

## PCR 기법을 이용한 인공감염토양 및 감염동물 장기로 부터 *Bacillus anthracis*의 검출

이지연 · 유한상\* · 김종엽

국립수의과학검역원  
서울대학교 수의과대학\*  
(1998년 3월 20일 접수)

### Establishment of PCR to detect *Bacillus anthracis* in the experimentally infected soil and mice

Ji-youn Lee, Han-sang Yoo\* , Jong-yeom Kim

Department of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research and Quarantine Services, MAF  
Department of Infectious Disease, College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*

(Received Mar 20, 1998)

**Abstract** : Anthrax caused by *Bacillus anthracis* is one of the most important zoonotic diseases in the worldwide. To control and prevent the disease effectively, several methods such as development of a fast and specific diagnostic method and vaccine, education etc, have been carried out. However, it still has a problem in the control and prevention. To control, the most important method is the prevention of direct or indirect contact of the causative agent with susceptible host. Therefore, we developed a fast and specific detection method, polymerase chain reaction, of *B anthracis* from soil and infected animals because the organism could survive long time in the environment including soil due to formation of spore. With the method, virulence genes of *B anthracis* were successfully amplified from experimentally infected soil and mice. Up to  $4.2 \times 10^6$  of the organisms per gram could be detected with the PCR method from experimentally infected soil. These results suggested that this PCR method could be effectively used not only to detect *B anthracis* in soil and infected animal but also to provide the information to prevent the disease.

**Key words** : PCR, *B anthracis* , soil, mice.

---

본 연구는 1997년 농촌진흥청 산·학·관 공동연구의 연구비로 수행되었음.  
Address reprint requests to Dr. Han-sang Yoo, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Republic of Korea.

## 서 론

탄저(*Anthrax*)는 그람양성의 아포를 형성하는 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 의해 발생하는 급성, 열성의 전염병으로 넓은 숙주영역을 가지는 인수공통전염병이다<sup>1-5</sup>. 탄저는 주위환경에서 오랫동안 생존할 수 있는 아포를 형성하기 때문에 토양이 전파의 중요한 매개체로 작용하는 토양매개전염병의 하나로 동물에서의 탄저발생은 주로 토양에서 유래된 아포와의 접촉에 의해서 발생된다. 사람에서의 탄저의 감염은 탄저균에 오염된 식육의 섭취, 감염된 동물 또는 그 부산물에 접촉 또는 공기중의 아포를 흡입함으로써 발병하게 되는데 발병부위에 따라서 폐탄저, 장탄저, 피부탄저로 구분된다<sup>1,6</sup>. 국내에서도 과거에는 탄저가 주로 소를 중심으로한 가축에서 발생하여 막대한 경제적 피해를 주었을 뿐만 아니라 사람에서도 이들 환축과의 접촉 또는 폐사축 등 오염된 축산물의 섭취 등에 의해서 사람에서도 산발적으로 발생하여 피해를 주었다. 그러나 가축에서의 계속적인 예방 접종 실시와 홍보 등으로 1978년 1두 발생 이후 1993년까지는 발생이 없었다<sup>1</sup>. 그러나 1994년에 경주와 홍성에서 각각 1건씩 발생하였고, 다시 1995년에 홍성에서 1건이 발생되어 아직까지도 국내가 탄저의 상재지임을 암시해 주고 있다<sup>7,8</sup>. 특히 경주에서는 폐사축을 섭취한 주민들이 사망하는 등 심한 피해를 주었다<sup>7,8</sup>. 이처럼 탄저는 사람에게도 치명적인 전염병으로서 사람에게 발병하게 되면 사회적으로 매우 큰 혼란을 초래할 수 있다. 이로 인해 축산업에도 막대한 경제적 피해를 줄 수 있기 때문에 탄저에 대한 효율적인 예방대책이 계속적으로 강구되어 왔다. 지금까지 탄저의 진단은 주로 원인균의 분리동정, 동물접종 등의 방법과 면역학적인 방법이 적용되어 왔다<sup>1,6,9,10</sup>. 이러한 방법들은 여러가지 단점을 내포하고 있어서 이러한 점을 극복하기 위하여 새로운 탄저의 신속, 정확한 진단법 개발이 오랫동안 강구되어 왔다. 그러던 중 최근 들어서 분자생물학적 기법을 이용한 진단방법들의 개발이 시도되어 왔다<sup>11-14</sup>. 사람으로의 감염을 예방하기 위하여는 탄저의 신속한 진단 및 오염환경을 파악함으로써 토양 등 주위환경, 감염동물 등으로부터 사람과의 접촉 또는 섭취를 예방하는 것이 필수적이다. 탄저균의 주요 병원성 인자들은 pXO1과 pXO2의 plasmid에 encoding 되어 있기 때문에 이들 유전자를 검출함으

