

실시간 중합효소 연쇄반응을 활용한 생물작용제 검증시스템 연구

차영길^{*,1),2)} · 구본우¹⁾ · 김성주³⁾ · 김남일¹⁾ · 박한오¹⁾

¹⁾ ㈜바이오니아 진단과학시약연구소

²⁾ 강원대학교 약학대학

³⁾ 국방과학연구소 제5기술연구본부

A Study on the Validation system of Detection for Biological Agents Using Real-Time PCR

Younggil Cha^{*,1),2)} · Bonwoo Koo¹⁾ · Seongjoo Kim³⁾ · Namil Kim¹⁾ · Hanoh Park¹⁾

¹⁾ Molecular Diagnostic Division, Bioneer Corp., Korea

²⁾ College of Pharmacy, Kangwon National University, Korea

³⁾ The 5th Research and Development Institute, Agency for Defense Development, Korea

(Received 11 November 2016 / Revised 24 July 2017 / Accepted 22 September 2017)

ABSTRACT

Bacillus anthracis, *Vibrio cholerae*, Variola virus and *Shigella dysenteriae* are classified as category A and B biological weapons. In this study suggest that 4 genes of *Bacillus anthracis*, 2 genes of *Vibrio cholerae*, 1 gene of Variola virus and 1 gene of *Shigella dysenteriae* were detective 50~500 fg of target DNA per reaction using real-time PCR based assay. Also analytical specificity did not show any cross-reactivity with other related bacteria. Reliable and one reaction could be effective early diagnostic and treatment for detection of unknown samples.

Key Words : *Bacillus Anthracis*(탄저균), *Vibrio Cholerae*(콜레라균), *Shigella Dysenteriae*(이질균), Variola Virus(천연두바이러스), 실시간중합효소 연쇄반응(Real-Time PCR), 탄저균(*Bacillus Anthracis*), 콜레라균(*Vibrio Cholerae*)

1. 서론

이질균(*Shigella dysenteriae*), 천연두바이러스(*Variola virus*)와 같은 박테리아는 인체에 심각한 질병을 유발

시킬 수가 있다.

특히 이러한 미생물들은 환경에 노출되어 지역 감염을 유발할 수 있기 때문에 미국 질병관리통제예방센터(US Center of Disease Control and Prevention, CDC)는 각 미생물들을 위험도에 따라 분류하고 있다^[1]. 탄저균과 천연두바이러스는 Category A로 분류되며, 콜레라균과 이질균은 Category B로 분류되어 있다.

* Corresponding author, E-mail: chunsang@bioneer.co.kr
Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

Table 1. NIAID emerging infectious diseases/pathgens

Category A	Category B	Category C
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus anthracis</i> • Botulinum toxin • <i>Yersinia pestis</i> • Variola major (small pox) and other related pox viruses • <i>Francisella tularensis</i> • Viral hemorrhagic fever 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Burkholderia pseudomallei</i> • <i>Coxiella burnetii</i> • Brucella species • <i>Burkholderia mallei</i> • <i>Chlamydia psittaci</i> • Ricin toxin • Epsilon toxin • <i>Staphylococcus enterotoxin B</i> • <i>Rickettsia prowazekii</i> • Food- and waterborne pathogens • Mosquito-borne encephalitis viruses 	<ul style="list-style-type: none"> • Nipah and Hendra viruses • Hantaviruses • Tickborne hemorrhagic fever viruses • Tickborne encephalitis complex flaviviruses • Yellow fever virus • Tuberculosis • Influenza virus • Other Rickettsias • Rabies virus • Prions • Chikungunya virus • Coccidioides spp. • Highly pathogenic human coronaviruses • drug-resistant pathogen

이러한 미생물들은 감염성으로 인하여 생물 테러 (Bioterrorism)에 활용 될 수 있는데, 2001년 미국 World Trade Center 및 Pentagon의 테러 이후인 2001년 10월 4일부터 11월 20일 동안 미국 전역에서 탄저균 테러로 인해 총 22건의 탄저병이 발생하였다. 2001년 발생된 탄저병은 탄저균의 포자를 이용하여 편지 배달부 등의 불특정 다수를 겨냥한 것으로 알려졌다^[2]. 이러한 균들은 지역 환경에 퍼지거나 사람과 사람간의 전파가 용이하기 때문에 공중보건 및 사회적 혼란 등이 발생하여 국가적으로 큰 문제점을 유발할 수 있음이 확인되었다^[3]. 이 때문에 탄저균, 콜레라균, 장티푸스균, 이질균과 같은 미생물들의 신속하고 정확한 진단 및 검출은 노출된 환자나 환경 등을 빠르게 파악함으로써 노출된 환자의 조기 치료 및 환경으로의 방출을 최소화시킬 수 있어 생물 테러 방지에 중요한 역할을 차지한다.

