

Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat 분석을 사용한 *Bacillus Anthracis* 균주간 특이성 규명

Strain-specific Detection of *Bacillus Anthracis* using Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis

정 경 화* 김 상 훈* 김 성 주**
 Kyoung Hwa Jung Sang Hoon Kim Seong-Joo Kim

김 지 천** 채 영 규*
 Ji-Cheon Kim Young Gyu Chai

Abstract

Bacillus anthracis(Ba) is a Gram-positive spore-forming bacterium that causes the disease anthrax. The feature of Ba is the presence of two large virulence plasmids, pXO1 and pXO2. Molecular genotyping of Ba has been difficult to the lack of polymorphic DNA marker. Ba isolated from Korea has been genotyped using various nucleotide analysis methods, such as 16s rDNA sequencing and multiple-locus variable-number tandem repeat (MLVA) analysis. We identified genotypes that represent a genetic lineage in the B1 cluster. This study emphasized the need to perform molecular genotyping when attempting to verify a strain-specific Ba.

Keywords : *Bacillus Anthracis*(탄저균), Isolation(동정), Verification(검증), Molecular Genotyping(분자유전학)

1. 서론

탄저(Anthrax)는 탄저균(*Bacillus Anthracis*)에 의해 발병되는 인수공통 전염병으로, 토양 중에서 30년 이상 생존이 가능한 토양매개질병이다. 탄저는 전세계적으로 발생하며, 주로 아프리카 등 저개발 국가에서 빈번하게 일어나고 있다. 국내에서는 감염 우육을 섭취 혹

은 감염동물과 접촉함에 따른 발병예가 대전, 서울, 경주, 창녕 등에서 보고되고 있다. 탄저균은 호흡기, 소화기, 피부 등으로 감염이 되며, 호흡기 감염의 경우 치사율이 90% 이상이다. 탄저균에 감염된 후 2~7일이면 발병을 하고 일단 발병하면 효과가 빠르게 나타나며, 비장의 증대와 피아점막의 부종 및 출혈이 발생한다^[13].

탄저균은 크기가 1~1.5 μ m × 5~8 μ m인 그람 양성 간균이며 호기성균으로서, 운동성이 없으며 산소 존재 하에서 아포를 형성한다. 반면에, 살아있는 숙주세포 내의 혐기성 상태에서는 아포를 형성하지 않고 영양세포로 존재하여 독소를 분비한다. 이는 탄저균이 탄저

† 2011년 1월 15일 접수~2011년 3월 25일 게재승인

* 한양대학교

** 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 정경화(khjung2@gmail.com)

를 유발시킬 수 있는 독소 플라스미드, pXO1, pXO2 를 가지고 있기 때문이다^[2].

탄저균은 *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*와 함께 *Bacillus cereus* 그룹에 속하는데, 이들과 형태학적으로 비슷하고 DNA 유사성이 굉장히 높다^[2]. 이에 따라, 이들을 구별하기 위한 종 특이적인 유전적인 마커를 확보하고 하였으며, 현재까지 알려진 탄저균의 염색체 바이오 마커로는 1996년 개발된 BA813 등이 있다^[4,5].

2001년 미국 911 사태 이후에, 탄저균을 이용한 생물테러 문제가 부각되고 있다. 탄저균은 높은 치사율, 상대적으로 싼 제조 단가, 잔존성 등으로 인하여 생물무기로 이용이 가능하며, 이미 일본, 미국 등지에서 생물테러가 일어난 바가 있다. 이런 탄저균을 이용한 테러에 대응하여 신속하고 정확한 탄저균 탐색과 검증하는 방법이 필요하다.

탄저균에서 각 균주들을 구분하고자 하는 많은 시도가 있었다^[6]. 주로 사용되었던 amplified fragment length polymorphisms(AFLP) analysis의 경우, 밝혀진 마커 개수가 충분치 않아 적은 다양성을 기반으로 한 분석만이 가능하며 분석의 정확도 또한 높지 않다. 한 예로, 탄저균 1,000개 이상의 DNA 절편들 속에서 AFLP 마커를 이용한 분석은 30 종류의 다양성으로 나타날 뿐이다^[7]. 또한 25종의 균주들 사이에서 protective antigen (*pag*) 유전자 서열을 이용한 AFLP 분석의 경우에는 2,500개의 nucleotides 중 5개의 차이만을 발견 할 수 있다^[8].