로써 탄저균을 확인할 수 있다<sup>15</sup>. 그러나 아직까지 이러한 방법들이 확립되어 있지 않기 때문에 본 실험에서는 실험실 내에서 여러 *Bacillus* 속균들중 탄저균의 병원성 유전자를 검출함으로써 *B anthracis*을 신속하게 동정하기 위하여 개발된 PCR 기법<sup>11,13</sup>을 응용하여 실험적으로 오염된 토양과 감염동물의 장기에서 탄저균을 검출할 수 있는 기법을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

공시균주 : 본 실험에 사용된 균주는 *Bacillus anthracis* Sterne 34F2와 국내에서 분리된 *B anthracis* 분리주를 사용하였다. *B anthracis* 34F2는 탄저균의 toxin-encoding plasmid(pXO1) 만을 가진 균주이고, 국내 분리주는 1994년 경주에서 발생시 분리한 균주로서 toxin-encoding plasmid(pXO1)와 capsule-encoding plasmid(pXO2) 모두를 가진 균주이다.

탄저균의 토양 및 Mouse에 감염 : 토양으로부터 탄저균을 신속하게 검출할 수 있는 기법의 확립을 위하여 토양을 autoclaving에 의하여 멸균한 후 토양 10g에  $1 \times 10^7$  CFU의 탄저균을 접종하여 잘 혼합한 후 실온에 10~14일간 방치한 후 탄저균의 분리 및 PCR 검색재료로 사용하였다. 이 PCR 기법의 민감도를 알아보기 위하여 토양 1g 당  $4.2 \times 10^8$  CFU에서부터 단계적으로 십진희석하여 접종한 후 사용하였다. 탄저의심 가검물로부터 직접 탄저균을 검출하는 기법을 확립하고자, 실험동물은 수의학연구소 실험동물연구실로부터 분양받은 mouse (BALB/C) 에 탄저균  $1 \times 10^5$  CFU를 접종하고 48시간 이내에 폐사한 경우는 폐사 직후 또는 접종후 48시간에 비장을 적출하여 탄저균의 분리 및 PCR 검색재료로 사용하였다.

토양으로부터 탄저균 및 탄저균의 DNA 분리 : 토양으로부터 탄저균의 재분리 및 검출은 기발표된 논문들<sup>16,17</sup>의 방법을 참조하여 실시하였다. 간략하면 토양 50g을 증류수 100ml에 잘 부유시킨 후 실온에서 15시간동안 150rpm의 속도로 잘 교반하였다. 교반후 500m mesh에서 250m mesh 까지의 stainless steel 망을 이용하여 연속적으로 여과하여 고형성분의 잔해물을 제거한 후 4℃에서 5,000×g로 25분간 원심분리한 후 그 침전물을 100ml의 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 부유하여 37℃에서 150rpm의 속도로 일야동안 진탕배양하였다. 이중 100μl를 취해