천연두바이러스는 1980년 제33회 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 총회에서 지구상에서 바이러스가 박멸되었다고 선언하였다. 하지만 대량살상무기로서의 사용 가능성이 남아있기 때문에 바이러스 백신, 치료제 및 진단법등을 계속 유지하고 있다^[4].

탄저균, 콜레라균, 이질균, 천연두바이러스와 같은 병원체들을 검출하기 위해 일반적으로 사용되는 방법은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)이다. 중합효소연쇄반응은 미량의 병원체에 존재하는 DNA를 증폭하여 검출함으로써 환자 및 환경 내의 존재 유무를 확인할 수 있는 방법으로 민감도가 면역 반응에 비하여 높으며, 고전적인 배양법에 비해 시간이 짧게 걸린다^[5]. 중합효소연쇄반응을 사용하면 미량의 DNA를 검출할 수 있지만, 전기영동(Agarose electrophoresis) 과정을 통해 검출해야하는 과정을 거쳐야 하기 때문에 시간이 오래 걸리는 단점이 있다^[6]. 최근에는 이를 보완하기 위하여 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time PCR)을 사용하는데, 중합효소연쇄반응에 비해 민감도가 더 높으며 반응 후 결과를 바로 알 수 있다는 장점이 있다. 실시간 중합효소연쇄반응은 형광 물질을 사용하여 검출하게 되는데, 형광 물질을 사용함에 따라 기존의 중합효소연쇄반응의 검출 과정이 필요 없기 때문에 교차 오염 가능성이 현저히 줄어든다^[7].

이러한 이유로 많은 연구자들이 탄저균을 비롯한 여러가지 병원체를 실시간 중합효소연쇄반응을 사용하여 검출하였다. 특히나 실시간 중합효소연쇄반응은 중합효소연쇄반응과 달리 한 개의 반응 용기에서 FAM(5' Fluorescein, excitation 495 nm, emission 520 nm), CY5 (Cyanine 5, excitation 646 nm, emission 662 nm)와 같은 다양한 형광 물질을 사용하여 한 번에 검출할 수 있기 때문에 미생물의 여러 가지 유전자를 한 번의 반응으로 검출할 수 있다^[8].

미국에서는 실시간 중합효소연쇄반응의 장점을 바탕으로 생물 테러를 일으킬 수 있는 다양한 균들을 검사할 수 있는 RAZOR(Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA) 장비 등이 상용화 되어 있는데, 탄저균과 같은 일부 병원체와 Ricin 등 일부 독소에 대해서만 검출할 수 있도록 구성이 되어 있다^[9]. 이 때문에 콜레라균, 이질균과 같은 병원체들은 구성에 포함되어 있지 않아 검출을 할 수 없다.

한편 RAZOR 장비는 개발이 오래된 장비이며, 민간에서 사용되고 있지 않기 때문에 이를 보완한 Filmarray[®] Biothreat panel(Biofire Diagnostic Inc., Salt Lake City, UT, USA)을 개발하여 사용 중에 있다. 이 panel에는 17개의 병원체를 검출할 수 있는 시스템이다^[10]. 이 시스템에는 탄저균 등의 박테리아 및 Ebola virus(Zaire) 등의 바이러스가 포함되어 있으나, 콜레라균과 이질균

은 포함되어 있지 않아 검출할 수 없다.

이 연구의 목적은 국내에서 시도되지 않았던 탄저균, 콜레라균, 이질균 및 천연두바이러스의 4종 병원체를 실시간중합효소연쇄반응을 이용하여 한 번의 반응으로 4종을 모두 검출할 수 있는 방법을 제시하는데 있다.

