

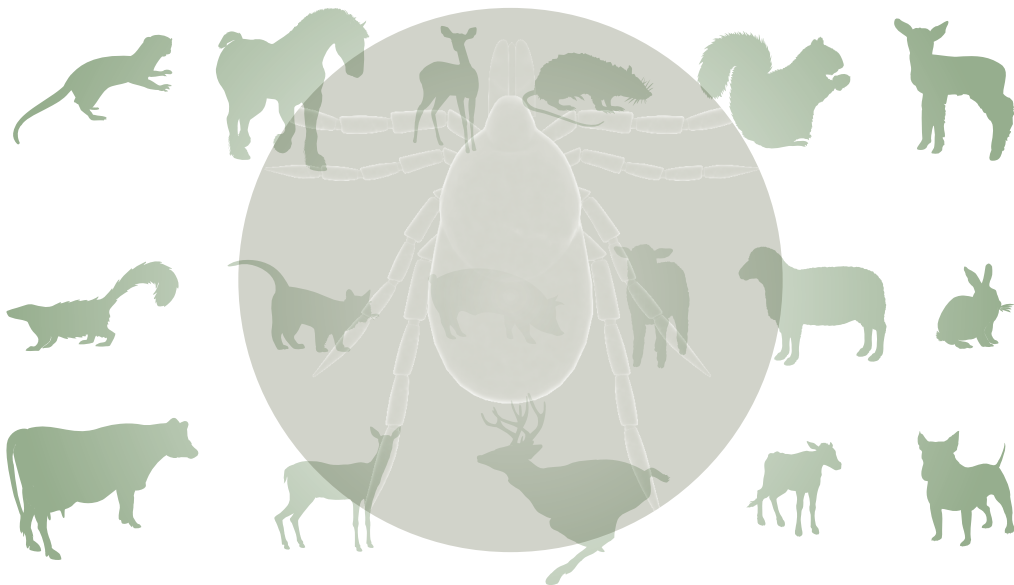
「야생동물 매개 질병 예방 · 관리지침」

# 제1편: 중증열성혈소판 감소증후군(SFTS)의 예방 · 대처 및 진단

「Guidelines for Wildlife Mediated Diseases」

## Series I : Prevention and Diagnosis of SFTS\* by Outdoor Activities

\* SFTS: Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome



환경부 국립환경과학원



## CONTENTS | 차례

### 머릿말

#### I. 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 개요

- 1. 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) ..... 5
- 2. 질병원인체 : SFTS 바이러스 ..... 8

#### II. SFTS 질병발생 현황 및 예방요령

- 1. SFTS 질병발생 현황 ..... 10
- 2. SFTS 예방요령 ..... 12
- 3. SFTS 이외의 진드기 매개 질병 ..... 15

#### III. 대처방법과 신고요령

- 1. 각종 상황 별 대처방법 ..... 17
- 2. 신고요령 ..... 18

#### IV. 부록

- 1. SFTS 진단법 ..... 19
- 2. 관련부서 연락처 ..... 33

## 머릿말

2009년 3월, 중국 중부 및 동북부지역에서 고열, 소화기증상, 혈소판 감소 등을 특징으로 하는 질환이 집단 발생하였다. 본 질병은 발생 초기 치명률이 30%에 이르고 기존에 알려진 질환이 아닌 것으로 확인되어 중국 CDC는 역학조사를 실시하였다. 이후 2년간의 조사와 연구 끝에 원인 바이러스를 규명하였고, 증상의 명칭을 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS)으로 명명하였다.

SFTS는 바이러스를 보유하고 있는 진드기에 물려 전파되며, 주요 매개종은 작은소피참진드기 (*Haemaphysalis longicornis*)로 우리나라를 포함해 중국, 일본 등 동아시아에 분포해있다.

우리나라에서는 2013년 3월 진단체계를 확립하여 2013년 5월 21일 최초 사례 발견 보고를 하였고, 이후 SFTS는 2013년 9월 23일 제4군 법정감염병으로 지정되었다.

본 책자는 야생동물과 진드기를 통해 감염될 수 있는 SFTS에 대한 예방요령과 진단방법을 제공하기 위해 제작되었다. SFTS의 기본정보와 발생현황, 예방 및 대처방법, 진단방법을 제시함으로써 야생동물 매개 질병에 대한 가이드라인을 제시하고자 한다.

# I 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 개요

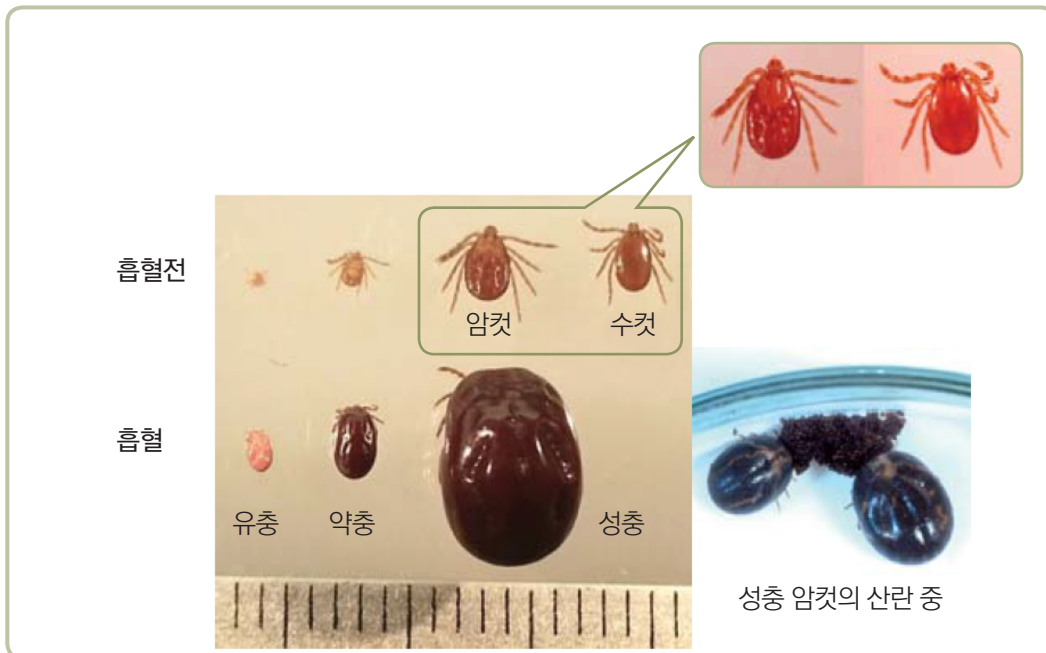
## 1. 중증열성혈소판감소증후군

### ■ 중증열성혈소판감소증후군(SFTS)이란?

- SFTS 바이러스에 의해 감염되며, 주로 작은소피참진드기가 매개하는 질병
- SFTS는 법정감염병 제4군으로 분류되는 감염병으로 환자 및 병원체 보유자는 즉시 의료 기관이나 보건소를 방문하여 신속한 진단과 치료를 받아야 한다.

※ Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) : 중증열성혈소판감소증후군

※ 제4군 감염병 : 국내에서 새롭게 발생하였거나 발생할 우려가 있는 감염병 또는 국내 유입이 우려되는 해외 유행 감염병으로 보건복지부령으로 정하는 법정감염병



〈 SFTS를 매개하는 작은소피참진드기의 생김새 〉 ※ 국립환경과학원

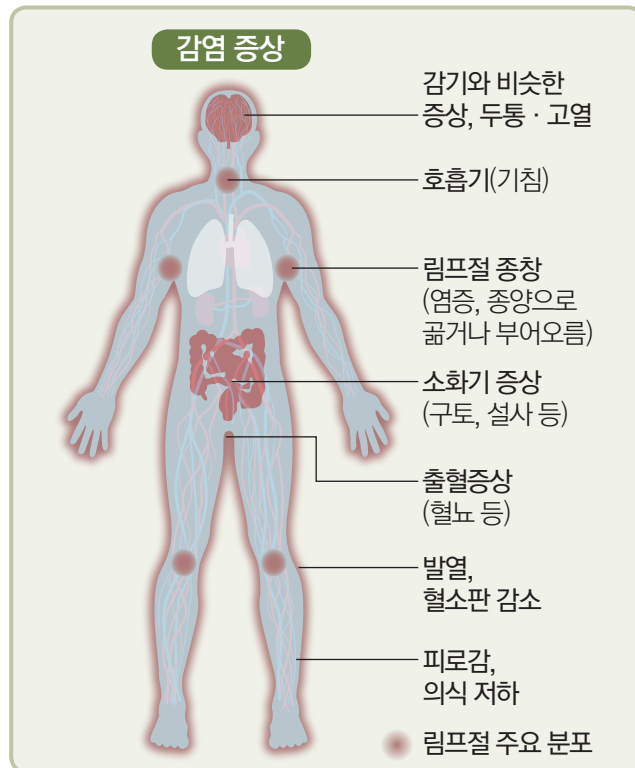
## ■ SFTS 증상 및 특징

### • 증상

- 38~40 °C의 고열이 3~10일간 지속
- 구토, 설사, 식욕저하 등 위장관계 증상
- 혈소판 감소(95~100%) 및 백혈구 감소증(86~99%) 동반
- 림프절종창(33~75%)이 증상발생 5일 후 출현하여 1~2주 지속
- 출혈성 증상(49%) 또는 다발성 장기부전(ALT, AST, LDH, CK, 단백뇨, 혈뇨)
  - ※ALT/AST: 간 기능 수치, LDH: 염증수치, CK: 골격근 손상 수치
- 심각한 경우 신경증상 동반(근육경련, 착란), 파종성 혈관 내 응고, 혼수상태