서 10ml의 TSB에 접종한 후 37℃에서 6시간동안 배양함으로써 spore 형성을 억제하였다. 이 배양액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 최종 3% 되게 가하여 37℃에서 1시간동안 배양함으로써 vegetative cell들을 불활화시켰다. 불활화후 4℃에서 20분간 3,000×g로 원심집균한 후 일부는 취하여 균의 재분리에 사용하였고, 나머지는 다시 Tris buffer(0.05M Tris-HCl pH 7.2, 0.15M NaCl)로 2회 원심세척한 후 집균하여 0.5ml의 TE 용액(pH 8.0)에 재부유하였다. 이 부유액에 mutanolysin(30µg/ml)과 lysozyme(5mg/ml)을 가하여 37℃에서 1시간동안 정치하였다. 정치후 다시 Proteinase K (200mg/ml), NaCl(1M)와 SDS를 최종농도가 1% 되도록 가하여 50℃에서 30분간 정치한 후 최종 3ml이 되도록 조정하여 4℃에서 45내지 60분간 냉장정치하였다. 4℃에서 정치후 다시 4℃에서 13,000×g로 15분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액에 동량의 phenol을 처리한 후 다시 4℃에서 3,000×g로 20분간 원심분리한 상층액을 다시 동량의 chloroform으로 extraction 한 후 상층액을 취하여 RNaseA(200µg/ml)를 첨가한 후 37℃에서 15분간 정치하였다. RNaseA 처리후 2.5 배양의 ice-cold ethanol을 첨가한 후 glass-rod을 이용하여 chromosomal DNA를 spooling 한 후 13,000×g로 5분간 원심침전시킨 후 70% ethanol로 washing 하고 건조시킨 후 다시 100µl의 TE(pH 8.0)에 재부유시켜 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 토양으로부터 탄저균의 재분리는 혈액배지와 선택배지인 PLETA(polymyxin, lysozyme, EDTA and thallus acetate agar)을 이용하였다<sup>17</sup>.

실험적 감염 mouse의 비장으로 부터 DNA 분리 : 감염동물의 장기로부터 탄저균의 검출은 Makino *et al*<sup>18</sup>의 방법을 기초로 하여 실시하였다. 즉, 실험적으로 감염시킨 mouse을 부검하여 loop를 이용하여 spleen으로부터 균의 재분리를 위한 재료를 취한 다음, 나머지 spleen 100mg

당 100µl의 멸균증류수와 잘 혼합한 후 emulsion이 될 때까지 압축하여 suspension을 만들었다. 이 suspension에 200µl의 Proteinase K(200µg/ml)을 포함한 2×TEN buffer (0.1M NaCl, 10mM Tris.Cl(pH 8.0), 1mM EDTA(pH 8.0)), 50µl의 20% SDS, 50µl의 20% Sarkosyl을 첨가하였다. 세균을 포함하고 있는 이 용액을 맑아질 때까지 55℃에서 정치하였다. 정치후 용액을 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 용액으로 3회 추출후 cold-ethanol로 침전시킨 후 500µl의 TE 용액에 부유시켰다. 이 부유액을 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Polymerase chain reaction : PCR은 탄저균의 신속한 동정을 위하여 이 등<sup>11</sup>이 개발한 방법을 사용하였다. 본 실험에 사용한 PCR primer의 sequence는 Table 1과 같다. 합성한 특이 primer와 Taq polymerase를 이용하여 thermalcycler (Pharmacia Co.)로 병원성 인자를 암호하고 있는 유전자의 증폭을 시도하였다. 즉, 최종량이 50µl가 되도록 하였으며, 증류수 33µl에 10×PCR buffer(500mM KCl, 100mM Tris-Hcl pH 8.3, 15mM MgCl<sub>2</sub>) 5µl, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3µl, 10mM dNTP 1µl, forward primer 1µl, reverse primer 1µl, Taq polymerase(5U/µl) 5µl를 eppendorf tube에 넣은 후 template DNA 100ng을 넣고 mineral oil을 증충하여 thermal cycler에서 증폭을 시도하였다. 반응조건은 최초 denaturation은 94℃에서 4분, 그후는 denaturation 94℃ 1분, annealing 55℃ 1분 30초, extension은 73℃에서 1분 30초간 실시하여 30회 반복 실시하였으며, 마지막 extension을 72℃에서 9분간 실시하였다. PCR을 실시한 다음 1% agarose gel에서 전기영동하여 Ethidium bromide 용액(0.5µg/ml)으로 염색하여 PCR 증폭산물을 확인하였다. PCR 증폭산물을 확인한 후 PA와 capsule 유전자가 특이적으로 증폭되었는지를 확인하기 위하여 증폭산물들을 제한효소로 분석한 후 polyacrylamide gel로 분석하여 확