2. 실험

2.1 병원체

추출된 탄저균, 콜레라균, 이질균, 천연두바이러스의 DNA는 국방과학연구소 제5기술본부로부터 제공받았다. 천연두바이러스는 병원체가 없기 때문에 본 연구에서는 천연두바이러스의 백신균주인 Vaccinia virus를 사용하였다.

2.2 유전자 정보

탄저균, 콜레라균, 이질균 및 천연두바이러스를 검출하기 위한 타깃 유전자는 Table 2와 같다.

Table 2. Information of target genes

Target	Gene	Accession No.	Reference
<i>Bacillus anthracis</i>	Protective antigen(PA)*	KP213104.1	[1]
	Lethal factor (LF)*	JQ798176.1	[11]
	pXO2	CP010854.1	[12]
	Ba813	EF038346.1	[13]
<i>Vibrio Cholerae</i>	ctxB	KP165409.1	[14]
	O1	KC152957.1	[15]
Variola virus	HA	AF375143.1	[4]
<i>Shigella dysenteriae</i>	HP	CP006736.1	[16]

*PA와 LF는 모두 pXO1 플라스미드에 포함되어 있는 유전자임

타깃 유전자는 검증시스템의 양성대조물질로 활용하기 위해 유전자 합성서비스(Bioneer Corp., South Korea)를 이용하여 유전자를 합성하였으며, 플라스미드는

Escherichia coli DH5a(Real Biotech Corporation, Banqiao City, Taipei county, Taiwan)를 이용해 클로닝을 하였다. 플라스미드는 AccuPrep[®] Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit(Bioneer Corp., Daejeon, South Korea)를 사용하여 추출하였으며, 병원체 DNA는 Exiprep[™] Bacteria Genomic DNA Kit(Bioneer Corp., Daejeon, South Korea)을 사용하여 추출하였다.

2.3 실험 장비 및 결과 분석

실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 실험 장비는 ABI 7500 Fast Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, 결과 분석을 위해 분석 프로그램으로 7500 software version 2.06을 사용하였다.

2.4 실험 방법

검출에 필요한 primer와 probe는 Primer 3 software version 0.4.0^[17]을 사용하여 설계 하였으며, 실시간중합효소연쇄반응은 AccuPower[®] Plus DualStar qPCR Master Mix(Bioneer Corp., Daejeon, South Korea)를 사용하였다. 반응 혼합물은 mastermix 12.5 μ l, primer mix 5 μ l, 0.5X ROX dye 1 μ l, DEPC DW 1.5 μ l를 사용하였으며, 플라스미드 및 병원체 DNA는 5 μ l를 사용하였다. 실시간 중합효소연쇄반응의 반응 온도는 Table 3과 같다.

Table 3. Protocol for real time PCR

Target	Temperature	Time	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Anneling & Extension	55 °C	30 sec	
Scan	Scan		

3. 결과 및 논의

탄저균, 콜레라균, 이질균 및 천연두바이러스의 4가지 병원체를 검출을 위한 검증 시스템의 성능을 확인하기 위하여 합성된 8종의 플라스미드를 활용하여 실험을 진행하였다(Table 4). 본 실험에서는 각 유전자들을 혼합하고, 토양에서 DNA를 추출 및 혼합하였다.

지역 감염을 확인하기 위한 토양 내에는 다양한 미생물이 서식한다. 이러한 토양에는 병원체 DNA 뿐만 아니라 다른 미생물들의 DNA가 함께 섞여있기 때문에 병원체 검출에 영향을 줄 수 있다. 이 때문에 실제 채취된 토양과 유사한 환경을 만들기 위하여 주변에 흔하게 보이는 토양에서 DNA를 추출 및 혼합하였다.

