

# ŞARBON BASİLLERİNİN FİLOGENETİK DAĞILIMI VE YAYGIN KLONLARI

Rıza DURMAZ

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE  
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, ANKARA  
rdurmaz@inonu.edu.tr

## ÖZET

Moleküler tiplendirme yöntemleri *Bacillus anthracis* suşları arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulması yanında herhangi bir toplum, bölge, ülke veya dünya genelindeki yaygın genotipik klonların dağılımı hakkında da oldukça yararlı bilgiler sunmaktadır. Şarbon basilinin moleküler tiplendirmesinde kullanılan çalışmalarda yaygın olarak genom ve plazmitler üzerinde bulunan çok sayıda lokus (multilocus, ML) üzerindeki farklı sayılarda sıralı tekrarlardan (variable number tandem repeat, VNTR) yararlanılmaktadır. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) olarak adlandırılan bu yöntemle dünyanın birçok yerinden bildirilmiş çalışmalar vardır. Ülkemizde bu konuda TÜBİTAK tarafından desteklenen bir proje ile şarbonun hiperendemik olarak görüldüğü illerdeki insan ve hayvan izolatlarının analizi yapılmaktadır. Bu yazıda, projenin ilk iki yıllık süreci içerisinde MLVA-25 yöntemiyle tiplendirmesi tamamlanan 190 *B.anthraxis* suşunun sonuçları verilmiştir. İncelemeye alınan suşların 84'ü insan, 101'i hayvan, beşi çevre izolatıdır. MLVA-25 tiplendirme sonucunda 190 suş arasında 64 farklı genotip saptanmıştır. İnsan şarbon olgularından elde edilen *B.anthraxis* suşları arasında aynı MLVA profili gösterenlerin oranı % 77.3, hayvan ve çevre izolatları arasındaki oran ise % 80.2 olarak bulunmuştur. Suşların 96'sı (% 50.5) genotip 43 olarak belirlenmiştir. Diğer iki yaygın tip; genotip 35 (32 suş) ve 27 (18 suş)'dir. Saptanmış olan genotiplerin, % 92.6'sı A3.a, % 11.1'i A1.b, % 1.6'sı A1.a majör kümeleri içerisinde yer almaktadır. B majör kümesinde hiçbir genotip saptanmamıştır. Bulgular, Türkiye'de insan ve hayvan şarbon olguları arasındaki çapraz bulaş derecesinin oldukça yüksek olduğunu ve ülkemizdeki genotiplerin dünya genelinde yaygın olan A majör kümesi içerisinde yer aldığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Bacillus anthracis*, genotip, klon, MLVA tiplendirme

## SUMMARY

### Phylogenetic Distribution of Anthrax Bacilli and Common Clones

Molecular typing methods can be used to determine clonal relationship among the *Bacillus anthracis* isolates, and additionally they can provide very useful data regarding to distribution of predominant genetic clone in a population, region, and country or all over the world. The studies used on molecular typing of anthrax bacilli are commonly based on the variable number tandem repeats (VNTR) located in multiple loci (ML) in chromosome and plasmids. There are many researches used MLVA method for typing of *B.anthraxis* isolates from different regions of the world. In our country, a project supported by TÜBİTAK has been continued to analyze animal and human *B.anthraxis* isolates collected from the provinces in where anthrax is hyperendemic. MLVA-25 typing results of the 190 *B.anthraxis* isolates analyzed in a two-years period of this project was presented in this report. Of the 190 isolates analyzed in this period 84 were isolated from human, 101 from animals and five from environment. MLVA-25 yielded 64 different genotypes among the 190 isolates; 37 genotypes were unique observed only one isolate each, the remaining 27 included 2-41 isolates showing identical MLVA profile. The rate of isolates showing identical MLVA-25 profile among the isolates of human, and animals and environment were 77.3 % and 80.2 %, respectively. According to the results of MLVA-8, 13 genotypes were determined among the 190 isolates. Genotype 43 was the most common type observed in 96 (50.5 %) isolates. The other two common types were genotype 35 (32 isolates) and genotype 27 (18 isolates). Major cluster A3.a was the predominant cluster including 92.6 % of the isolates followed by A1.b (11.1 %), and A1.a (1.6 %). There was no isolate identified in B cluster. The findings of the current study indicated that cross-transmission rate among the animal and human anthrax cases in Turkey was very high and genotypes found in our country were in A major cluster predominately observed over the world.