Table 1. Primers used in this experiment

Primer	Nucleotide sequence(5'⇒3')	Location <sup>a</sup>	Size of amplified products(bps)
CAP9	ATGTATGGCAGTTCAACCCG	617-636	778
CAP10	ACCCACTCCATATACAATCC	1394-1375	
PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	2452-2471	597
PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	3048-3029	

<sup>a</sup> : The position numbers are those in the published nucleotide sequences of genes B and C within the cap region of PXO2(Makino *et al*) and of the PA gene of pXO1(Welkos *et al*).

인 하였다<sup>11</sup>.

## 결 과

사람 및 가축에서의 탄저를 예방하기 위한 방법중의 하나로 토양 및 감염동물의 장기로부터 탄저균을 신속하고 정확하게 검색하는 기법을 개발하고자 실험적으로 탄저균을 접종한 토양과 mouse의 비장으로부터 탄저균을 분리하고 또 PCR 기법을 이용하여 검색하였다. PCR 기법을 이용한 접종균의 검색은 탄저균의 주요 병원성 유전자인 PA와 capsule의 유전자를 검출함으로써 실시

하였다. 즉, *Bacillus anthracis* Sterne 34F2를 접종한 토양에서는 597bp 크기의 PA 유전자만이 검출된 반면 국내 분리주를 접종한 토양에서는 597bp 크기의 PA 유전자와 778bp 크기의 capsule 유전자도 동시에 검출되었다(Fig 1). 또한 PCR 기법의 민감도를 알아보기 위하여 배양한 탄저균을 토양 1g당  $4.2 \times 10^4$  CFU에서부터 십진희석하여 토양에 접종한 후 PA 유전자를 증폭함으로써 검색해 본 결과 Fig 2에서 처럼  $4.2 \times 10^1$  CFU의 농도까지 검색할 수 있었다. 감염동물의 장기로부터 탄저균의 분리없이 신속하게 검출할 수 있는 기법을 개발하고자 실험적으로 감염시킨 mouse의 비장으로부터 PCR 기법을 이용하여 직접 탄저균의 검출을 시도한 결과 Fig 3에서 처럼 *B anthracis* Sterne 34F2를 접종한 균에서는 597bp의 PA 유전자만이 검출된 반면, 국내분리주를 접종한 균에서는 597bp 크기의 PA 유전자와 778bp 크기의 capsule 유전자가 동시에 검출되었고, 비접종균에서는 공히 어떠한 반응도 나타내지 않아 개발된 이 PCR 기법이 토양 및 감염동물의 장기로부터 특이적으로 탄저균의 유전자를 검