Andersen 등(1996)은 위와 같은 이전의 정립된 분석 방식에서 벗어나 variable-number tandem repeat(VNTR) 서열이 포함된 *vrpA* open reading frame(ORF)을 발견하였다^[9]. 이후 다양한 탄저균들의 비슷한 genome 속에서 5개의 다른 *vrpA* VNTR이 발견되었고, 이를 통해 비슷한 탄저 균주들을 구별하였다^[10,11]. 최근 가장 많이 이용되는 VNTR 분석방법으로는 여러 locus(좌위)에서 VNTR을 분석·취합하는 방법으로서 Keim 등(2000)에 의해 개발된 multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)가 있다. 이는 전 세계 각국의 탄저균 분석을 위해 8개의 variable-number tandem repeat 마커 좌위(MLVA-8)가 이용된 바 있다^[12].

본 연구에서는 탄저균 탐색과 식별 시스템을 갖추기 위해 분리 탄저균을 대상으로 알려진 CDC(Centers for Disease Control and prevention) 동정방법 및 분자유전학적 분석을 수행하여 탄저균 균주간 MLVA-8 방법에

따른 분자유전학적 타이핑을 분석하였다.

2. 실험방법

가. Total DNA의 추출

확보된 탄저균 균주의 염색체 DNA분리는 Hunter (1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저, 균주를 10ml의 배지에 접종하여 37°C에서 2~3일 배양한 후 원심분리하여 균체만 분리하였다. 균체에 0.1mg/ml 농도의 lysozyme을 포함한 1ml의 Tris-EDTA(TE)를 넣고 완전히 용균 될 때까지(2~3시간) 30°C에서 처리하였다. 용균된 용액에 0.1ml의 20% sodium dodecyl sulfate polyarcylamide(SDS)를 넣은 후 서서히 혼합한 다음 0.15 ml의 5m NaCl과 1ml의 페놀을 넣고 20분 동안 상온에서 서서히 흔들어준 후, 3,500rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 원심분리한 후 나온 상층액을 분리하여 동량의 chloroform을 넣고 10분 동안 서서히 흔들어 준 다음, 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 isopropanol 을 첨가하여 상온에서 5분 간 방치하였다. 마지막으로, 15,000rpm에서 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었고, DNA 침전물을 소량의 Tris-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)에 녹인 다음 RNase(20µg/ml)을 처리 한 후 50°C에서 1시간 반응하였다.

나. PCR 반응을 이용한 탄저균 스크리닝

PCR 반응용 탄저균 특이 프라이머는 BA813과 BA Kim을 사용하였다. 실험에 사용된 BA813은 Ramisse (2000) 등이, BA Kim은 Kim(2003) 등에 의해 고안된 것이다 Genotech(Daejun, Korea). PCR의 조성으로는 총 30 µl에 2X EF-*Taq* Premix II(Solgent Co., Ltd. Korea), 0.5 pmole의 프라이머, 10ng의 염색체 DNA를 사용하였다.

PCR 반응 조건은 94°C에서 5분 동안 변성(Denaturation)시킨 후, 94°C에서 1분간 변성- 60°C에서 1분간 결합(Annealing)- 72°C에서 1분간 신장(Extension) 과정으로 30사이클을 수행하였고, 72°C에서 10분간 최종신장을 한 후 4°C에 보관하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 UV를 통해 관찰, 확인하였다.

다. 탄저균의 생화학적 특성분석 및 16s rDNA 염기서열 결정

분리된 탄저균의 생화학적 특성 분석은 CDC 동정

방법을 따라 그람염색, 운동성, 그리고 카탈라아제 활성을 측정하였다(CDC, Basic laboratory protocols, 2001). 대조군으로는 기존에 알려진 탄저균 Sterne 균주와 *Bacillus cereus* 그룹에 속하여 있는 *Bacillus mycoides* 균주를 사용하였다.