**Keywords:** *Bacillus anthracis*, clone, genotype, MLVA typing

Şarbonla mücadelede en etkili yol insan ve hayvanlardaki hastalık etkeni *Bacillus anthracis* suşlarının kaynağının saptanması ve etkin kontrol programlarının uygulanması ile mümkün olmaktadır. Şarbonun laboratuvar tanısı ve antibiyotiklere duyarlılıkların belirlenmesinde fenotipik yöntemler oldukça iyi sonuçlar vermektedir. Ancak, olgular arasındaki epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesinde moleküler tiplendirme yöntemlerine gereksinim vardır. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle farklı hastalar ile çevre ve/veya hayvan izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişki doğrulanabilmekte ve bir ülkede görülen majör genotipik klonlar belirlenerek, ülkedeki kökenlerin orijini hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Klonal ilişkinin ortaya konulmasıyla majör klonların ne kadar insan veya hayvanı etkileyebildiği yanında, bu klonun kaç yıldan beri devamlılığını koruduğu da belirlenebilmektedir. Şarbon açısından kaynak görevi olabilecek toprak, ot veya meraların kontaminasyon durumu araştırılabilmektedir. Biyolojik silah olarak kullanılacak olan şarbon sporlarının orijini ve bu sporlara maruz kalan kişilerin doğrulanması yapılabilmektedir. Buradan hareketle şarbon basilinun yayılma derecesi ve ortak klonların kaç yıllık süre içerisinde varlığını koruyabildiği hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir<sup>(3,8,11,13,16,18,19)</sup>.

### Moleküler yöntemler

*B.anthraxis* suşlarının genomik yapısındaki yüksek homojeniteden dolayı, birçok bakteride altın standart olan “pulsed-field gel electrophoresis” yönteminin ayırım gücü bu suşların tiplendirilmesinde yetersiz kalmaktadır<sup>(6,21)</sup>. Bunun yerine polimeraz zincir reaksiyon (PZR) bazlı yöntemlerden biri olan “amplified fragment length polymorphisms” (AFLP)<sup>(19)</sup> ve koruyucu antijeni kodlayan gen bölgesinin hedef alındığı baz dizi analizi çalışmalarına<sup>(15)</sup> yönelme olmuş, ancak bu çalışmalardan da arzu edilen yarar sağlanamamıştır. Suşlar arasındaki genetik ilişkiyi gösterebilecek yeni moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla geliştirilen yaklaşımlardan biri, çok sayıda lokustaki tekrarlayan gen bölgelerinin analizidir (multilocus variable number tandem repeat analysis, MLVA). MLVA’da kullanılan sıralı tekrarlar (tandem