### • 질병의 특징(질병관리본부)

- 감염자 연령(중앙값)
  - 58세(범위 1~90세)
- 감염군 특성
  - 주로 농업, 임업 종사자(80~97%)
- 계절적 특성
  - 5~8월 집중(4~11월 진드기 활동)
- 잠복기
  - 1~2주(6~14일)



〈 SFTS 증상 주요 발현 부위 〉

• 임상경과

- 감염 약 일주일 경과 후 2주 이내(7~13일)에 혈소판 농도 및 장기기능이 정상으로 돌아오지 않는 경우 회복이 어려울 수 있음
- 사망환자의 경우
  - 70세 이상 연령 증가에 따른 사망률 증가
  - ※ 다른 만성질환 및 면역저하와 관계되는 것으로 판단
  - 증상발현부터 사망까지 9일(평균), 대부분 2주 이내

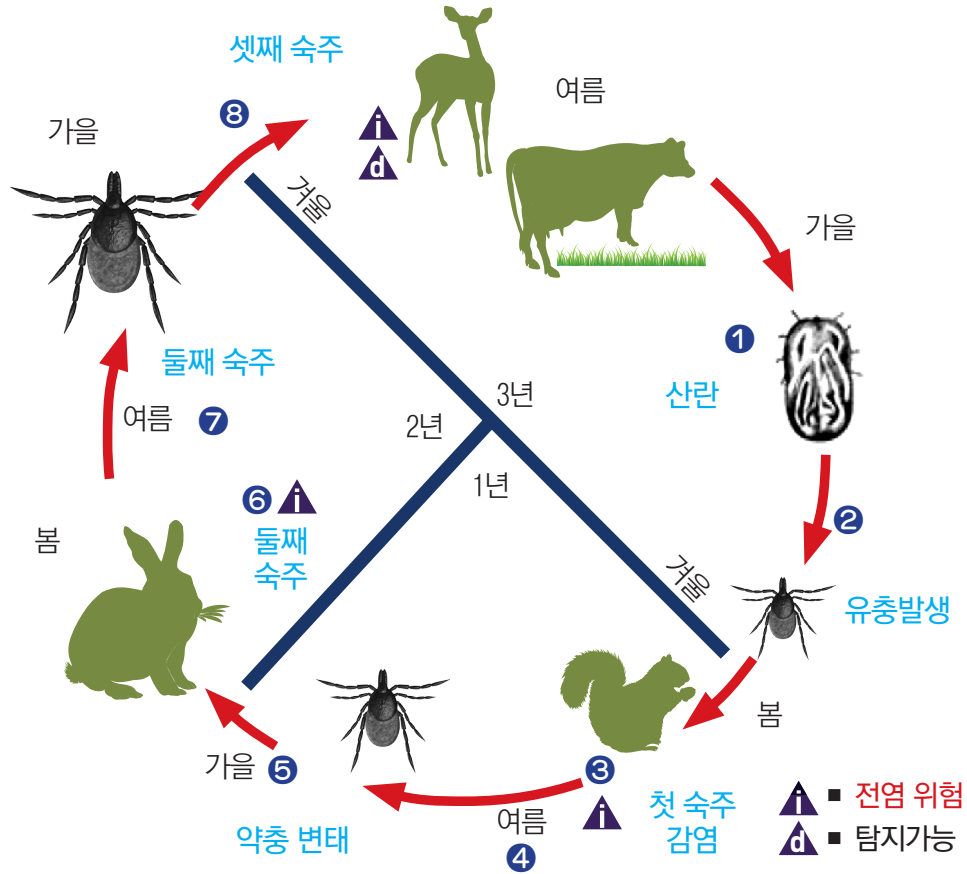
〈 감염 후 기간별 주요 증상 발현 특성 〉

감염 결과	검사 요소	1 단계 발열기 (1~7일)	2 단계 조직기능저하기 (7~13일)	3 단계 회복기 (14일~)
사망	바이러스 농도	높음	높음	사망
	혈소판	감소	감소된 상태유지	사망
	AST/LDH/CK/CK-MB	증가	계속 증가	사망
생존	바이러스 농도	높음	감소	미검출
	혈소판	감소	회복	정상
	AST/LDH/CK/CK-MB	증가	회복	정상

• 전파방식

- 진드기매개질병(Tick borne diseases): SFTS 바이러스에 감염된 매개체(진드기)가 사람을 물어 감염
- 추정매개체 : 작은소참피진드기(*Haemophysalis longicornis*)
- 숙주 : 포유류(소, 염소, 양, 원숭이, 돼지, 사슴, 고양이, 쥐 등)가 SFTS 바이러스에 잘 감염되는 것으로 추정
  - ※ SFTS virus에 감염된 환자의 치료 중 혈액 및 체액에 노출되어 감염된 사례가 보고된 바 있음<sup>1)</sup>

1) WY Kim et al. Nosocomial Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Korea. CID 2015;60:1681-83



〈 작은소창피진드기의 자연환경 중 생활사 및 감염시기 〉 ※ 미국질병통제예방센터(US CDC)

## 2. 질병원인체 : SFTS 바이러스

### ■ SFTS 바이러스 구성

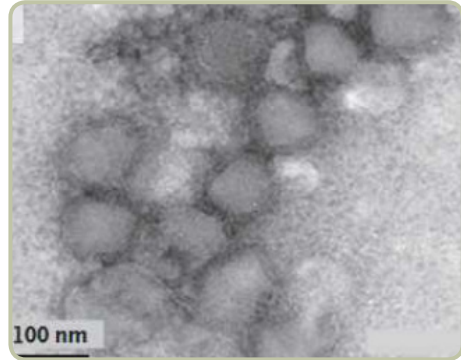
- 분아바이러스과 플레보바이러스 속에 속하는 바이러스로 유전자는 단일가닥 RNA로 3개의 분절로 구성

※ Family Bunyaviridae, Genus *Phlebovirus*



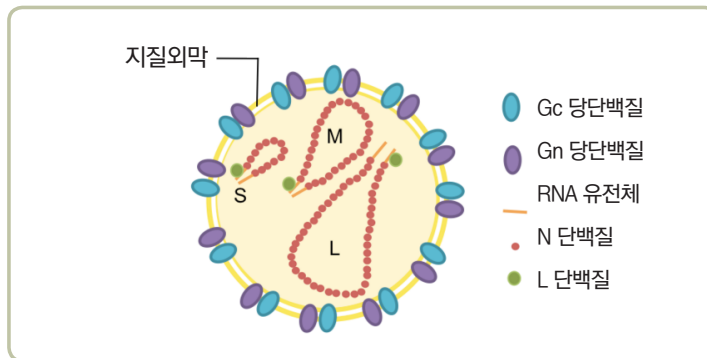
■ 바이러스 특성

- 유전물질 : 3개의 분절(segment)로 구성
  - 큰 분절 : Large segment, 6,368 bp(염기쌍, base pair)
    - RNA 의존 RNA 중합효소
      - ※ RNA-dependent RNA polymerase, RdRp
  - 중간 분절 : Medium segment, 3,378bp
    - 2개의 당단백질 외피(바이러스의 껍질)
      - ※ envelop glycoprotein, Gn/Gc
  - 작은 분절 : Small segment, 1,744bp
    - 뉴클레오캡시드 및 비구조 단백질
      - ※ Nucleocapsid protein and nonstructural S protein



〈 SFTS 바이러스 전자현미경 사진 〉

※ 중국 질병통제센터



〈 SFTS 바이러스의 유전물질 구조 〉

- 산(acid)이나 열(온도)에 약해서 일반 소독제(알코올 등), 주방용 세제, 자외선 등에서 급속히 사멸

## II SFTS 질병발생 현황 및 예방요령

### 1. SFTS 질병발생 현황

#### ■ 국내 · 외 SFTS 발생 현황

- 2009년 중국 중부 및 동북부 지역 (Jiangsu, Anhui, Hubei, Henan, Shandong, Liaoning) 에서 고열, 소화기증상, 혈소판 감소, 백혈구 감소, 다발성 장기부전을 특징으로 하는 원인 불명 질환 집단 발생