균주 Hyu #1의 16s rDNA는 Table 1의 정보를 사용하여 증폭하여 염기서열을 결정하였다.

Table 1. Primer sequence of 16s rDNA

67F	5'-TGCAAACCTGAACGAAACAAAC-3'
1671R	5'-CTCTCAAAACTGAACAAAACGAAA-3'

라. PCR 반응을 이용한 탄저균 동정

탄저균 특이 프라이머를 이용한 PCR 반응에서 선택한 균주 Hyu #1의 탄저균의 pXO1과 pXO2에 있는 유전자 증폭 여부를 확인하였다^[13]. PCR 반응 조건은 94℃에서 5분 동안 변성시킨 후, 94℃에서 1분간 변성-60℃에서 1분간 결합-72℃에서 1분간 신장과정으로 30 사이클을 수행하였고, 72℃에서 10분간 최종신장을 한 후 4℃에 보관하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 UV를 통해 관찰, 확인하였다.

마. MLVA 분석

탄저균 특이 프라이머를 이용한 PCR 반응에서 선택한 균주 Hyu #1의 genomic DNA를 MLVA-8 프라이머로 사용하여 비교 분석하였다. 총 50µl로 한개의 tube당 10X buffer 5µl, 프라이머, dNTP 1µl, *Taq* 0.24µl (TaKaRa Ex *Taq*TM), DNA 1µl, 증류수를 넣어 반응하였다. Bio-Rad사의 iCycler(PTC-2000)을 이용하여 변성(95℃) 5분, 변성(95℃) -결합(62℃) -신장(72℃)을 각각 1분으로 36 사이클, 마지막으로 합성(72℃)을 10분 동안 반응시켰다. 50:1로 희석한 PCR 결과물 2µl과 8µl Hi-Di formaldehyde(Applied Biosystems)를 섞고, 마커로 GeneScan-2500 ROX를 20:1의 비율로 결과물과 혼합하였다. 혼합 후 5분 동안 변성(95℃) 후 AB 3100 Prism Genetic Analyzer를 이용하여 분석을 하였다. 분석한 결과를 이용하여 MEGA 4.0.2(<http://www.megasoftware.net/>)프로그램을 통하여 기존에 보고된 탄저균과의 유사성을 검색하였다.

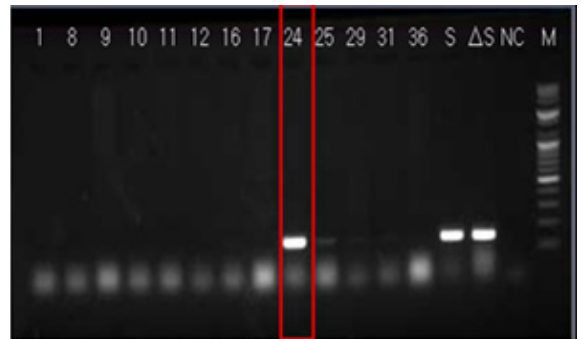
3. 결과

가. Blast search를 통한 동정한 탄저균(Hyu #1) 확인

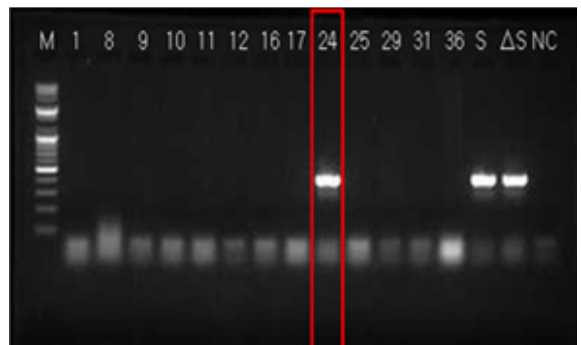
확보된 탄저균의 16s rDNA를 증폭하여 염기서열을 결정하였고, 결정된 염기서열을 이용하여 Blast search를 수행하였다. 수행 결과 *Bacillus anthracis* strain 'Ames Ancestor'와 99%의 상동성을 보였다.