repeats), satellitler arasında sınıflandırılmaktadır. Minisatellitler 6-100 baz çifti, mikrosatellitler ise 1-8 baz çifti uzunlukta<sup>(10)</sup>. Sıralı tekrarlar, genomik yapısı yüksek derecede korunmuş olan *B.anthraxis* suşlarının moleküler tiplendirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır<sup>(8,12,19)</sup>. İncelenen lokusların içerisindeki sıralı tekrarların sayısı suşlar arasında değişiklik gösterebilmekte ve buna bağlı olarak amplifiye edilen lokusun büyüklüğü değişmektedir. Sıralı tekrarların sayı farklılığı genellikle epidemiyolojik olarak ilişkisiz olan suşlarda gözlenmekte, aynı soydan gelen salgınla ilişkili olan suşlarda ise korunmaktadır. Dolayısıyla epidemik olarak ilişkisiz kaynaklardan üretilmiş olan izolatların lokusları büyüklük ve sıralı tekrar sayısı bakımından farklılık göstermektedir<sup>(12)</sup>. MLVA yanında “single nucleotide polymorphism” (SNP) yöntemi de *B.anthraxis* suşları arasındaki genel epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymak için kullanılmaktadır<sup>(17)</sup>. Diğer yeni bir tiplendirme yöntemi olan “single nucleotide repeats” (SNR) analizi ise salgınla veya epidemiyolojiyle ilişkili izolatların ayrıntılı analizleri için kullanılmakta ve bu yöntemle MLVA’nın ortak olarak bulunduğu epidemik suşlar alttıplere ayrılabilir<sup>(4,9)</sup>. SNR yöntemi biyoterörizm ilişkili salgınların analizinde ve kaynağın saptanmasında oldukça yararlı bilgiler sağlayabilmektedir<sup>(4)</sup>.

*B.anthraxis* için yapılan ilk çok lokuslu “variable number tandem repeat” (VNTR) analizi, sekiz lokuslu MLVA (MLVA-8)’dir. MLVA-8; altısı kromozomal (vrrA, vrrB1, vrrB2, vrrC1, vrrC2, GG3), ikisi plazmit (pXO1, pXO2) olmak üzere toplam sekiz lokus içermektedir<sup>(7)</sup>. Ancak, MLVA-8’in ayırım gücünün yetersizliği kısa sürede anlaşılmış ve incelenen lokus sayısı yirmi beşe (MLVA-25) çıkarılmıştır. MLVA-25 içerisinde CG3, bams44, bams3, vrrB2, bams5, bams15, bams1, vrrC1, bams13, vrrB1, bams28, vrrC2, bams53, bams31, vrrA, bams25, bams21, bams34, bams24, bams51, bams22, bams23, bams30, pXO1, pXO2 lokusları yer almaktadır<sup>(16)</sup>. Sekizli MLVA yönteminde amplifiye edilen lokus büyüklüklerinin görüntülenmesinde agaroz jel elektroforezi yeterli olurken, MLVA-25 yönteminde kapiller jel elektroforezi ve multipleks polimeraz zincir reaksiyon uygulamalarına gereksinim duyulmaktadır. MLVA-25, *B.anthraxis*’in

bölgesel genotiplerini belirlemenin yanında, dünyadaki farklı genotiplerin tanımlanması da sağlayan geçerli bir yöntemdir. Bu yöntemle saptanan genotiplerin daha önce saptanmış olanlarla mukayesesi yapılarak suşların coğrafik dağılımı ve orijini hakkında bilgi almak mümkün olabilmektedir.

### Yapılmış çalışmalar

MLVA-25 moleküler tiplendirme yöntemi kullanılarak değişik ülkelerdeki hayvan ve insan izolatlarının analizleri üzerine çalışmalar devam etmektedir. Çalışmalar, şarbon basillerinin majör belirli genotiplerinin olduğunu ve bu tiplerin coğrafik bölgelere özgü dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur<sup>(13,16,18)</sup>. İtalya'da 2004 yazında 41 epidemiy gözlenmiş ve farklı alanlardan 124 hayvan etkilenmiştir. Epidemiy süresince toplam 53 izolat MLVA-25 ile tiplendirildiğinde suşların tamamının tek bir genotipte olduğu gösterilmiştir. Aynı suşlar SNR analizi yöntemiyle incelendiğinde beş farklı altgenotip saptanmıştır<sup>(9)</sup>. Çin'de 1033 *B.anthraxis* suşu SNP yöntemiyle incelendiğinde üç majör familya (lineage) ve 12 altfamilya (sub-lineages) saptanmıştır<sup>(17)</sup>. Bu majör gruplardan birinin (A familyası) dünyada yaygın halde olduğu ve modern şarbonun coğrafik dağılımına temel oluşturduğu gösterilmiştir. Suşlardan 191 tanesi MLVA ile incelendiğinde her bir SNP içerisindeki suşların rezolüsyonunun arttığı kaydedilmiştir<sup>(17)</sup>. Davul halayına katılan 24 yaşındaki bir kadında barsak şarbonu geliyor. Davuldan ve altı çevre örneğinden *B.anthraxis* üretiliyor. MLVA-8 ile yapılan tiplendirme sonucunda hastanın izolatı ile çevreden üretilen altı suşun aynı klonlardan oldukları doğrulanıyor<sup>(3)</sup>. Polonya'da yapılan çalışmada laboratuvar suşları ile Sterne 34F2A aşısı suşunun klonal benzerliği araştırılmış ve laboratuvar suşlarının aşısı suşundan farklı MLVA profili sergilediği gösterilmiştir<sup>(5)</sup>.