- 중국: 2011년 중국에서 SFTS 원인은 바이러스임을 확인

※ 11~12년 2년간 총 2047건 확인, 129명 사망(치명률 약 6%)



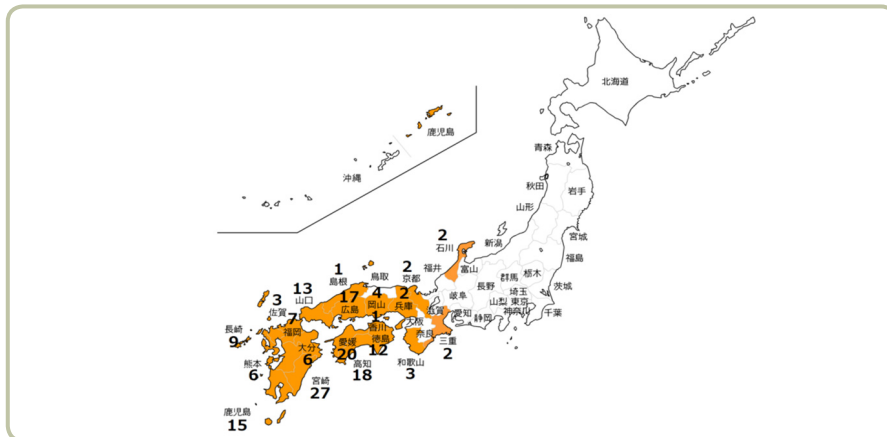
〈 중국 내 SFTS 발생지역(적색) 〉 ※ 중국 질병통제센터, 2011년

- 한국: 2013년 5월 21일 우리나라 최초 사례 확인
  - 역추적조사를 통해 최초 확진 환자 확인(서울대병원)
  - 2013~2015년 3년간 평균 치명률 32%



〈 2013~2014년 국내 SFTS 환자분포 〉 ※ 100만명당 연간 발생율, 질병관리본부

- 일본: 2013년 1월 30일 일본 최초 사례 확인(일본후생노동성)
  - 2016년 2월까지 20개 지역에서 170명의 환자가 보고됨

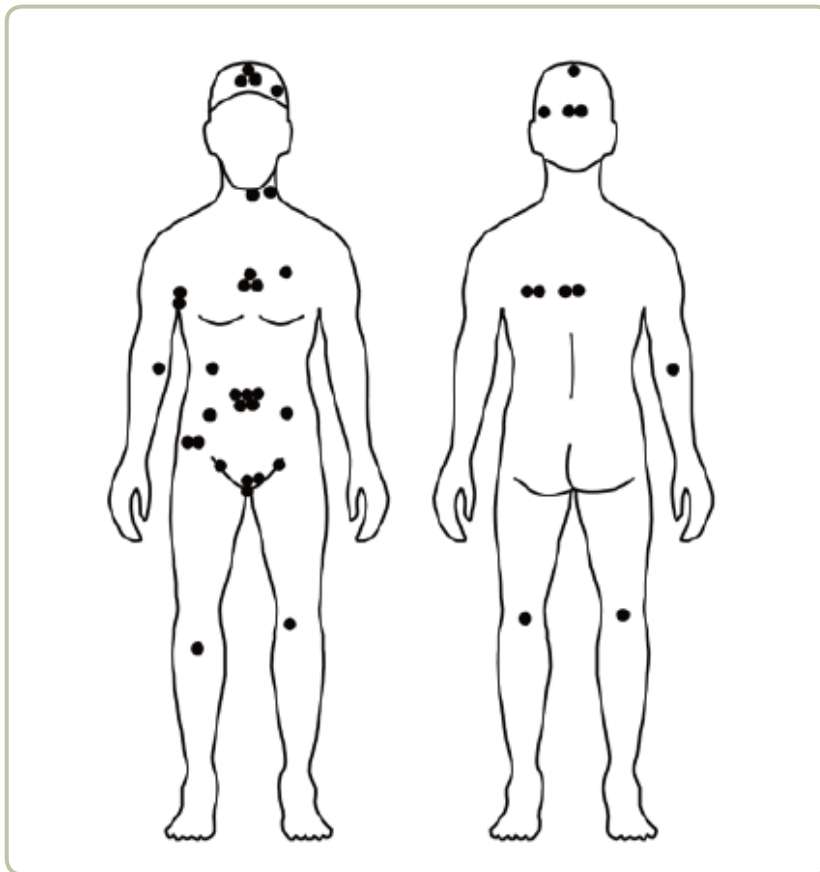


〈 일본 내 SFTS 발생지역(황색) 및 환자 수 〉 ※ 일본 NIID, 2016년

## 2. SFTS 예방요령

### ■ 예방대책

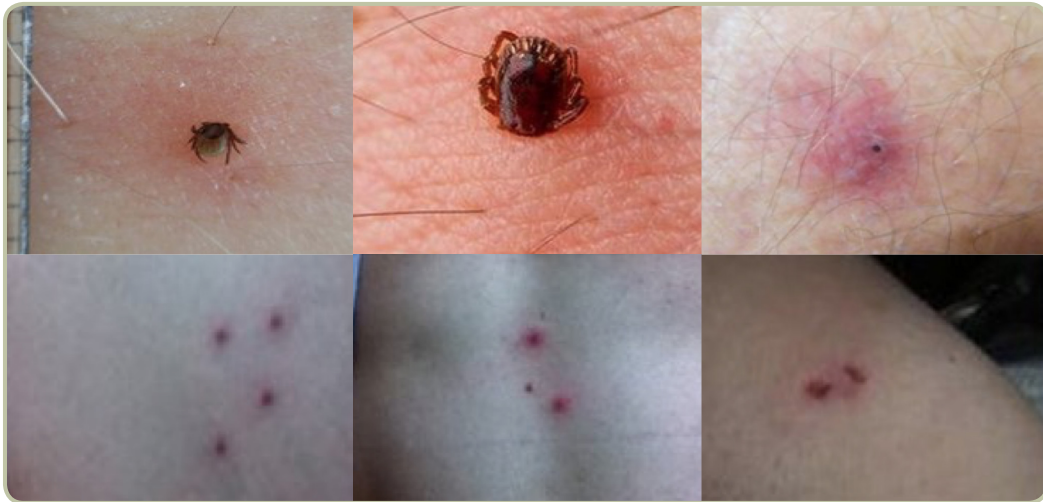
- 야외에서 진드기에 물리지 않도록 함
- 감염자의 혈액, 체액, 배설물과 직접 접촉을 피함
- 외출 전에 진드기 기피제 등을 사용함



〈 신체부위 중 진드기에 잘 물리는 부위 〉 ※ 질병관리본부, 2014년

■ 예방수칙

- ① 작업복과 토시를 착용하고 양말, 장화를 신는다.
  - \* 작업복이란?
    - 일상복과 구분하여 작업 시에만 착용하는 옷
    - 피부노출을 최소화 할 수 있는 긴팔, 긴바지 등
- ② 야외작업 · 활동 시 기피제 사용이 일부 도움이 될 수 있다.
- ③ 풀밭에 옷을 벗어 놓고 직접 눕거나 앉지 않고 돛자리를 사용한다.
- ④ 풀숲에 앉아서 용변을 보지 않는다.
- ⑤ 개울가 주변 풀밭은 피하며, 작업지 근처 풀은 베는다.
- ⑥ 야외 활동 후 즉시 입었던 옷을 털고 반드시 세탁한다.
- ⑦ 집에 돌아온 후 바로 샤워나 목욕을 한다.
- ⑧ 주변 식물과의 접촉을 최소화하기 위해 길 중앙으로 걷는다.
- ⑨ 고열, 오한, 두통, 발진 등의 증상이 있을 경우 즉시 의료기관이나 보건소를 방문해 신속한 진단과 치료를 받는다.



〈진드기에 물린 자국들〉 ※ 인터넷 자료

- 야외활동 전에 진드기 기피제 사용
- 진드기 기피제 주성분 및 판매중인 제품 (식품의약품안전처)
  - 디에틸톨루아미드 계열 : 3종 (diethyltoluamide)
  - 이카리딘 계열 : 2종 (icaridin)
  - 에틸부틸아세틸아미노프로피오네이트 계열 : 3종 (ethyl butylacetylaminopropionate)
- ※ 진드기 기피제 구매 시 용기나 포장에 쓰여진 '의약외품'이라는 글씨를 반드시 확인

작업 전

긴옷에 토시를 착용하고 장화를 신는다. 벌레 쫓는 약인 기피제를 뿌린다.



