : 415-422, 1996.
73. 차연호, 전경희, 전윤성 : 탄저침강소 제조용 탄저균주에 대한 연구. 시험연구보고서, 27-45, 1967
74. 최철순: 탄저균(*Bacillus anthracis*) 의 병원성 분리균주와 약독백신주 (Pasteur No. 1, 2 및 Sterne 주) 간의 감별 특성과 국내의 동물 과 인체 감염에 대한 전염병학적 고찰: 1907-1989. *한국수의공중보건학회지* 13(2) : 137-147, 1989.
75. 최철순, 문재용, 조용준, 김영태 : 경북도내에 발생한 탄저의 역학적 조사와 분리균주에 대한 생물학적성상 조사. *가축위생연구소보*, 11(1) : 71-86, 1965

76. 최철순, 박정훈, 정상인, 양용태 : 탄저균의 협막형 균주의 전 균체항원에 대한 면역혈청을 이용한 Ouchterley 면역확산시험에 의한 탄저균 및 유사탄저균의 균종동정과 균주 감별. *대한미생물학회지* 27(5) : 407, 1992.
77. 최철순, 장호근, 강 석, 김기정, 정상인, 양용태, 박정문, 권준현 : 단크론 항체를 이용한 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 동정. *대한 미생물학회지* 29(6) : 535-545, 1994.
78. 한국동물약품협회 : 동물용의약품편람, 소독제. 999-1044, 1997.
79. 한홍률 : 원유위생과 농가지도방법. *대한수의사회지*, 32(2) : 107-116, 1996