Keim ve ark.<sup>(7)</sup> tarafından 2000 yılında yapılan çok uluslu çalışmada 426 *B.anthraxis* suşunun MLVA-8 tiplendirmesi sonucunda 89 farklı genotip tanımlanmıştır. Bu genotipler altı majör küme (A1, A2, A3, A4, B1, B2) içinde gruplandırılmıştır. A kümesi dünya genelinde yayılım gösterirken, B kümesinde yer alan B1 baskın olarak Güney Afrika'da, B2 ise Avrupa'da

görülmektedir. A kümesindeki dört alt kümeden biri olan A1, dünya genelinde dağılım göstermektedir, ancak Kuzey Amerika'nın batı kısmında daha baskındır. A2, Pakistan'da saptanmış olan tek bir genotipi bulundurmaktadır. A3 kümesi dünyanın birçok yerinde gözlenen, predominant genotipleri içermektedir. A4 kümesi Asya, Avrupa ve Amerika'da dağınık olan genotipleri kapsamaktadır<sup>(7)</sup>. İsviçre'de yapılan çalışmada insan izolatlarında yaygın olarak A4 kümesi saptanırken, hayvan kaynaklı suşlarda B2 kümesi bulunmuştur<sup>(14)</sup>. Bulgaristan'da 1960-1980 yılları arasında çoğunlukla ülkenin kuzey ve kuzey-batısında topraktan izole edilmiş olan 40 *B.anthraxis* izolatının yoğun olarak A1.a kümesi içerisinde yer aldığı gösterilmiştir<sup>(2)</sup>. Buna tezat olarak Bulgaristan'ın güney ve doğusu, Gürcistan, Türkiye ve İran izolatlarının Güney Kafkasya A3.a kümesi içerisinde dağılım gösterdikleri belirtilmiştir. Arnavutluk, Macaristan ve İtalya'dan izole edilen suşlar, Bulgaristan'ın batısındaki izolatlarla benzer olarak A1.a kümesi içerisinde yer almaktadır<sup>(2)</sup>. İtalya ve Fransa'dan toplanmış olan 160 *B.anthraxis* suşunun MLVA-8 ile tiplendirilmesi sonucunda suşların büyük bir çoğunluğunun A1.a kümesi içerisinde yer aldığı kaydedilmiştir<sup>(21)</sup>. Kazakistan'da 1937-2005 yıllarında çoğunluğu insandan izole edilmiş 93 *B.anthraxis* suşu MLVA-8 ile tiplendirildiğinde 88 suşun genotipi saptanabilmiştir. Saptanan genotiplerin 78'i (% 88.6) A1.a, 6'sı (% 6.8) A3.b, 2'si (% 2.3) A4 kümeleri içerisinde tanımlanmıştır<sup>(1)</sup>. Gürcistan'da insan ve hayvanlardan izole edilmiş 18 *B.anthraxis* suşunun MLVA-8 ile tiplendirilmesi sonucunda üç genotip saptanmış ve bunların tamamının A3.a majör kümesi içerisinde yer aldığı gösterilmiştir. Gürcistan'da saptanmış olan bu üç genotipten ikisinin Türkiye'de de bulunduğu göz önüne alınarak, "Güney Kafkasya-Türkiye" bölgesel suş paternine dikkat çekmişlerdir<sup>(13)</sup>.