작업 중

풀밭에 앉거나 눕지 않고 휴식할 때는 돛자리를 사용한다.  
※ 사용한 돛자리는 세척하여 햇볕에 말리기  
풀숲에 앉아서 용변을 보지 않는다.



작업 후

작업이 끝나면 바로 목욕을 한다.



작업복은 깨끗하게 세탁한다.



〈야외활동을 할 경우 지켜야할 예방수칙〉 ※ 보건안전공단

### 3. SFTS 이외의 진드기 매개 질병

#### ■ 진드기 매개 감염병

〈 진드기 감염병 매개체 및 질병의 종류 〉

매개체	감염병명	비고
털진드기	쯔쯔가무시증	제3군 감염병
옴진드기	옴 (피부질환)	-
참진드기	중증열성혈소판감소증후군(SFTS)	제4군 감염병
	큐열	제4군 감염병
	라임병	제4군 감염병
	야토병	제4군 감염병
	진드기매개 뇌염	제4군 감염병
	홍반열	-
	리케차병	-
진드기	진드기매개재귀열	-

※ 제3군 감염병 : 간헐적으로 유행할 가능성이 있어 계속 그 발생을 감시하고 방역대책의 수립이 필요한 감염병

※ 제4군 감염병 : 국내에서 새롭게 발생하였거나 발생할 우려가 있는 감염병 또는 국내 유입이 우려되는 해외 유행 감염병

■ 진드기 매개 감염병

〈 SFTS 원인 바이러스와 같은 계통에 속하는 바이러스의 종류 및 질병〉

속 (Genus)/virus	숙주의 질병	매개체
오쏘분야바이러스( <i>Orthobunyavirus</i> ) 라크로스(La Crosse) virus	사람 : 발열, 뇌염 소 : 유산, 선천성 장애	모기, 쿨리코이드 파리 (Culicoid flies)
나이로바이러스( <i>Nairovirus</i> ) 크리미언콩고출혈열(CCHF) virus 나이로비 양 질병(NSD)	사람 : 출혈열 양 : 출혈성위장염, 유산	진드기
플레보바이러스( <i>Phlebovirus</i> ) 리프트밸리열(Rift Valley Fever) 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) virus 허틀랜드 바이러스(Heartland virus)	사람 : 출혈열, 위장염 반추동물 : 괴사간염, 출혈, 유산	진드기, 설치류, 플레보토민 파리 (Phlebotomine flies)
한타바이러스( <i>Hantavirus</i> )	사람 : 신증후군출혈열, 한타바이러스 폐증후군	설치류
토스포바이러스( <i>Tospovirus</i> ) Tomato spotted wilt virus	식물 감염	총채벌레 (Thripidae)



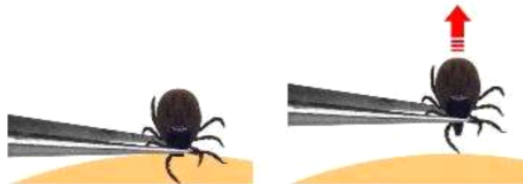
### Ⅲ 대처방법과 신고요령

#### 1. 각종 상황 별 대처방법

##### ■ SFTS 감염이 의심이 되는 경우 대처방법

- 야외활동 후 옷이나 몸에서 진드기를 발견한 경우
  - 진드기에 물린 자국이 있는지 확인 합니다.
  - 야외활동 했을 때 입었던 옷을 세탁 합니다.
- 진드기에 물린 자국 또는 물고 있는 진드기를 발견한 경우
  - 진드기에 물린 자국이 있는 경우 가까운 의료기관에 방문합니다.
  - 물고 있는 진드기를 발견한 경우 아래 진드기 제거방법에 따라 진드기를 몸에서 떼어 냅니다.

물린 상태에 있는 진드기는 핀셋을 이용하여 비틀거나 회전하여 부서지지 않도록 주의하여 천천히 제거합니다.



제거한 진드기는 버리지 말고 유리병에 젖은 솜을 깔고 냉장보관하여 추후 혈액 검체와 함께 진단기관으로 송부하도록 합니다.

〈진드기 제거 방법〉※ 질병관리본부

- SFTS가 의심되는 증상이 나타나는 경우
  - 발열, 피로감, 식욕저하, 구토, 설사, 출혈증상
  - 진드기에 물린 자국과 함께 SFTS 임상증상이 나타나는 경우 신속히 가까운 의료기관에 방문하여 진료를 받아야 합니다.
  - SFTS는 공기를 통해 감염되지 않지만, 혈액 또는 직접 접촉에 의해 감염 될 수 있으므로 주의가 필요합니다.

## 2. 신고요령

### ■ 야생동물에서 의심시(야생동물구조센터 또는 자연환경 종사자)

- 고라니, 너구리, 오소리 등의 야생동물 폐사체 발견 시 직접 사체를 건드리지 말고 국립환경과학원이나 환경부 유역(지방)환경청 등 전문기관으로 신고합니다.
- 야생동물에서 진드기 발견 시 또는 SFTS 감염이 의심시 야생동물의 혈액 또는 진드기를 밀폐용기 담아 국립환경과학원에 신고 후 배송 합니다.
- 야생동물에서 SFTS 감염이 의심되는 진드기를 발견한 경우 유리병에 젖은 솜을 깔고 그 위에 놓은 뒤 밀봉하여 접수하고, 진드기는 국립환경과학원 환경보건연구과 바이오안전팀으로 발송하고, 공문으로 진드기 분류검사 및 병원체 확인(환경보건연구과)을 요청해야 합니다.
- 국립환경과학원 환경보건연구과 바이오안전팀
  - TEL 032) 560-7143, 7152      · FAX 032) 560-2036

### ■ SFTS 감염이 의심되는 환자

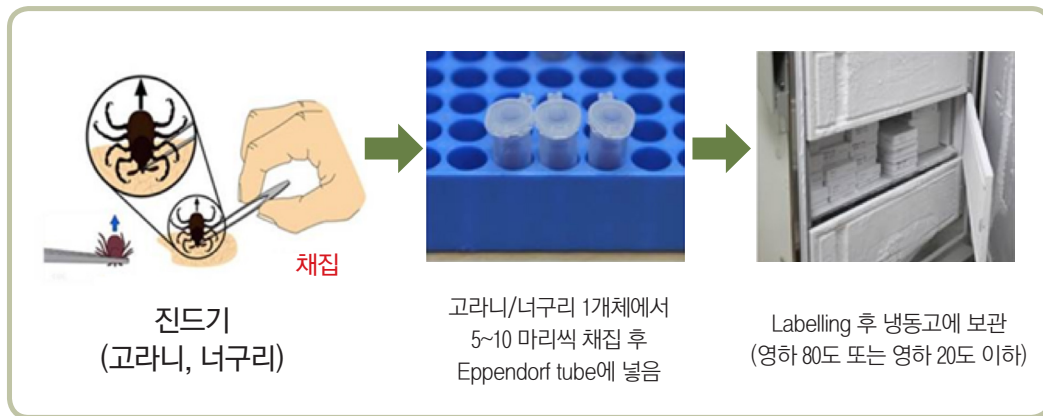
- SFTS 감염이 의심되는 환자가 있을 경우 신속히 가까운 의료기관에 방문하여 진료를 받고, 의심환자를 발견한 사람은 관련기관에 신고해야 합니다.
- 보건소에서 SFTS 감염이 의심되는 진드기를 발견한 경우 유리병에 젖은 솜을 깔고 그 위에 놓은 뒤 밀봉하여 접수하고, 진드기는 질병관리본부 국립보건연구원 질병매개곤충과로 발송하고, 공문으로 진드기 분류검사(질병매개곤충과) 및 병원체 확인(신경계바이러스과)을 요청해야 합니다.
- 질병관리본부 감염병감시과
  - TEL 043) 719-7163, 7176, 7171      · FAX 043) 719-7189
- 질병관리본부 국립보건연구원 신경계바이러스과
  - TEL 043) 719-8492      · FAX 043) 719-8519