Table 4. Detected concentration of plasmid for each genes

병원체	Target	농도(copies/reaction)						
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
탄저균	PA	+	+	+	+	+	+	-*
	LF	+	+	+	+	+	+	-
	pXO2	+	+	+	+	+	+	-
	Ba813	+	+	+	+	+	+	-
콜레라	CtxB	+	+	+	+	+	+	-
	O1	+	+	+	+	+	+	-
천연두	HA	+	+	+	+	+	+	-
이질	HP	+	+	+	+	+	+	-

* + : Positive, - : Negative

플라스미드에 포함되어 있는 유전자의 농도는 copy 단위를 사용하였다. copy단위는 유전자의 개수를 나타내는 단위로 검출유전자는 병원체당 1개밖에 들고 있지 않기 때문에 1copy = 1병원체를 의미한다. 탄저균의 유전자 4종에 대해 PA: 20 copies/ μ l, LF: 20 copies/ μ l, pXO2: 20 copies/ μ l, Ba813: 20 copies/ μ l까지, 콜레라균의 유전자 2종에 대해 ctxB: 20 copies/ μ l, O1: 20 copies/ μ l까지, 이질균의 HP: 20 copies/ μ l까지, 천연두바이러스의 HA: 20 copies/ μ l까지 각각 나타났다. 이는 각 병원체가 시험 당 100개 이상이 있으면 검출이 가능함을 의미한다.

환경에서 채취된 샘플은 4가지의 병원체뿐만 아니라 다양한 병원체가 포함되어 있으며, 추출 후에는 이러한 병원체들의 핵산이 함께 포함되어 있다. 각 시험 시 토양에서 추출된 DNA를 첨가하였지만 포함되어있는 유전자의 종류를 확인하기 어렵다. 따라서 검출하고자 하는 유전자만 특이적으로 검출할 수 있어야 하며, 이를 검증하기 위하여 포함될 수 있는 다양한 알려진 유전자를 대상으로 특이도 실험을 진행하였다.

Table 5. Specificity of validation system

Species	Source ^a	Assay result	
		Target ^b	IPC ^c
<i>Bacillus cereus</i>	21366	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	6750	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	11439	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	8043	-	+
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	+
<i>Escherichia coli</i>	35218	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8724	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	-	+
<i>Morganella morganii</i>	25830	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	25933	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	13315	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	27112	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	12022	-	+
<i>Shigella sonnei</i>	9290	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	23715	-	+

a : ATCC Catalogue number

b : 8종의 유전자

c : Internal Positive Control

특이도 실험 결과에 따라 탄저균, 콜레라균, 이질균 및 천연두바이러스의 4종을 제외한 20종 병원체에서 나타나지 않았기 때문에 검증 시스템은 특이적으로 4종의 병원체만을 검출할 수 있다. 한편 탄저균인 *Bacillus anthracis*와 *Bacillus cereus*는 유전학적으로 같은 목에 속하기 때문에 chromosome에 위치한 Ba813은 *Bacillus anthracis*와 *Bacillus cereus* 두 종 모두 나타난다.

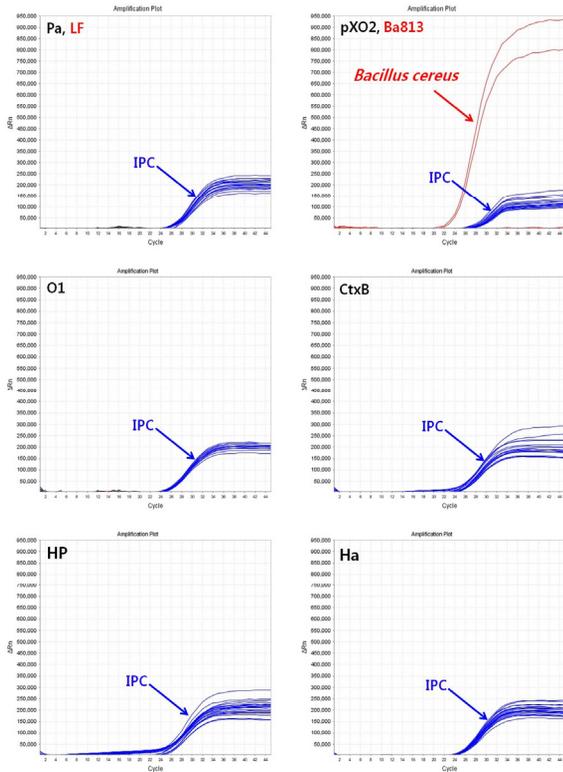


Fig. 1. Specificity test result of validation system

정제된 플라스미드가 아닌 실제 병원체 DNA에서 검출 민감도를 확인하기 위하여 각 병원체 DNA를 10 pg/μl, 1 pg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl, 1 fg/μl로 각각 1/10씩 희석하여 검출 민감도를 확인하였다. 시험 결과의 X축은 Ct(Cycle threshold, probe의 형광 값이 일정 수준을 넘어 기기에서 인식할 수 있을 때의 Cycle 수) 값을 의미하며, Y축은 검출 형광 값의 수치를 나타낸다.