MLVA-15 kullanılarak 42 farklı ülkeden toplanan 1033 *B.anthraxis* suşunun tiplendirilmesinde A, B ve C olarak üç majör genotipik familya ve 12 alt familya veya alt grup (A'da 8, B'de 3 ve C'de 1) ve 221 özgü profil saptanmıştır<sup>(20)</sup>. A familyası oldukça geniş yayılım gösterirken (genotiplerin % 89.6'sını içermekte), B (% 10) ve C (% 0.4) ise sınırlı alanlarda yayılım göster-

miştir. Yaygın dağılım gösteren A familyasındaki izolatların daha fazla çoğalabilen, olumsuz çevresel koşullara daha dayanıklı ve uzak mesafelere yayılabilen karakterde olduğu, buna karşın diğer familya içindeki genotiplerin ise yayılımının sınırlı olduğu belirtilmiştir<sup>(20)</sup>.

### Ülkemizdeki çalışmalar

Ülkemizde *B.anthraxis* suşlarının moleküler tiplendirilmesine yönelik olarak TÜBİTAK tarafından desteklenen bir proje yürütülmektedir. Projenin ilk iki yıllık süreci içerisinde toplam 190 suşa ait laboratuvar çalışmaları tamamlanmıştır. Suşların 84 tanesi (% 44.2) insan, 101 tanesi (% 53.2) hayvan, beş tanesi (% 2.6) çevre izolatıdır. Suşlar yoğunlukla şarbonun hiperendemik olduğu Kuzey-Doğu Anadolu illerinden alınmıştır. MLVA-25 tiplendirme sonucunda 190 suş arasında 64 farklı genotip saptanmıştır. Genotiplerden 37'si yalnızca birer suşta gözlenirken, 27 genotipten her biri 2-41 arasında değişen sayıda aynı MLVA profili gösteren suş içermektedir. İnsan izolatları arasında 37, hayvan ve çevre izolatları arasında 34 farklı genotip saptanmıştır. İnsan şarbon olguları arasında ortak genotipik profil gösteren suşların oranı (bulaş oranı) % 77.3, hayvan ve çevre izolatları arasındaki bulaş oranı ise % 80.2 olarak belirlenmiştir. Aynı küme içerisinde yer alan suşların ayrıntılı analizi yapıldığında, bulaşın belirli bir il veya sınırlı bir zaman periyodu içerisinde kalmadığı ve ayrıca hayvanlar arasında olduğu gibi hayvanlarla insanlar arasında ortak klonal gelen suşların olduğu da görülmüştür.

MLVA-8 tiplendirme sonucu esas alınarak yapılan değerlendirmede 190 suş arasından 13 farklı MLVA tipi belirlenmiştir. Saptanan genotiplerin tamamı Keim ve ark.<sup>(7)</sup>'nin 2000 yılında tanımlamış oldukları genotipler içerisinde yer almaktadır. Suşların yarıya yakını (96 suş) genotip 43 olarak tanımlanmıştır. Bu genotip daha önce Türkiye'den incelenen suşlarda gözlenmiştir. Diğer iki yaygın tip; genotip 35 (32 suş) ve 27 (18 suş)'dir. Genotip 35 Türkiye, Nabivya, İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde; genotip 27 ise Norveç'te bulunmuştur<sup>(7)</sup>.

Bu çalışmada saptanmış olan genotiplerin, altı majör *B.anthraxis* kümesi içerisindeki dağılımına bakıldığında; suşların % 92.6'sı A3.a, % 11.1'i

A1b, % 1.6'sı A1.a majör kümeleri içerisinde yer almaktadır. B majör kümesinde hiçbir genotip saptanmamıştır. Bulgular, Türkiye'de insan ve hayvan şarbon olguları arasındaki çapraz bulaş derecesinin oldukça yüksek olduğunu ve ülkemizdeki genotiplerin dünya genelinde yaygın olan A majör kümesi içerisinde yer aldığını göstermektedir.