나. 동정한 탄저균 스크리닝

균주 Hyu #1을 그람염색, 운동성, 카탈라아제 실험을 통해 탄저균임을 입증하였다(결과 미제시). 또한 탄저균에 특이적인 프라이머를 이용하여 증폭여부를 검사하였고, 이에 균주 Hyu #1이 탄저균이며(Fig. 1) pXO1과 pXO2를 모두 가지는 강독 균주임을 확인하였다(Fig. 2).

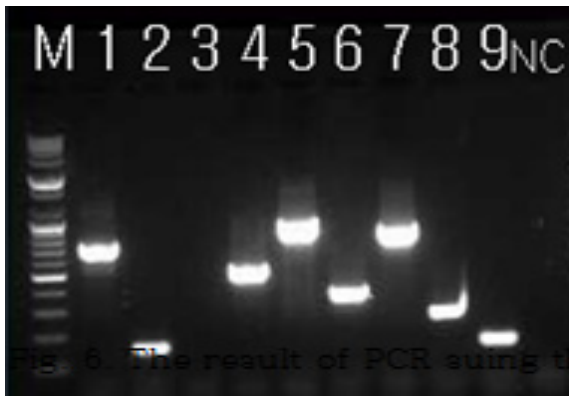


(A) BA813



(B) BA Kim

Fig. 1. The results of PCR among the candidate of BA strains using BA specific primers (A) PCR using BA813 BA specific primer (B) PCR using BA Kim BA specific primer



(A) Hyu #01



(B) Sterne



(C) HS

Fig. 2. The results of PCR using the BA toxin specific primers. [*pag1*, *pag2*, *cya1*, *cya2*, *lef1*, *lef2*, *cap1*, *cap2*, BA813] (A) Hyu #1, pXO1⁺, pXO2⁺(B) Sterne, control, pXO1⁺, pXO2⁻ (C) HS, control, pXO1⁺, pXO2⁺

다. 동정한 Hyu #1의 MLVA-8 분석

확보한 균주 Hyu #1의 genomic DNA를 추출하여 Keim 등(2000)에 의해 개발된 8개의 MLVA 마커를 통해 분석하였다. 이들 8개 중 5개(*vrnB2*, *vrnC1*, *vrnB1*, *vrnC2*, *vrnA*)는 ORF내에서 존재하며, pXO1과 pXO2 MLVA마커의 경우는 플라스미드 내에 존재한다^[14]. 각각 마커들의 프라이머를 통해 AB 3100 Prism Genetic analyzer로 PCR을 수행하였고, 분석한 결과를 아래 표로 정리 하였다(Table 2). 분석을 통해 각 locus의 길이 (Observed)를 확인 할 수 있었고, 이를 이전에 Keim 등(2000)에 의해 알려진 반복서열과 비교하여 반복개수(Number of Repeats)를 확인하였다.

얻어진 값을 이용하여 MEGA 4.0.2(<http://www.megasoftware.net>) 프로그램을 통하여 2006년에 보고된 *Bacillus anthracis* MLVA 데이터^[15,16]와 비교 분석하였다(Table 3). 그 결과, 균주 Hyu #1은 Ryu 등이 2005년에 보고한 균주와 가장 유사하다는 것을 알 수 있었고 (Fig. 3), 이를 통해 Ryu 등에 의해 밝혀진 균주가 B1 cluster에 포함 되므로 균주 Hyu #1 또한 B1 cluster에 포함 된다는 것을 추정할 수 있었다.

4. 고 찰

본 연구에서 확보한 탄저균 Hyu #1은 탄저균 특이 프라이머(BA Kim, BA 813)를 이용한 PCR 산물을 통해 탄저균임을 확인하였고^[17], 16s rRNA 염기서열 결정 및 CDC 동정방법을 이용한 생화학적 특성을 분석하여 그람양성으로, 운동성이 없으며, 카탈라아제 활성을 가지는 것을 확인하였다(CDC, Basic Laboratory Protocols, 2001). 또한 chromosome의 BA 813, pXO1의 *lef*, *cya*, *pag*, pXO2의 *cap* 유전자의 프라이머를 이용하여 PCR 한 결과 Hyu #1은 pXO1과 pXO2를 모두 보유한 방어항원(Protective Antigen), 치사독소(Lethal Factor), 부종요소(Edema Factor) 및 캡슐을 발현하는 강독균주로 이 균주의 특성을 MLVA를 이용하여 분석하였다^[7].