실제 병원체를 사용하여 실험한 결과 각 병원체당 최소 10 fg/μl부터 실험에 사용한 최대 농도인 10 pg/μl까지 검출됨이 확인되었다. 1/10씩 희석한 sample의 모든 농도에서 검출됨에 따라 실험에서 사용한 최대 농도 10 pg/μl 보다 높은 경우에도 검출될 수 있음을 의미한다. Fig. 2는 각 타깃별로 나타난 농도에 따른 그래프이며, 검은색과 붉은색은 각 타깃의 검출 그래프를 의미한다.(각 그래프마다 검출한 농도 값을 나타냈다.) 푸른색의 IPC(Internal Positive Control)는 각 시험 well마다 모두 동일하게 나타나야 하는 지표로 특정 well에서 PCR이 제대로 이뤄지지 않으면 IPC가 일

정하게 나타나지 않게 된다. 본 시험에서 IPC는 모두 일정하게 나타나 각 타깃마다 시험 결과의 신뢰성을 입증하였다. 병원체를 이용한 실험 결과를 요약한 표는 Table 6과 같다.

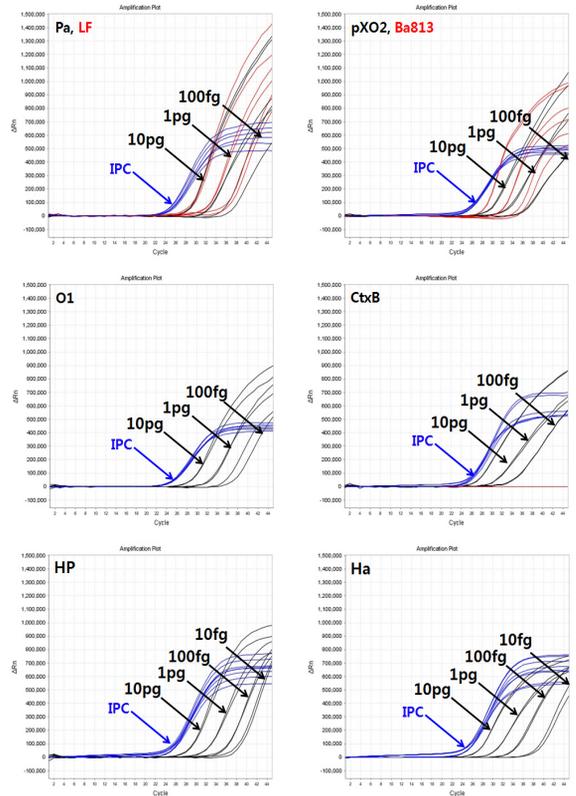


Fig. 2. Sensitivity of validation system

Table 6. Sensitivity test result of validation system

병원체	Target	민감도
탄저	PA	100 fg/μl
	LF	100 fg/μl
	pXO2	100 fg/μl
	Ba813	100 fg/μl
콜레라	CtxB	100 fg/μl
	O1	100 fg/μl
천연두	HA	10 fg/μl
이질	HP	10 fg/μl

4. 결론

실시간중합효소연쇄반응은 민감도가 높으며, 빠른 시간 내에 검출할 수 있는 방법이기 때문에 병원체를 검출하기 위한 방법으로 사용되고 있다^[8]. 이 때문에 미국 질병관리통제예방센터는 Category A, B에 대한 진단 방법을 개발 및 배포하고 있으나 병원체를 단독으로 검출하는 방법에 대해서만 국한되어 있다^[1].