**Teşekkür:** Bu sunumdaki Türkiye verileri TÜBİTAK tarafından desteklenen ve Durmaz R, Doğanay M, Sahin M, Perçin D, Özkurt Z, Karahocagil MK, Kayabaş Ü, Otlu B, Ertek M tarafından yürütülmekte olan 108S164 nolu "Türkiye'de Şarbon Yönünden Hiperendemik Bölgelerde *Bacillus anthracis* Enfeksiyonunun Moleküler Epidemiyolojisi ve İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi" başlıklı projenin 2 yıllık laboratuvar sonuçlarını içermektedir.

### KAYNAKLAR

1. Aikembayev AM, Lukhnova L, Temiraliyeva G et al. Historical distribution and molecular diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan, *Emerg Infect Dis* 2010;16(5):789-96.
2. Antwerpen M, Ilin D, Georgieva E, Meyer H, Savov E, Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; Jan 30 [Epub ahead of print].
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Gastrointestinal anthrax after an animal-hide drumming event - New Hampshire and Massachusetts, 2009, *Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59(28):872-7.
4. Garofolo G, Ciammaruconi A, Fasanella A et al. SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic, *BMC Vet Res* 2010;6:11. doi:10.1186/1746-6148-6-11.
5. Gierczynski R, Jakubczak A, Jagielski M. Extended multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated in Poland, *Pol J Microbiol* 2009;58(1):3-7.
6. Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species, *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1847-50.
7. Keim P, Price LB, Klevytska AM et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*, *J Bacteriol* 2000;182(10):2928-36.
8. Keim P, van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh

- LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales, *Infect Genet Evol* 2004;4(3):205-13.
9. Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S. Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species, *J Clin Microbiol* 2010;48(8):2821-9.
  10. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*, *BMC Microbiol* 2001;1:2 [Epub 2001, March 30].
  11. Lewerin SS, Elvander M, Westermark T et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd-1st case in 27 years: Case report, *Acta Vet Scand* 2010;52:7. doi.10.1186/1751-0147-52-7.
  12. Lista F, Faggioni G, Valjevac S et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis, *BMC Microbiol* 2006;6:33. doi.10.1186/1471/2180-6-33.
  13. Merabishvili M, Natidze M, Riggava S et al. Diversity of *Bacillus anthracis* strains in Georgia and of vaccine strains from the former Soviet Union, *Appl Environ Microbiol* 2006;72(8):5631-6.
  14. Pilo P, Perreten V, Frey J. Molecular epidemiology of *Bacillus anthracis*: determining the correct origin, *Appl Environ Microbiol* 2008;74(9):2928-31.
  15. Price LB, Hugh-Jones ME, Jackson PJ, Keim P. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*, *J Bacteriol* 1999;181(8):2358-62.
  16. Ryu C, Lee K, Hawng HJ, Yoo CK, Seong WK, Oh HB. Molecular characterization of Korean *Bacillus anthracis* isolates by amplified fragment length polymorphism analysis and multilocus variable-number tandem repeat analysis, *Appl Environ Microbiol* 2005;71(8):4664-71.
  17. Simonson TS, Okinaka RT, Wang B et al. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages, *BMC Microbiol* 2009;9:71.
  18. Sue D, Marston CK, Hoffmaster AR, Wilkins PP. Genetic diversity in *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988), *J Clin Microbiol* 2007;45(6):1777-82.
  19. Valjevac S, Hilaire V, Lisanti O et al. Comparison of minisatellite polymorphisms in the *Bacillus cereus* complex: a simple assay for large-scale screening and identification of strains most closely related to *Bacillus anthracis*, *Appl Environ Microbiol* 2005;71(11):6613-23.
  20. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*, *PLoS One* 2007;2(5):e461. doi.10.1371/journal.pone.0000461.
  21. Zhong W, Shou Y, Yoshida TM, Marrone BL. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis, *Appl Environ Microbiol* 2007;73(10):3446-9.