## IV 부 록

### 1. SFTS 진단법

#### 1) SFTS 시료 채집 및 보관방법

##### ■ 야생동물에 붙은 진드기

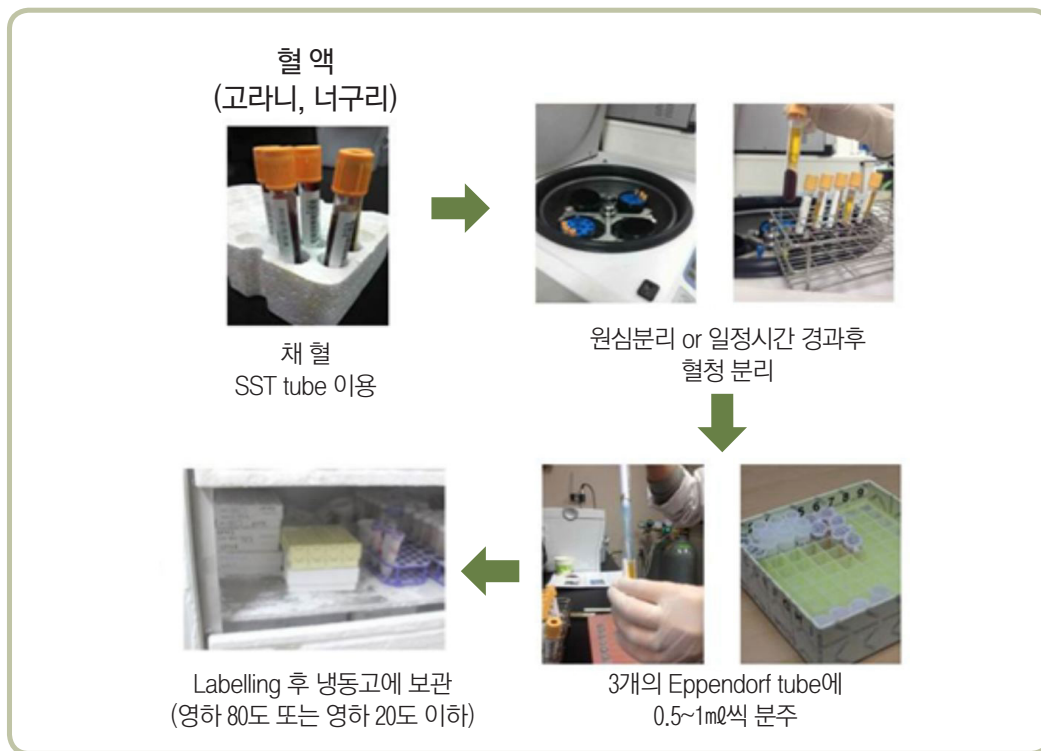


〈진드기 채집 과정〉

- ① 고라니, 너구리 및 포유동물에서 진드기를 채취한다. 채취할 때 장갑을 필수적으로 착용하여 진드기가 붙지 않도록 주의한다.
- ② 진드기를 잡을 때는 포셉이나 집게로 잡는다. 물린 상태에 있는 진드기는 핀셋을 이용하여 비틀거나 회전하지 않도록 주의하여 구기부가 떨어져 나가지 않도록 천천히 제거한다.
- ③ 채집한 진드기는 E-tube 또는 15 ml conical tube(또는 RNA/DNA protect tube)에 수집한 다음 labelling 한다. 채집한 진드기는 바로 냉동(-80℃ 또는 -20℃) 보관한다. 시료 수집 센터에 송부하기 전까지 냉동 보관한다.

### ■ 야생동물 혈액 시료

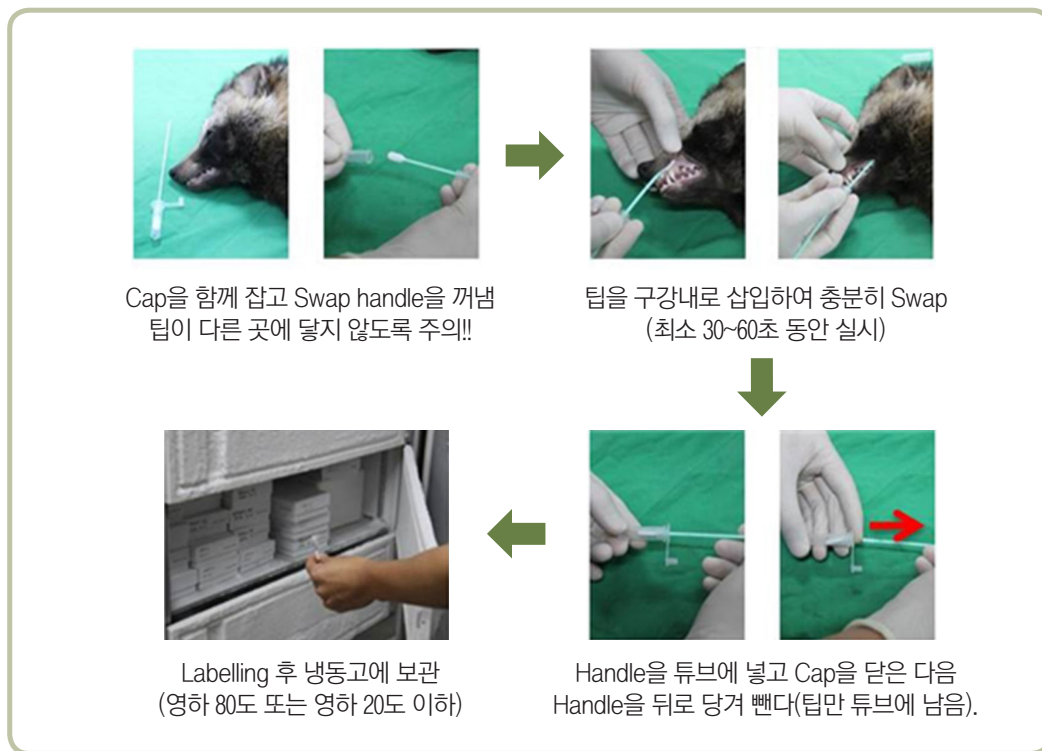
- ① 혈액 채취 장소는 조용하고 깨끗해야 하며 취급 물품 또한 위생적인 곳에 보관해야 한다.
- ② 채혈 전 손을 깨끗하게 씻고 위생장갑(poly glove)를 착용하고 채혈을 실시하며 적당한 속도로 채혈하여 거품이 생기지 않도록 주의한다.
- ③ 야생동물의 혈액을 채취한 후에 SST (혈청분리용 tube)에 바로 넣어서 상온에서 4시간, 냉장 상태에서 24시간 후에 혈청을 분리하거나 혹은 2400 rpm 속도로 원심 분리하여 혈청을 500  $\mu$ l ~ 1 ml 정도씩 Eppendorf tube (E-tube, 1.5 ml ~ 2 ml)에 분주한다.
- ④ Cryo-tube나 E-tube에 넣고 labelling 한다. 각 분주된 혈청은 냉동(-80 $^{\circ}$ C 또는 -20 $^{\circ}$ C) 보관한다.



< 채취된 혈액시료의 처리 및 보관방법 >

■ 야생동물 타액 시료

- ① 야생동물의 구강에서 타액을 채취한다. 이때 야생동물에게 물리지 않도록 주의한다. 채취 시 장갑 착용은 필수로 한다.
- ② 타액 수집 전용 swap tube에서 cap을 함께 잡고 swap handle을 꺼낸다. 이때 주의사항은 팁이 다른 곳에 닿아 오염되지 않도록 주의한다.
- ③ 팁을 구강내로 삽입하여 충분한 swap이 이루어지도록 최소 30~60초 동안 실시한다.
- ④ Handle을 튜브에 넣고 cap을 닫은 다음 handle을 뒤로 당겨 뺀다(팁만 튜브에 남음).
- ⑤ 각 tube에 labelling 후에 냉동(-80℃ 또는 -20℃) 보관한다.



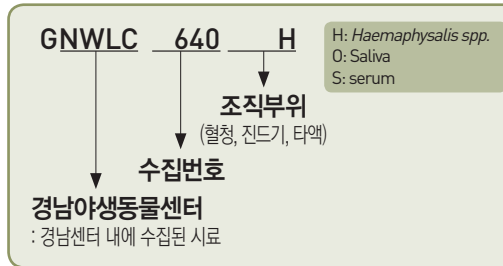
〈 타액 시료의 채취 및 보관방법 〉

## 2) 수집센터의 시료 표기법

- ① 각 센터에서 수집된 시료는 수집 센터에서 센터별, 조직부위별에 따라 시료를 Labelling 한다.
- ② Labelling 기준을 각 센터에 따라 강원(A), 경기(B), 충북(C), 충남(D), 전남(E), 경북(F), 경남(G), 울산(H), 제주(I) 알파벳 순서로 지정한다. 각 시료에 번호를 부여한다.
- ③ 다음은 시료 조직 부위별에 따라 혈청은 S, 타액은 O, 그리고 진드기는 H로 부여한다.
- ④ 예로 경남 센터 혈청시료일 경우; G642S가 된다.
- ⑤ 각 시료에 labelling이 끝나면, 냉동(-80℃ 또는 -20℃) 보관한다.