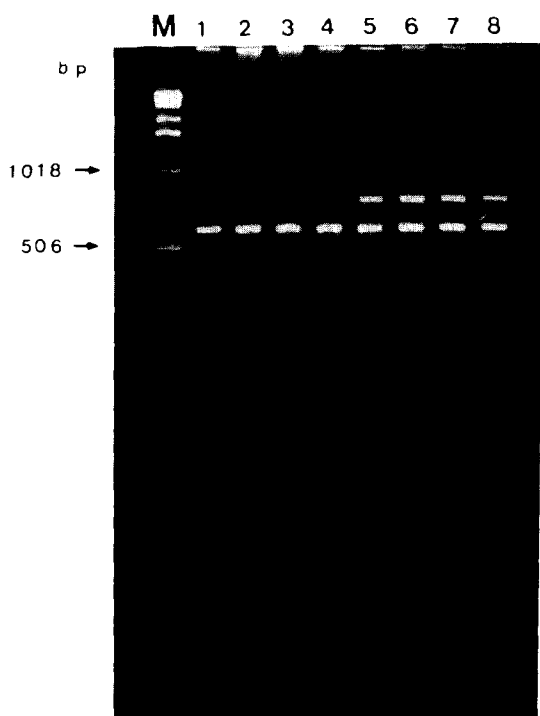


Fig 1. Detection of virulence genes of *Bacillus anthracis* from soils experimentally inoculated with *B anthracis* Sterne 34F2 and Korean isolates. DNAs were extracted from soils experimentally inoculated with *B anthracis* as described in materials and methods. Virulence genes of *B anthracis* were amplified by PCR under condition in the materials and methods and amplified DNAs were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Lane M : Molecular weight marker(1kb ladder), lanes 1 to 4; from soils inoculated with *B anthracis* Sterne 34F2, lanes 5 to 8; from soils inoculated with *B anthracis* Korean isolate.

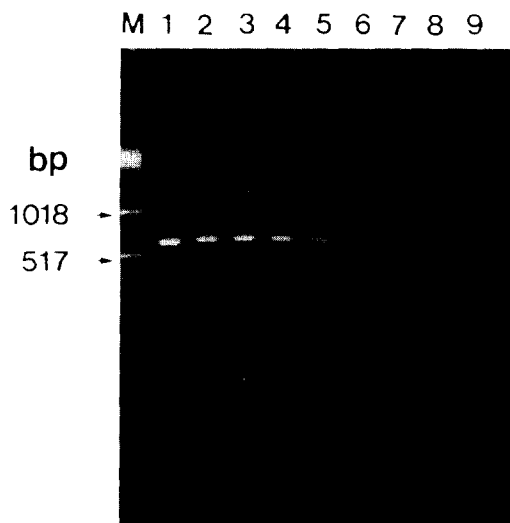


Fig 2. Sensitivity of the PCR to detect *Bacillus anthracis* from soils. DNAs were extracted from soils experimentally contaminated with serially diluted *B anthracis* Sterne 34F2 from  $4.2 \times 10^8$  to  $4.2 \times 10^1$  per gram of soil and PA gene was amplified by the PCR as described in materials and methods. Lane M : molecular weight marker(1kb ladder), lanes 1 to 9; reactions with DNA extracted from soils experimentally inoculated with  $4.2 \times 10^8$  to  $10^0$  CFU/ml of *B anthracis*.