본 연구는 실시간중합효소연쇄반응의 방법적 특성을 활용 및 동일한 프로토콜을 적용하여 탄저균, 콜레라균, 이질균 및 천연두바이러스의 4개 병원체, 8종 유전자를 한 번의 실험을 통해 검출하였다. 비록 장비에서 한 번에 검출할 수 있는 유전자의 종류가 한정되어 있기 때문에 같은 튜브에서 검출되는 것은 아니지만 미지의 시료를 한 번에 검출할 수 있기 때문에 다른 튜브를 사용하는 것이 중요한 문제가 되지 않는다. 합성된 플라스미드를 사용하여 20 copies/ μ l까지 검출이 확인됨에 따라 μ l당 20개의 병원체가 존재하는 경우 검출이 가능함을 확인하였으며, 각 균주를 사용한 시험을 통해 100 fg/ μ l까지 확인하였다. 비록 환경 유래, 감염된 환자 검체 등을 활용하여 시험하지는 않았으나, 유사한 병원체 DNA를 이용한 특이도 시험 및 도양에 존재하는 다양한 DNA를 혼합 실험함으로써 환경 유래, 감염된 환자 검체 등에서 포함되어 있는 다량의 DNA로 인해 발생할 수 있는 중합효소연쇄반응의 저해현상을 확인하여 결과 오차를 최소화 하였다.

본 연구 결과는 100 fg/ μ l, 10 fg/ μ l 같은 낮은 농도의 병원체를 검출할 수 있어 생물테러로 활용 될 수 있는 병원체를 보다 쉽게 검출할 수 있다는 장점이 있다. 또한 2001년 미국에서의 생물작용제를 이용한 미지의 생물작용제를 이용한 테러에서 생물작용제를 한 번의 실험을 통해 확인함으로써 조기 진단 및 치료에 기여할 수 있을 것이라 기대된다.

후 기

논문작성에 도움을 주신 김성주 박사님 이하 국방과학연구소 관계자분들께 깊은 감사를 드립니다.

References

- [1] P. Matero, H. Hemmilä, H. Tomaso, H. Piiparinen, K. Rantakokko-Ja;ava, L. Nuotio and S. Nikkari, "Rapid Field Detection Assay for Bacillus Anthracis, Brucella spp., Francisella Tularensis and Yersinia Pestis," Clinical Microbiology and Infection, Vol. 17, No. 1, pp. 34-43, 2011.
- [2] Daniel B. Jerniganm Pratima L. Raghunathan, Beth P. Bell, Ross Brechner, Eddy A. Bresnitz, Jay C. Butler, Marty Cetron, Mitch Cohen, Timothy Doyle, Marc Fischer, Carolyn Greene, Kevin S. Griffith, Jeannette Guarner, James L. Hadler, James A. Hayslett, Richard Meyer, Lyle R. Petersen, Michael Phillips, Robert Pinner, Tanja Popovic, Conrad P. Quinn, Jennita Reefhuis, Dori Reissman, Nancy Rosenstein, Anne Schuchat, Wun-ju Shieh, Larry Siegal, David L. Swerdlow, Fred C. Tenover, Marc Traeger, John W. Ward, Isaac Weisfuse, Steven Wiersma, Kevin Yeskey, Sherif Zaki, David A. Ashford, Bradley A. Perkins, Steve Ostroff, James Hughes, David Fleming, Jeffrey P. Koplan, Julie L. Gerberding and the National Anthrax Epidemiologic Investigation Team, "Investigation of Bioterrorism Related Anthrax, United States, 2001: Epidemiologic Findings," Emerging Infectious Diseases, Vol. 8, No. 10, pp. 1019-1028, 2002.
- [3] Aleksandra A. Zasada, Kamila Forminska and Kataezyna Zacharczuk, "Fast Identification of Yersinia Pestis, Bacillus Anthracis and Francisella Tularensis Based on Conventional PCR," Polish Journal of Microbiology, Vol. 62, No. 4, pp. 453-455, 2013.
- [4] David A. Kulesh, Robert O. Baker, Bonnie M. Loveless, David Norwood, Susan H. Zwiers, Eric Mucker, Chris Hartmann, Rafael Herrera, David Miller, Deanna Christensen, Leonard P. Wasieloski, Jr., John Huggins, and Peter B. Jahrling "Smallpox and pan-Orthopox Virus Detection by Real-Time 3-Minor Groove Binder TaqMan Assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler Platforms," Journal of Clinical Microbiology, Vol. 42, No. 2 pp. 601-609, 2004.
- [5] M. P. Ulrich, D. R. Christensen, S. R. Coyne, P. D.