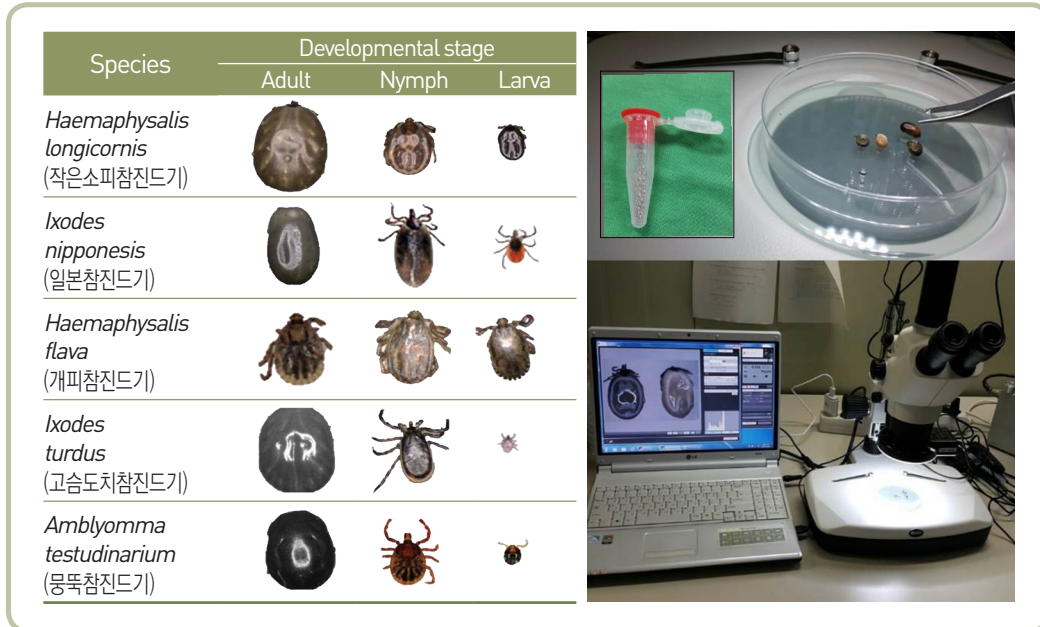
### ▶ 각 센터에서 수집된 시료 샘플 Labeling 방법 및 보관 방법

시료채집 날짜	조직 부위	Vial No.	센터명	ID	개체명	전혈	혈청	기생충	타액	성별	체중(kg)	조직 부위
2015-06-04	진드기	GNWLC640H	경남	20160237	너구리		2			암	4.5	진드기
2015-06-04	타액	GNWLC641O	경남	20160237	너구리				1	암	4.5	타액
2015-06-05	혈청	GNWLC642S	경남	20160238	너구리		5			암	20.8	혈청



- ▶ 각 센터에서 수집되는 시료들은 Vial에 모든 수집 번호를 부여하여 냉동 보관 번호를 부여하여 냉동 보관
- ▶ 어느 센터에서 수집되었는지는 번호로 알 수 있음
- ▶ 각각의 시료들은 SFTSV와 Rabies virus 진단에 이용됨.
- ▶ 국립환경과학원에 보낼 혈청시료 따로 보관

< 수집된 시료의 조관을 위한 표기방법(예시) >



〈 진드기 동정을 위한 입체현미경 〉

### 3) 수집된 진드기의 동정

- ① 고라니 및 너구리에서 채집된 진드기는 월별로 수집해서 진드기를 종류별/발육(성장) 단계별로 동정한다.
- ② 진드기의 종에 따라 분류하며 작은소피참진드기, 일본참진드기, 개피참진드기, 고슴도치참진드기, 뿔참진드기 등 진드기의 특징 별로 분류한다.
- ③ 발육단계에 따라 유충(Larva), 약충(Nymph), 성충(Adult)으로 나뉘며, 성충에 경우는 암수(female/male)를 구분해서 기록한다.
- ④ 동정이 끝난 참진드기는 beads가 들어가 있는 tube(RNA lysis Kit 50, Next Advance, Inc., USA)에 월별, 포유동물 종류별, 지역별 수집된 참진드기가 섞이지 않도록 구분해서 1~10마리 사이에서 나누어 담는다.
- ⑤ 진드기의 pooling작업과 진드기 pool시료 리스트를 작성이 끝나면 냉동(-80℃ 또는 -20℃) 보관한다.

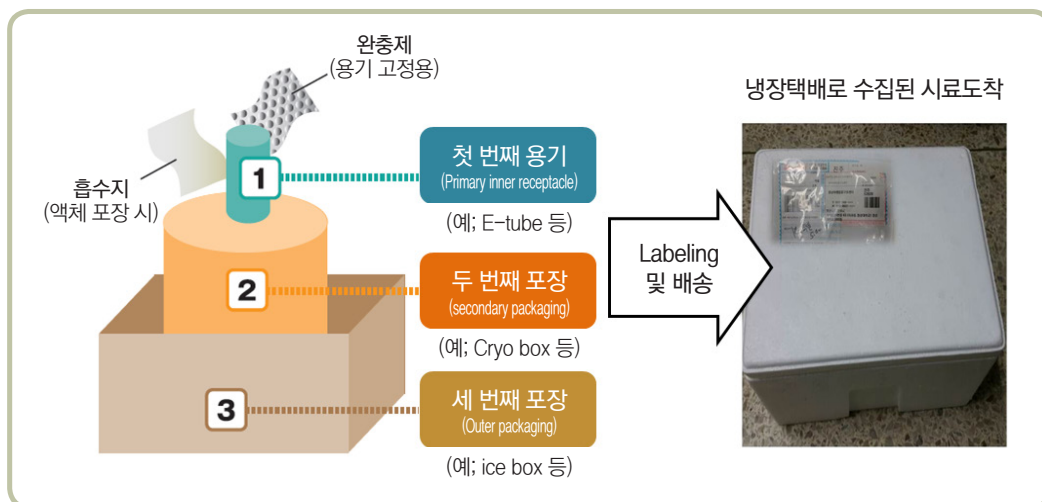
#### 4) 채취 · 수집된 시료수송 매뉴얼

##### ■ 야생동물 혈액 및 타액의 수송 방법

- ① Tube에 담긴 냉동 보관된 시료를 두 번째 포장 용기에 담고 고정을 위해 완충제를 넣는다.  
(만약, 액체 등이 있는 경우 흡수지를 동봉한다.)
- ② 포장된 두 번째 용기를 아이스 팩(또는 Dry ice)을 넣고 세 번째 용기로 포장하여 배송이 완료될 때까지 시료가 녹지 않도록 하며, 시료는 되도록 당일 운송이 가능 하도록 한다.
- ③ 수송된 시료는 바로 리스트를 작성하고, 각 시료별 표기 후 냉동 보관하여 이후 질병진단 시 추출되어 사용된다.

##### ■ 진드기 검체 수송 방법

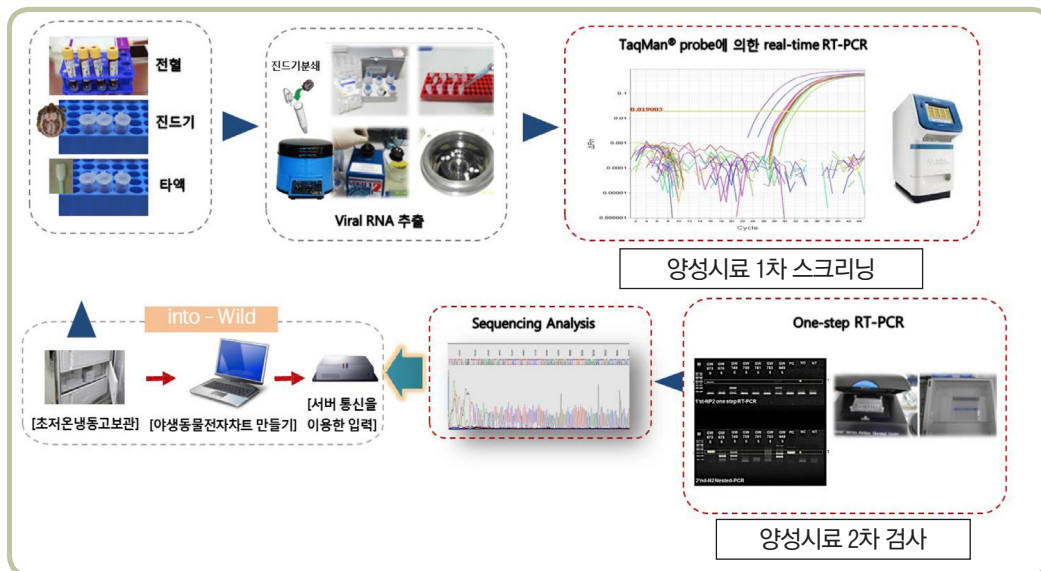
- ① 살아있는 진드기의 경우 페트리디쉬나 코니칼 튜브에 물로 적신 탈지면을 깔고 10개체 미만으로 담아 뚜껑을 닫고 파라필름으로 감아 밀봉한 후 포장하여 수송한다.
- ② 죽은 진드기의 경우 소형 플라스틱 용기나 유리병에 10개체 미만으로 담고 100% 알코올을 채워 뚜껑을 닫아 파라필름으로 감아 밀봉한 후 포장하여 수송한다.