최근까지 수많은 탄저균들간의 비교, 분석을 위해 다양한 분자유전학적인 분석방법들이 도입되었다^[18]. 특히, 여러 분석방법들 중 MLVA 방법의 경우 MLV-8, MLVA-15, MLVA-25등의 다양한 MLVA 마커들이 보고 되어있으며, 탄저균들의 특성분석에 이용되고 있다^[12]. 본 연구에서는, 새롭게 분리한 탄저균 Hyu #1을

Table 2. Results of strain Hyu #1 MLVA using MLVA-8 primers

	CG3	<i>vrrB2</i>	<i>vrrC1</i>	<i>vrrB1</i>	<i>vrrC2</i>	<i>vrrA</i>	pXO1	pXO2
Observed	155	172	578	259	535	306	133	133
Expected	153	171	583	256	532	302	132	132
Number of repeats	2	8	53	19	17	9	8	5.5

Table 3. MLVA types of strain Hyu #1 and related strains

Key	Distance	Origin	Published_genotype	Cluster	Publication	Same MLVA	VrrA	VrrB1	VrrB2	VrrC1	VrrC2	CG3	pXO1	pXO2
Hyu #01	1	Korea	Hyu_01	B1	Hyu	none	9	19	8	53	17	2	8	5.5
Ryu2005 #02	1	Korea	Ryu2005_02	B1	Ryu2005	none	9	19	8	53	17	2	8	8
Keim2000 #88	2	SAF	Keim2000_88	B1	Keim2000	Genotype 19	9	19	8	53	17	2	6	11
Keim2000 #81	2	SAF ZIM MOZ	Keim2000_81	B1	Keim2000	none	9	19	8	53	17	2	7	9
Keim2000 #83	2	MOZ	Keim2000_83	B1	Keim2000	none	9	19	8	53	17	2	7	8
Keim2000 #84	2	UK	Keim2000_84	B1	Keim2000	none	9	19	8	53	17	2	7	10
geno #005	2	(Kruger)	Lista2006_60	B1	Lista2006	none	9	19	8	53	17	2	6	10
Keim2000 #87	2	SAF	Keim2000_87	B1	Keim2000	none	9	19	8	53	17	2	6	10
Keim2000 #86	2	NOR	Keim2000_86	B1	Keim2000	none	9	19	8	53	17	2	6	8
Keim2000 #82	2	SAF	Keim2000_82	B1	Keim2000	Genotype 18	9	19	8	53	17	2	7	11
Ryu2005 #03	2	Korea	Ryu2005_03	B1	Ryu2005	none	9	16	8	53	17	2	8	8
Keim2000 #89	3	USA	Keim2000_89	B1	Keim2000	none	9	19	7	53	17	2	7	10
Bant #298	3	Luxembourg	Lista2006_61	B1	Lista2006	none	9	19	7	53	17	2	7	8
Keim2000 #85	3	MOZ	Keim2000_85	B1	Keim2000	none	9	11	8	53	17	2	7	9
Keim2000 #64	4	INDO	Keim2000_64	A3b	Keim2000	none	10	16	8	53	17	2	10	9
Ryu2005 #08	4	Korea	Ryu2005_08	A3b	Ryu2005	none	10	16	8	53	17	2	-1	-1
Gierczynski2004 #06	4	Poland	Gierczynski2004_NovelB2_2	B2	Gierczynski2004_NovelB2	Genotype 20	9	15	5	53	17	2	9	6
Gierczynski2004 #04	4	Poland	Gierczynski2004_NovelB2_1	B2	Gierczynski2004_NovelB2	Genotype 21	9	15	5	53	17	2	9	7
Fouet2002 #08	4	France	Fouet2002_80	B2	Fouet2002	Genotype 22	9	15	7	53	17	2	9	8
Keim2000 #68	4	USA	Keim2000_68	A3b	Keim2000	none	9	16	6	57	17	2	8	10
Keim2000 #58	4	CAN	Keim2000_58	A3a	Keim2000	none	10	16	7	53	17	2	8	10
Fouet2002 #07	4	France	Fouet2002_79	B2	Fouet2002	Genotype 23	9	15	7	53	17	2	9	7
Keim2000 #06	4	GER	Keim2000_06	A3b	Keim2000	none	9	16	7	53	17	2	9	10
Bant #319	4	(Davis)	Lista2006_59	B1	Lista2006	none	9	19	8	46	19	2	-1	-1
Bant #290	4	France	Lista2006_62	B2	Lista2006	none	9	15	7	53	17	2	9	8
Bant #310	4	France	Lista2006_63	B2	Lista2006	none	9	15	7	53	17	2	9	8
Bant #286	4	France	Lista2006_66	B2	Lista2006	none	9	15	7	53	17	2	-1	-1
Bant #314	4	France	Lista2006_64	B2	Lista2006	none	9	15	7	53	17	2	9	7
Lista2006 #001	4	Italy (Veneto)	Lista2006_65	B2	Lista2006	none	9	15	7	53	17	2	9	7