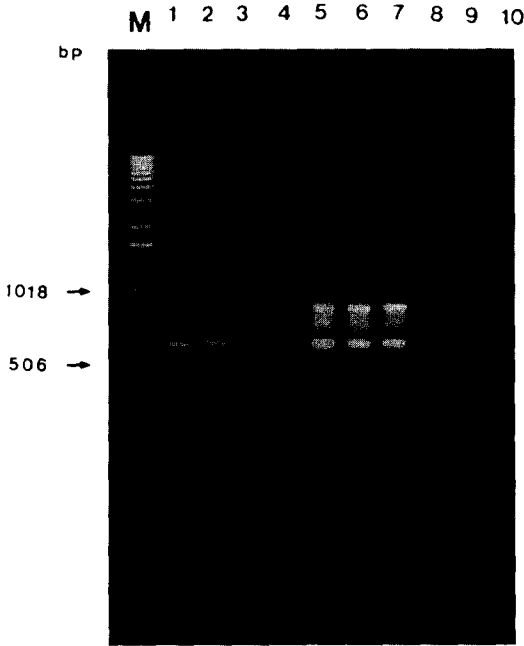


Fig 3. Detection of virulence genes of *Bacillus anthracis* from mice with or without experimental infection. Mice were experimentally infected with *B anthracis* 34F2 or Korean isolate and DNAs were extracted from spleen with or without experimental infection. Virulence genes of *B anthracis* were amplified by the PCR and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Lane M; Molecular weight marker(1kb ladder), lane 1 and 2; mice infected with *B anthracis* 34F2, lanes 5 to 7; mice infected with *B anthracis* Korean isolate, lanes 3, 4, 8, 9 and 10; mice without infection.

출할 수 있음을 나타내고 있다. PCR로 증폭된 유전자들을 제한효소들(*Hin* dIII, *Eco* RI, *Pst* I)로 분석함으로써 PA와 capsule 유전자가 특이적으로 증폭되었음을 확인할 수 있었다<sup>11</sup>(data not shown).

## 고 찰

탄저는 전세계적으로 발생하고 있는 중요한 인수공통 전염병중의 하나로 신속, 정확한 진단이 요구되는 전염성 질병이다<sup>1</sup>. 이러한 탄저의 최종적인 진단은 원인균의 분리, 동정을 원칙으로 하고 보조적인 방법으로 혈청학적인 진단방법을 이용해왔다<sup>1,6,9,10</sup>. 그러나 토양 등의 오염환경으로부터 탄저균의 분리동정은 환경중에 존재하

는 *Bacillus* spp.의 오염때문에 분리, 동정에 많은 난점을 가지고 있다. 탄저의 예방을 위하여는 철저한 백신접종과 함께 주위의 오염환경을 철저히 소독함으로써 토양 등 주위환경으로부터 원인체가 될 수 있는 탄저균이 숙주동물에 접촉하는 것을 차단하는 것이 매우 중요하다. 또한 이 질병은 병증이 매우 급성으로 진행되는 질병이기 때문에 고창증과 같이 이 질병과 유사한 병증으로 갑자기 폐사한 동물의 사체와 신속히 감별함으로써 폐사축 섭취에 의한 사람에서의 발병을 예방할 수 있는 방법의 강구가 필수적이다. 그러나 이방법은 위에서 언급한 바와 같이 주위의 유사균의 오염으로 인하여 이를 위한 새로운 진단법의 개발이 국내외적으로 계속 요구되어 왔다. 그러나 아직까지는 토양 등 오염환경으로부터 탄저균의 검출이나 또는 탄저균에 감염된 동물 또는 오염된 축산물들로부터 탄저균을 검색하기 위한 방법들이 잘 확립되어 있지 못하다. 이에 본 연구를 통해서 실험실에서의 탄저균의 신속한 동정을 위하여 개발된 PCR 기법<sup>11,12</sup>을 응용하여 토양 및 폐사동물의 장기로부터 탄저균을 검출할 수 있는 기법을 확립하였다.

토양중에는 수종의 토양균, 증균속 등 무기물 및 기타 여러가지 물질들이 혼재되어 있다. 이러한 물질들은 일반적으로 PCR과 같은 여러가지 효소작용을 기본으로 한 화학적 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>14,19</sup>. 또한 토양중에 존재할 수 있는 탄저균들은 대부분 아포상태로 존재하고 또한 그 숫자도 매우 적은 편이다. 그러므로 토양중에 오염되어 있는 탄저균의 검색을 위하여는 전처리가 요구된다. 즉, 이들 탄저균들만을 선택적으로 증균시키고 또한 균의 성장, 화학적 반응 등 여러가지 작용을 억제할 수 있는 물질들을 효율적으로 제거하는 것이다. 이에 본 연구에서는 토양중 탄저균의 분리를 위하여 전세계적으로 널리 사용되고 있는 방법인 선택배지를 이용하는 방법<sup>17</sup>을 응용하여 균의 분리를 시도하였고 또한 이를 기초로한 Beyer *et al*<sup>16</sup>의 방법에 준하여 PCR를 실시한 결과 공식균인 *B anthracis* Sterne 34F2와 *B anthracis* 국내분리주의 감염토양에서 각각 특이적으로 이들 균이 검색되었고 또한 그 민감도는 토양 gram당  $4.2 \times 10$  CFU의 농도로 오염시킨 토양에서 까지 탄저균을 검색할 수 있어서 매우 민감한 반응으로 생각된다. 토양중 탄저균을 검출하기 위한 시도는 무기물질들이 농후하게 오염된 tannery sites에서 수집한 토양에서 탄저균의 아포를 실험적으로 접종하고 검색한 결과 nested