〈 시료의 수송을 위한 포장방법 〉



## 5) SFTS 유전자 분석



〈 수집된 시료의 감염 진단 흐름도 〉

### ■ Real-time RT-PCR 및 One-step RT-nested PCR 분석법

- TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR (1차 스크리닝)
- 유전자 분리재료 : 혈청 또는 진드기 pool
- Viral RNA 추출법 : 시중에 판매중인 viral RNA extraction kit 사용(QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN). 진드기 pool은 beads(RNA lysis Kit 50)와 함께 bullet blender™(Next Adavance, Inc., USA) 및 lysis buffer로 homogenization시킨 후 추출 kit 사용
- RT-PCR : TaqMan<sup>®</sup> RNA-to-CT1-Step Kit사용
  - TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Mix(2×)
  - TaqMan<sup>®</sup> RT Enzyme Mix(40×)

< real-time RT-PCR에 사용된 primer/probe sets >

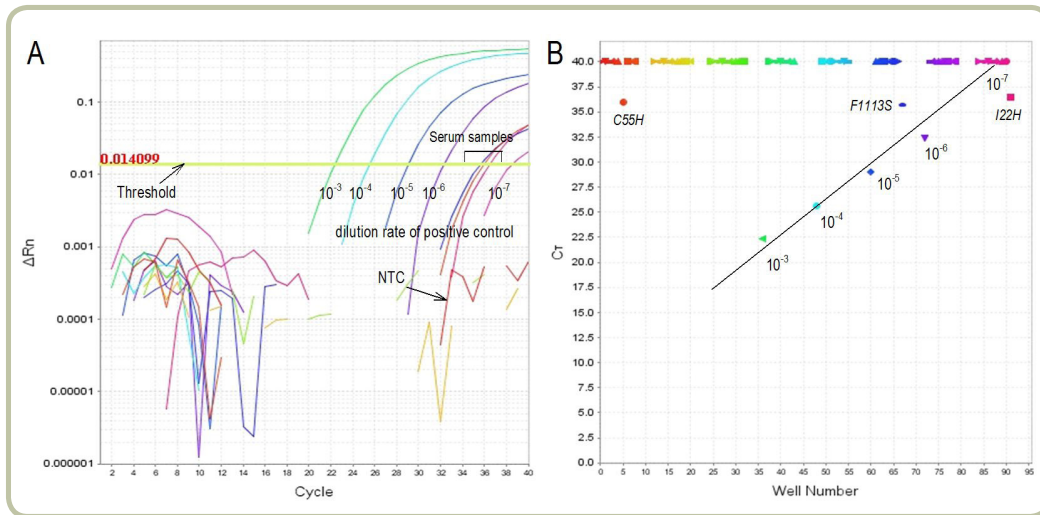
Primer/ probes	5'-3' sequence	Product size or Position
		75 bp
S-F-3	5'-GGG TCC CTG AAG GAG TTG TAA A-3' (22-mer)	1104-1125
S-R-3	5'-TGC CTT CAC CAA GAC TAT CAA TGT-3' (24-mer)	1155-1178
S-Probe-3	5'-FAM-TTC TGT CTT GCT GGC TC-NFQ-MGB-3' (17-mer)	1127-1148

- ① 혈청 및 진드기에서 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 viral RNA를 추출한다.
- ② 1차 검사: 추출한 viral RNA를 template로 하여 표의 primer와 probe를 사용하여, 표의 조성과 온도에서 RT-PCR을 수행한다.
- ③ 반응이 끝난 후 no template control(NTC), positive control 및 시료의 증폭된 그래프를 비교·분석하여 양성시료를 판정한다.

< real-time RT-PCR을 위한 Composition/PCR 조건 >

Composition			PCR condition			
			Stage	Temp, °C	Time	
Total reaction		20 µL				
viral RNA template		5 µL	RT	Holding	48	15 min
TaqMan® RT-PCR Mix(2X)	(Final conc.)	10 µL		Holding	95	10 min
TaqMan® Probe, 10pmol/µl	50 nM	0.1µL				
Forward Primer, 10pmol/µl	400 nM	0.8µL	PCR	40 cycles	95	15 sec
Reverse Primer, 10pmol/µl	400 nM	0.8µL			60	1 min
TaqMan® RT Enzyme Mix(40X)		0.5µL				
RNase-free Water		2.8µL				

## 5) SFTS 유전자 분석



〈 SFTSV의 S segment에 대한 real-time RT-PCR 결과 〉

※ 증폭곡선의 로그 그래프(A) 및 Ct값에 대한 plot(B), TaqMan®사용

- One-step RT-nested PCR (2차 검사)
- 유전자 분리재료 : 혈청 또는 진드기pool
- Viral RNA 추출법 : 시중에 판매중인 viral RNA extraction kit 사용(QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN)
- One-step RT-nested PCR :
  - Hi-Senscript TMRH(-) PCR Premix
  - Maxime PCR PreMix

〈 One-step RT-nested PCR에 사용된 primer/probes sets 〉

Primer/probes	5'-3' sequence	Product size or Position
1 <sup>st</sup> round PCR		461 bp
NP-2F	5'-AGA AGA CAG AGT TCA CAG CA-3' (20-mer)	1076-1095
NP-2R	5'-CAT CAT TGT CTT TGC CCT GA-3' (20-mer)	1517-1536
2 <sup>nd</sup> round PCR		346 bp
N2-F	5'-TAG TCT TGG TGA AGG CAT CTT-3' (21-mer)	1163-1183
N2-R	5'-AAC AAG ATC GTC AAG GCA TCA-3' (21-mer)	1488-1508

〈 Composition/PCR conditions used for One-step RT-nested PCR 〉

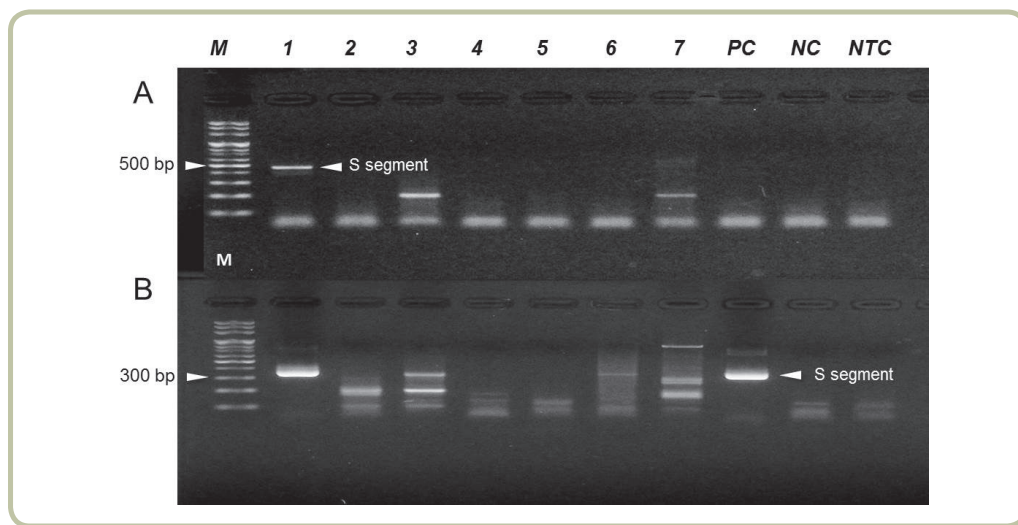
Composition		PCR condition				
Total reaction in a kit of dry mixture		20μL	Stage	Temp	Time	
1 <sup>st</sup> round PCR	Template, Viral RNA	4μL	RT	Holding	45°C	30 min
	Primer(F: 10pmol/μl )	1μL			94°C	5 min
	Primer(R: 10pmol/μl )	1μL	PCR		94°C	20 sec
	Distilled Water (Hi-Senscript™RH(-) PCR Premix, Intron)	14μL		35 cycles	55°C	20 sec
					72°C	30 sec
		Holding	72°C	5 min		
2 <sup>nd</sup> round PCR	Template, 1st round PCR product	1μL		Holding	94°C	2 min
	Primer(F: 10pmol/μl )	1μL	PCR		94°C	20 sec
	Primer(R: 10pmol/μl )	1μL		40 cycles	55.6°C	30 sec
	Distilled Water (Maxime PCR PreMix, Intron)	17μL			72°C	30 sec
				72°C	2 min	

① 1차 검사(TaqMan® real-time RT PCR)에서 SFTS 바이러스가 검출된 시료에 대해 특이적인 primer를 사용하여 적절한 반응조건으로 1차 PCR(one-step RT-PCR) 및 2차 PCR(nested PCR)에 의해 SFTS 바이러스에 대한 2차 검사를 실시한다.