분석하기 위해 MLVA-8 마커를 이용하였다. MLVA-8 마커들 중 *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2*, *CG3*는 탄저균의 AFLP 마커들에 의해서^[7], *vrrA*와^[9] 나머지 2개 마커^[19] 들은 pXO1과 pXO2 플라스미드의 서열분석에 의해 확인되었다.

MLVA-8 마커를 이용하여 분석한 결과 관찰된 단편의 크기를 염기서열의 반복개수로 계산하여 얻어진 값을 2006년에 보고된 *Bacillus anthracis* MLVA 데이터와 비교 분석하였다^[15,16]. MLVA-8에 따른 분자유전학적 분석결과 분자유전학적으로 가장 유사한 28종의 기종에 보고된 탄저균들과 비교하여 phylogenetic tree를 그렸다. 분석결과, 탄저균 Hyu #1는 B1 cluster의 Ryu2005_2균주와 가장 유사하였다(Ryu et al., 2005).

또한 Ryu2005_2 균주 뿐만 아니라 B1 cluster의 대부분 균주들의 경우 *CG3*, *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2*, pXO1은 동일한 반복개수를 가지나 pXO2에서만 조금씩 차이를 보였다.

탄저병이 발발하거나 생화학테러가 발생하였을 경우 제한 시간 내에 매우 유사한 탄저균들을 구분하는 것은 어렵다. 따라서 새로운 탄저균을 더욱 많이 확보하여 자료를 확보하고, 탄저균의 검출 시간을 최소화하기 위하여 MLVA 방법을 포함하는 여러 분자유전학적 방법(Canonical Single Nucleotide Polymorphisms, Single Nucleotide Repeats 등)을 이용하여 분석하는 시스템 구축이 필요하다^[18].