PCR 기법에 의해서 토양 10g당 4개의 아포까지 검출할 수 있었다는 것<sup>16</sup>과 비교할 때 검출한계는 다소 낮았으나 이는 본 실험은 PCR를 한번 실시하는 direct PCR 기법을 적용하였고 또한 vegetative cell을 이용한 결과이기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 이러한 토양중 탄저균의 검출은 토양의 종류에 따라서 매우 많은 영향을 받을 것으로 보고되었다<sup>19</sup>. 본 실험에 추가하여 민감도를 증가시키기 위한 방법으로 nested PCR 기법을 확립하거나 전처리 방법을 개선하는 것이 추후의 과제로 요구된다. 그리고 토양의 종류에 따라서 탄저균의 증식 등이 많은 영향을 받기 때문에 국내의 토양의 분포도를 조사하고 여기에 따른 주요 토양의 종류에 따른 탄저균의 증식 및 검색기법의 민감도 등에 대한 실험이 보완되어야 될 것으로 사료된다. 실험감염된 mouse의 비장을 이용한 검색에서도 감염시킨 균주들의 종류에 따라서 이들 균주의 병원성 유전자가 특이적으로 검출되었으며, 비감염군에서는 이들 유전자가 검출되지 않았다. Makino *et al*<sup>18</sup>이 동물의 식육중에서 직접 탄저균을 검출하기 위하여 mouse의 혈액과 비장에 실험적으로 접종한 후 검색한 결과 lysis 방법으로는 10<sup>3</sup> SPU 이하까지 검색할 수 있는 방법으로 생각되는 PCR 기법을 이용하여 실험적으로 감염된 mouse의 혈액과 비장으로부터 탄저균을 검색할 수 있었다는 결과를 생각해볼 때에 본 실험을 통하여 확립된 PCR 기법이 식육중의 탄저균의 검색에도 효율적으로 응용될 수 있으며 또한 급성 폐사우의 경우 사체의 해부없이 자연공에 출혈된 적은 양의 혈액만으로도 탄저균을 검색할 수 있을 것으로 사료됨으로 사체해부에 따른 토양 등 환경의 오염을 효율적으로 예방할 수 있는 기법으로도 적용될 수 있을 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합해볼 때에 이 실험을 통하여 확립된 PCR 기법은 토양 등의 주위환경으로부터 탄저균의 검색이나 또한 감염동물의 장기 뿐만아니라 오염된 축산물로부터 직접 탄저균을 검색함으로써 효율적인 탄저의 예방에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

가축 뿐만 아니라 사람에서도 치명적인 인수공통전염병중 하나인 탄저를 효율적으로 예방하기 위하여 토양 및 감염동물의 장기로부터 직접 탄저균을 검색할 수 있는 기법을 확립하였다. 이 PCR 기법을 이용하여 실험적