② 마지막 2차 PCR 반응이 끝난 후 최종 PCR product를 2% agarose gel에 loading하여 30분간

전기영동 후, UV trans-illuminator로 346bp에서 target 밴드를 확인한다.

- ③ 2차 PCR에서 확인된 target band(346bp)는 DNA purification kit를 이용하여, PCR product를 정제, 외부기관에 DNA 염기서열 분석을 의뢰한다.
- ④ NCBI blast query에 의뢰한 염기서열 분석결과를 입력, 가장 가깝게 일치하는 DNA sequence를 검색, SFTS 바이러스의 S segment인지를 확인하고 최종적으로 양성판정을 확정한다.



〈 SFTS 바이러스 (S segment) 특이유전자 증폭사진 〉

※ 1차 One-step RT-PCR(위), 2차 Nested PCR(아래)

### ■ One-step RT-PCR을 이용한 실험방법

- AccuPower<sup>®</sup>RocketScript<sup>™</sup> RT-PCR을 이용한 실험방법
- 유전자 분리재료 : 혈청 또는 진드기pool
- Viral RNA 추출법 : 시중에 판매중인 viral RNA extraction kit 사용(Viral RNA lysis Kit, Qiagen, Germany). 진드기 pool은 beads(RNA lysis Kit 50)와 함께 bullet blender<sup>™</sup>(Next Adavance, Inc., USA) 및 lysis buffer로 homogenization시킨 후 RNA 추출 kit 사용

• RT-PCR : Bioneer one-step RT-PCR PreMix 사용

· AccuPower<sup>®</sup>RocketScript<sup>™</sup> RT-PCR PreMix (Bioneer)

- ① 추출된 RNA를 대상으로 S segment에 특이적인 Primer를 사용하여 PCR을 수행한다. PCR은 Bioneer에서 제작된 AccuPower<sup>®</sup>RocketScript<sup>™</sup> RT-PCR PreMix를 이용하여 수행하고 전기영동을 통해 양성반응을 확인하여 1차 스크리닝을 진행한다. SFTS 검출을 위한 PCR 조건은 아래 표와 같다.
- ② 1차 스크리닝에서 양성반응이 나타난 시료를 대상으로 M segment와 ①과 다른 S segment 부분에 반응하는 primer를 사용하여 PCR을 수행한다. SFTS 검출을 위한 PCR 조건은 M gene 과 S gene을 증폭하기 위한 annealing 조건이 다르다는 점을 주의해야 한다. 이후 전기영동을 통해 양성반응을 확인하는 2차 검사를 실시한다.
- ③ 2차 검사에서 양성반응이 나온 시료는 염기서열 분석을 통해 유전자 정보를 파악하고, 리스트 작성 후 냉동(-80℃ 또는 -20℃) 보관한다.

〈 RT-PCR에 사용된 primer sets 〉

Primary test			
Primer set	Forward	Reverse	Target
S2 <sup>*</sup>	CATCATTGTCTTTGCCCTGA	AGAAGACAGAGTTCACAGCA	1076-1536 (S_seg)
Secondary test			
Primer set	Forward	Reverse	Target
M <sup>**</sup>	GATGAGATGGTCCATGCTGATTCT	CTCATGGGGTGAATGTCCTCAC	1708-2267 (M_seg)
S1 <sup>*</sup>	ATCGTCAAGGCATCAGGGAA	TTCAGCCACTTCACCCGRA	1045-1502 (S_seg)

\* Masayuki Shimojima, J. Clin. Microbiol., 2014; \*\* 질병관리본부, Emerg. Infect. Dis., 2014

〈 RT-PCR에 사용된 Composition/PCR 조건 〉

Composition		PCR condition			
Total reaction in a kit of dry mixture	20 $\mu$ l	Step	Temp	Time	Cycles
Template, Viral RNA	5 $\mu$ L	cDNA synthesis	50°C	30 min	1
Primer(F : 10pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ L	Pre-Denaturation	95°C	15 min	1
Primer(R : 10pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ L	Denaturation	95°C	20 sec 20 sec	
Distilled Water	13 $\mu$ L	Annealing	58°C (M) 52°C (S)	40 sec(M) 30 sec(S)	35
AccuPower <sup>®</sup> RocketScript <sup>™</sup> RT-PCR PreMlx (Bioneer)		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1

〈 SFTS 바이러스 검출을 위한 전기영동 〉

Target gene	Electrophoresis	Primer Set	Expected size
Primary test	<p>10 <math>\mu</math>l loading</p> <p>NC* 10<sup>0</sup> 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> 10<sup>-3</sup> 10<sup>-4</sup> M</p>	S2	461 bp
Secondary test		M	560 bp
		S1	458 bp

\*NC; Negative Control



〈 유전자분석 키트 〉

※ 예시: AccuPower<sup>®</sup>RocketScript<sup>™</sup> RT-PCR PreMix



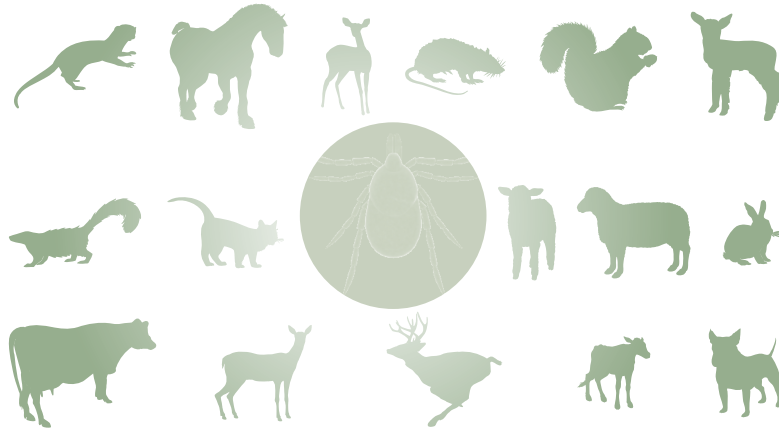
## 2. 관련부서 연락처

### ■ 환경부

- 국립환경과학원 환경보건연구과 바이오안전연구팀  
(야생동물 폐사체, 동물혈액, 진드기 관련)
  - TEL 032) 560-7143, 7152
  - FAX 032) 568-2036

### ■ 보건복지부

- 질병관리본부 감염병관리과 (총괄 및 역학조사)
  - TEL 043) 719-7116, 7127, 7132
  - FAX 043) 719-7139
- 질병관리본부 감염병감시과 (의심환자 신고)
  - TEL 043) 719-7163, 7176, 7171
  - FAX 043) 719-7189
- 질병관리본부 국립보건연구원 신경계바이러스과 (환자검사)
  - TEL 043) 719-8490~8494
  - FAX 043) 719-8519
- 질병관리본부 국립보건연구원 질병매개곤충과 (진드기 관련)
  - TEL 043) 719-8562
  - FAX 043) 719-8589



「야생동물 매개 질병 예방·관리지침」

## 제1편: 중증열성혈소판 감소증후군(SFTS)의 예방·대처 및 진단

「Guidelines for Wildlife Mediated Diseases」

### Series I : Prevention and Diagnosis of SFTS\* by Outdoor Activities

\* SFTS: Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome

발행	국립환경과학원
발행일	2016년 4월
제작	김용관, 손기동, 정원화, 왕승준, 정집설, 엄재구, 신정화, 우찬진, 안인정, 조성덕, 김용식, 장진우, 이새미, 원지영, 유승도, 최경희
연락처	국립환경과학원 환경건강연구부 환경보건연구과 바이오안전연구팀 032-560-7143 환경부 자연보전국 생물다양성과 044-201-7250

본 책자는 진드기매개질병(SFTS)의 예방 및 진단에 대한 이해를 돕기 위해 제작되었으며,  
소유권은 국립환경과학원에 있습니다(본 책자의 무단복제 및 배포를 금함).

본 매뉴얼의 내용과 관련하여 궁금한 점이나 개선이 필요한 부분이 있는 경우  
국립환경과학원 환경보건연구과 바이오안전연구팀으로 연락하여 주시기 바랍니다. (032-560-7143, kyk5388@korea.kr)