- Craw, E. A. Henchal, S. H. Sakai, D. Swenson, J. Tholath, J. Tsai, A. F. Weir and D. A. Norwood, "Evaluation of the Cepheid GeneXpert[®] System for Detecting *Bacillus Anthracis*," *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, pp. 1011-1016, 2006.
- [6] D. E. Seiner, H. A. Colburn, C. Baird, R. A. Bartholomew, T. Straub, K. Victry, J. R. Hutchison, N. Valentine and C. J. Bruckner-Lea, "Evaluation of the FilmArray[®] System for Detecting *Bacillus Anthracis*, *Francisella Tularensis* and *Yersinia Pestis*," *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 100, pp. 1011-1016, 2006.
- [7] Constance A. Bell, James R. Uhl, Ted L. Hadfield, John C. David, Richard F. Meyer, Thomas F. Smith and Franklin R. Cockerill III, "Detection of *Bacillus Anthracis* DNA by LightCycler PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 8, pp. 2897-2902, 2002.
- [8] Alvin Stewart, Nemjamin Satterfield, Marissa Cohen, Kim O'Neil and Richard Robison, "A Quardplex Real-Time PCR Assay for the Detection of *Yersinia Pestis* and its Plasmids," *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 57, pp. 324-331, 2008.
- [9] Ted Hadfield and Valorie Ryan, "RAZOR EX Anthrax Air Detection System for Detection of *Bacillus anthracis* Spores from Aerosol Collection Smples: Collaborative Study," *Microbiological Methods*, Vol. 96, No. 2, pp. 392-398, 2013.
- [10] D. R. Seiner, H. A. Colburn, C. Baird, R. A. Bartholomew, T. Straub, K. Victry, J. R. Hutchison, N. Valentine and C. J. Bruckner-Leai, "Evaluation of the FilmArray[®] System for Detection of *Bacillus Anthracis*, *Francisella Tularensis* and *Yersinia Pestis*," *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 114, pp. 992-1000, 2013.
- [11] Marco R. Oggioni, Francesca Meacci, Alessandra Carattoli, Alessandra Ciervo, Germano Orru, Antonio Cassone, and Gianni Pozzi, "Protocol for Real-Time PCR Identfication of Anthrax Spores from Nasal Swab after Broth Enrichment," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 11, pp. 3956-3963, 2002.
- [12] Ingmar Janse, Raditijo A Hamidjaja, Jasper M Bok, Bart J van Rotterdam, "Reliable Detection of *Bacillus Anthracis*_Francisella Tularensis and *Yersinia Pestis* by using Multiplex qPCR Including Internal Controls for Nucleic Acid Extraction and Amplification," *BMC Microbiology*, Vol. 10, pp. 1-12, 2010.
- [13] V. Ramisse, G. Patra, J. Vaissaire and M. Mock, "The Ba813 Chromosomal DNA Sequence Effectively Traces the Whole *Bacillus Anthracis* Community," *Juournal of Applied Microbiology*, Vol. 87, pp. 224-228, 1999.
- [14] K. H. Chow, T. K. NG, K. Y. Yuen and W. C. Yam, "Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio Cholerae* by PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 39, No. 7, pp. 2594-2597, 2001.
- [15] W. J. Lyon, "TaqMan PCR for Detection of *Vibrio Cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-139 in Pure Cultures, Raw Oysters, and Synthetic Sweater," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, pp. 4685-4693, 2001.
- [16] Abdela Salah Woubit, Teshome Yehualaeshet, Tsegaye Habtemariam and Temesgen Samuel "Simultaneous, Speciifc and Real-Time Detection of Biothreat and Frequently Encountered Food-Borne Pathogens," *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No. 4, pp. 660-670, 2012.
- [17] Andreas Untergasser, Ioana Cutcutache, Triinu Koressaar, Jian Ye, Brant C. Faircloth, Maida Remm and Steven G. Rozen, "Primer 3-New Capabilities and Interfaces," *Nucleic Acid Research*, Vol. 40, No. 15, pp. 1-12, 2012.
- [18] Marcus Panning, Stefanie Kramme, Nadine Petersen and Christian Drosten, "High Throughput Screening for Spores and Vegetative Forms of Pathogenic B. Anthracis by an Internally Controlled Real-Time PCR Assay with Automated DNA Preparation," *Med Microbiol Immunol*, Vol. 196, pp. 41-50, 2007.