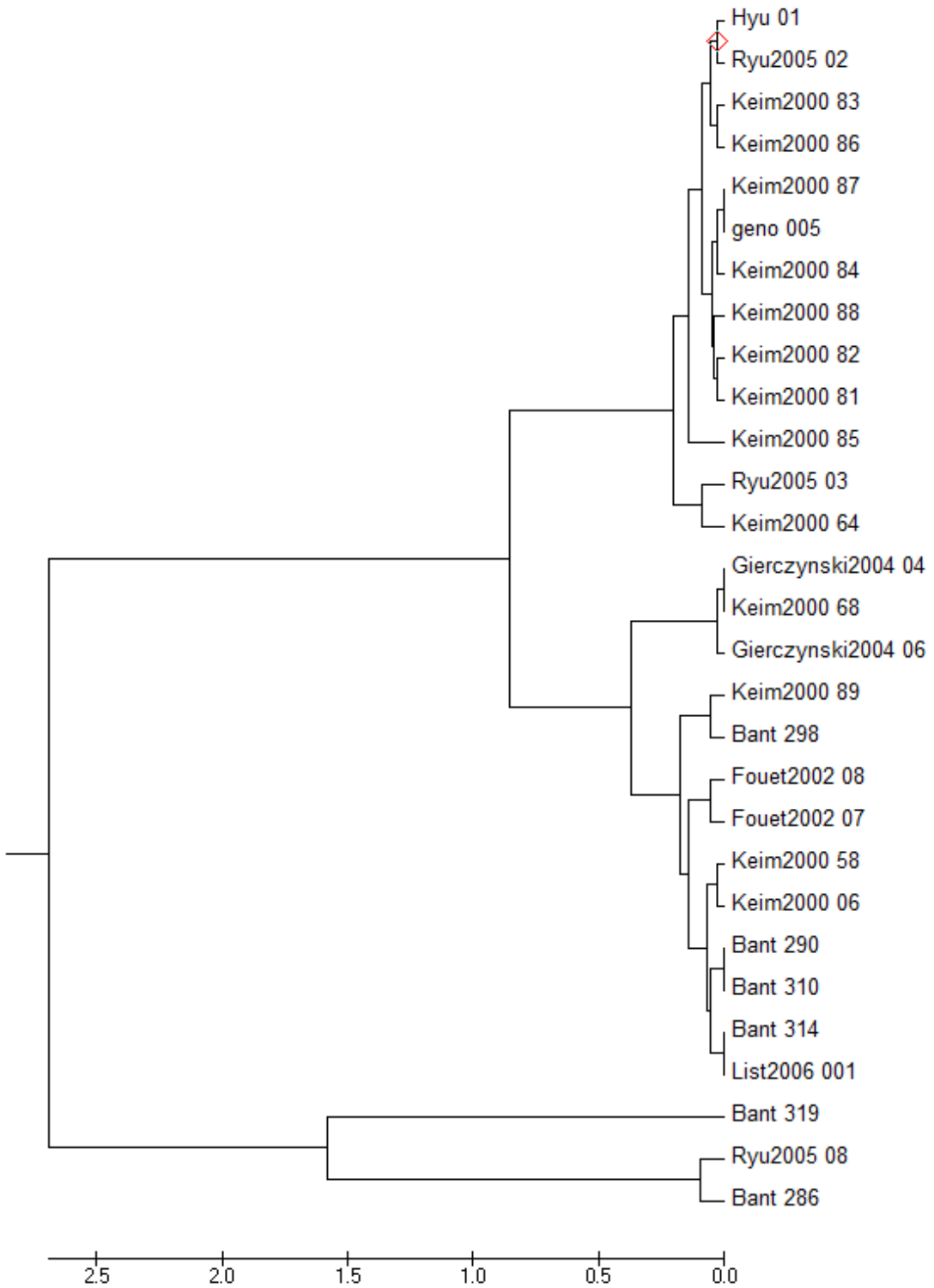


Fig. 3. The phylogenetic tree for strain Hyu #1. The relationship between MLVA-8 and sub-lineage

5. 결론

본 연구를 통해 확보된 탄저균 Hyu #1이 기존에 보고되지 않은 새로운 강독균주임을 확인하였으며, MLVA를 이용한 분자유전학적 특성 분석결과 확보한 탄저균이 B1 cluster에 속한다는 것을 확인하였다.