으로 탄저균을 접종한 토양에서 특이적으로 탄저균을 검출할 수 있었으며, 이 기법의 민감도는 *B anthracis vegetative cell* 기준으로 토양 1g당 4.2×10<sup>3</sup> CFU의 균까지 검색할 수 있어서 매우 민감한 기법이었다. 또한 실험적으로 감염된 mouse의 비장으로 부터도 직접 탄저균을 검출할 수 있었다. 이상을 종합해볼 때에 본 연구를 통하여 확립된 PCR 기법은 토양 등 주위환경으로부터 신속하고, 특이적으로 균을 검출할 수 있을 뿐만아니라 감염동물의 장기로부터 직접균을 검출함으로써 탄저를 효율적으로 예방할 수 있는 방법중의 하나로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. 최철순. 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 병원성 분리균주와 약독균주(Pasteur No. 1, 2 및 Sterne 주) 간의 감별특성과 국내의 동물과 인체감염에 대한 전염병학적 고찰 : 1907-1989. 한국수의공중보건학회지, 13:137-147, 1989.
2. Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus*, Bergey's manual of systemic bacteriology. Vol. 2, pp.1105-1139. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME *et al*, Williams & Wikins, 1986.
3. Doyle RJ, Keller KF, Ezzell JW, *et al*. *Bacillus*. In : Lennette EH, Balows A, Hausler WJ *et al*. Manual of Clinical Microbiology 4th ed. Washington DC : American Society for Microbiology, 211, 1995.
4. Fujikura T. Current occurrence of anthrax in man and animals. *Proc Int Workshop on Anthrax, Salisbury Medical Bulletin-special supplement*, No. 68:1, 1989.
5. Williams DR, Reews GB, Rogers ME. Observational on am outbreak of anthrax in pigs in north Wales. *Vet Record*, 131:363-366, 1992.
6. 최철순, 박정문, 정상인 등. 탄저균의 협막형 균주의 전 균체항원에 대한 면역혈청을 이용한 Ouchterley 면역확산 시험에 의한 탄저균 및 유사 탄저균의 균종동정과 균주감별. 대한미생물학회지, 27:407-417, 1992.
7. Kim IJ, Ha GY, Cheong HK, *et al*. Isolation of *Bacillus anthracis* from patient blood. *J Kor Soc Microbiol*, 29:245-248, 1994.
8. Kim KJ, Hong SJ, Chung SI. Identification of *B an-*

- thraxis* isoalted from patients with acute septicemia in Kyungjoo city. *Chung-Ang Journal of Medicine* , 19: 265-277, 1994.
9. 최철순, 장호근, 강석 등. 단크론 항체를 이용한 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 동정. *대한미생물학회지*, 29:535-545, 1994.
  10. 조성근, 박정문, 최영길 등. 생화학 및 혈청학적인 기술에 의한 한국에서 분리된 탄저균의 특성. *대한미생물학회지*, 31:415-422, 1996.
  11. 이지연, 유한상, 전용수 등. 중합효소 연쇄반응을 이용한 탄저의 진단법 개발. *한국수의공중보건학회지*, 21:15-24, 1997.
  12. Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, et al. Specific oligonucleotide primers for rapid identification of *Bacillus anthracis* strains. *Proc Int Workshop on Anthrax, Salisbury Medical Bulletin-special supplement* , No. 87:45-46, 1995.
  13. Sjostedt A, Eriksson U, Ramisse 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* , No. 87:50, 1995.
  14. 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.
  15. Mikesell P, Ivins BE, Ristroph D, et al. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis* . *Infect Immun* , 39:371-376, 1983.
  16. Beyer W, Glockner P, Otto J, et al. A nested PCR method for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples collected from former tannery sites. *Microbiol Res* , 150:179-186, 1995.
  17. Bowen JE, Henderson I, Turnbull PCB. Selective systems for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental specimens. *Proc Int Workshop on Anthrax, Salisbury Medical Bulletin-special Supplement* , No. 87:40-42, 1995.
  18. Makino S, Yumiko I, Tsutomu M, et al. Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* , 31:547-551, 1993.
  19. 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.