Reference

- [1] Mock M., Fouet A., Anthrax, *Annu Rev Microbiol*, 55 : 647~671., 2001.
- [2] Turnbull P. C., Lindeque P. M., Le Roux J., Bennett A. M., Parks S. R., Airborne Movement of Anthrax Spores from Carcass Sites in the Etosha National Park, Namibia, *J Appl Microbiol*, 84(4) : 667~676, 1998.
- [3] Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R., Sorlini C., A Randomly Amplified Polymorphic DNA Marker Specific for the *Bacillus Cereus* Group is Diagnostic for *Bacillus Anthracis*, *Appl Environ Microbiol*, 65(3) : 1298~1303, 1999.
- [4] Patra G., Sylvestre P., Ramiisse V., Therasse J., Guesdon J. L., Isolation of a Specific Chromosomal DNA Sequence of *Bacillus Anthracis* and its Possible Use in Diagnosis, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 15(4) : 223~231, 1996.
- [5] Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M., Molecular Characterization of *Bacillus* Strains Involved in Outbreaks of Anthrax in France in 1997, *J Clin Microbiol*, 36(11) : 3412~3414, 1998.
- [6] Gierczynski R., Jakubczak A., Jagielski M., Extended Multiple-locus Variable-number Tandem-repeat Analysis of *Bacillus Anthracis* Strains Isolated in Poland, *Pol J Microbiol*, 58(1) : 3~7, 2009.
- [7] Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S. E., Richmond K., Adair D. M., Hugh-Jones M., Kuske C. R., Jackson P., Molecular Evolution and Diversity in *Bacillus Anthracis* as Detected by Amplified Fragment Length Polymorphism Markers, *J Bacteriol*, 179(3) : 818~824, 1997.
- [8] Price L. B., Hugh-Jones M., Jackson P. J., Keim P., Genetic Diversity in the Protective Antigen Gene of *Bacillus Anthracis*, *J Bacteriol*, 181(8) : 2358~2362, 1999.
- [9] Andersen G. L., Simchock J. M., Wilson K. H., Identification of a Region of Genetic Variability Among *Bacillus Anthracis* Strains and Related Species, *J Bacteriol*, 178(2) : 377~384, 1996.
- [10] Henderson I., Yu D., Turnbull P. C., Differentiation of *Bacillus Anthracis* and other 'Bacillus Cereus Group' Bacteria using IS231-derived Sequences, *FEMS Microbiol Lett*, 128(2) : 113~118, 1995.
- [11] Jackson P. J., Walthers E. A., Kalif A. S., Richmond K. L., Adair D. M., Hill K. K., Kuske C. R., Andersen G. L., Wilson K. H., Hugh-Jones M. et al, Characterization of the Variable-number Tandem Repeats in *vrrA* from Different *Bacillus Anthracis* Isolates, *Appl Environ Microbiol*, 63(4): 1400~1405, 1997.
- [12] Van Ert M. N., Easterday W. R., Huynh L. Y., Okinaka R. T., Hugh-Jones M. E., Ravel J., Zanecki S. R., Pearson T., Simonson T. S., U'Ren J. M. et al, Global Genetic Population Structure of *Bacillus Anthracis*, *PLoS One*, 2(5) : e461, 2007.
- [13] Fasanella A., Losito S., Adone R., Ciuchini F., Trotta T., Altamura S. A., Chiocco D., Ippolito G., PCR Assay to Detect *Bacillus Anthracis* Spores in Heat-treated Specimens, *J Clin Microbiol*, 41(2) : 896~899, 2003.
- [14] Keim P., Price L. B., Klevytska A. M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugh-Jones M. E., Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus Anthracis*, *J Bacteriol*, 182(10) : 2928~2936, 2000.
- [15] Kim T. H., Seo G. M., Jung K. H., Kim S. J., Kim J. C., Oh K. G., Koo B. S., Chai Y. G., Generation of a Specific Marker to Discriminate *Bacillus Anthracis* from Other Bacteria of the *Bacillus Cereus* Group, *J Microbiol Biotechnol*, 17(5) : 806~811, 2007.
- [16] Marston C. K., Gee J. E., Popovic T., Hoffmaster A. R., Molecular Approaches to Identify and Differentiate *Bacillus Anthracis* from Phenotypically

- Similar Bacillus Species Isolates, BMC Microbiol, 6 : 22, 2006.
- [17] Tsygankova O. I., Eremenko E. I., Riazanova A. G., Tsygankova E. A., Multiplex Amplification Test System for the Identification and Differentiation of Bacillus Anthracis, Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, (3) : 69~74, 2005.
- [18] Keim P., Van Ert M. N., Pearson T., Vogler A. J., Huynh L. Y., Wagner D. M., Anthrax Molecular Epidemiology and Forensics : Using the Appropriate Marker for Different Evolutionary Scales, Infect Genet Evol, 4(3) : 205~213, 2004.
- [19] Miettinen M. K., Siitonen A., Heiskanen P., Haajanen H., Bjorkroth K. J., Korkeala H. J., Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by Listeria Monocytogenes in Cold-smoked Rainbow Trout, J Clin Microbiol, 37(7) : 2358~2360, 1999.