


***Bacillus anthracis*'in ANALİZDE KULLANILAN GENETİK VE FİLOGENETİK YÖNTEMLER**

Nuray ŞAHİN^{1, a*}

¹ Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Kırıkkale, Türkiye

*Corresponding Author:
E-mail: nurayshn2016@gmail.com

(Received 10th May 2023; accepted 14th September 2023)

a:  ORCID 0000-0001-6866-1348

ÖZET. *Bacillus anthracis* başta ruminantlar olmak üzere birçok hayvan türünü ve insanları da etkileyen zoonotik karaktere sahip, gram pozitif sporlu bir bakteridir. *B. anthracis* sporlarının biyoterörizm ajanı olarak kullanılma potansiyeli virülansının moleküler mekanizmalarını ve suşlarının filogenetik olarak izlenmesi için adli yöntemlerin araştırılmasını kuvvetle teşvik etmiştir. Son yıllarda moleküler tiplendirme yöntemlerin geliştirilmesi, bakterini coğrafi kaynağının tespit edilmesi ve bakterideki genetik polimorfizmlerin kapsamlı bir şekilde araştırılması sağlanmıştır. Bu çalışmada *B. anthracis*'in genel bilgilerin yanında, bakterinin moleküler tiplendirme yöntemlerinden ve yapılan çalışmalardan bahis edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus anthracis*, biyoterörizm, MLVA tiplendirme

***Bacillus anthracis*' of METHODS USED IN GENETIC AND PHYLOGENETIC ANALYSIS**

ABSTRACT. *B. anthracis* is a gram-positive spore-forming bacterium with zoonotic character that affects many animal species, especially ruminants, and humans. The potential for use of *B. anthracis* spores as a bioterrorism agent has strongly encouraged the investigation of molecular mechanisms of its virulence and forensic methods for phylogenetic monitoring of strains. In recent years, the development of molecular typing methods, the determination of the geographical source of the bacterium and the comprehensive investigation of genetic polymorphisms in bacteria have been provided. In this study, besides general information about *B. anthracis*, molecular typing methods of bacterim and studies are mentioned.

Keywords: *Bacillus anthracis*, bioterrorism, MLVA typing

GİRİŞ

Bacillus anthracis, sporlu gram pozitif bir bakteridir. Uzun bir geçmişe ve geniş coğrafi dağılıma sahip *B. anthracis* başta ruminantlar olmak üzere birçok hayvan türünü ve insanları da etkileyen zoonotik karaktere sahiptir.

Hastalık dünya çapında endemiktir; ancak sıkı eradikasyon önlemlerinin alındığı ve uygulandığı ülkelerde düzensiz olarak ortaya çıkar. *B. anthracis*'in en önemli biyolojik özelliği, vejetatif faz ile spor faz arasındaki değişimidir. Bu bakteri temel olarak doğada, metabolik olarak uykuda olduğu spor olarak bulunur. 20-40 nesli kapsadığı tahmin edilen üreme sikluslarına sahiptir. Uzun süre spor olarak doğada bulunması nedeniyle, bu patojen benzer jenerasyon sürelerine sahip diğer bakterilerin aksine, çok yavaş gelişir. Bu nedenle, *B. anthracis* genetik ve fenotipik olarak aşırı homojendir [1]. Serolojik, biyokimyasal testler ve faj gibi geleneksel yöntemler suşları ayırt etmekte uygun değildir. *B. anthracis* sporlarının biyoterörizm ajanı olarak kullanılma potansiyeli virülansının moleküler mekanizmalarını ve suşlarının filogenetik olarak izlenmesi için adli yöntemlerin araştırılmasını kuvvetle teşvik etmiştir. Son yıllarda tüm genom dizileme teknolojilerinin geliştirilmesiyle, genetik polimorfizmlerin kapsamlı bir şekilde araştırılması sağlanmıştır [2].

Etiyoloji

B. anthracis aerobik, gram pozitif, hareketsiz, non- hemolitik, endospor oluşturan, kanlı agar da hızlı üreyen çomak şeklinde bir zoonotik karakterli bakteridir [3]. R- tipindeki kolonileri meduza başı ya da kuyruklu yıldız şeklinde görülür [4]. *B. anthracis* doğada spor şeklinde enfekte dokuda ise vejetatif formda tek, ikili ya da üçlü zincirler halinde bulunur [5]. İç içe geçmiş üç adet katmanı bulunan sporun temel görevi bakteri DNA'sını kararlı halde tutup korumaktır [6]. Vejetatif formu doğa koşullarına uzun süre dayanıklı olamamasına rağmen spor formunun bu dayanıklı yapısı bakterinin uzun süre doğada infektivitesini korumasını sağlamaktadır [7].

B. anthracis'in iki patojenik plazmidi vardır ve virülans özellikler pX01(virulent olmayan) ve pX02(virulent) plazmitleri tarafından stimüle edilmektedir. pX02 plazmidinin kodladığı antifagositik PGA(poly- γ -D- glutamic acid) kapsül, pX01 plazmidi ise kodladığı iki ekzotoksin olmak üzere iki adet virülans faktörü vardır. pX01 plazmidi, ödem faktörü (EF), koruyucu antijen (PA), ve letal faktör (LF) olmak üzere biyolojik olarak her biri inaktif olan üç bileşeni kodlar. PA ile EF birleştiğinde hücre içi siklik AMP seviyesini artıran ödem toksinini oluşturur. Artan AMP seviyesi sıvı ve elektrolit kaybına ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. PA ile LF birleşimi ise protein kinazları inaktive eden ve sinyal iletimini bozan letal toksini oluşturur [8, 9, 10].

Epidemiyoloji

Dünya genelinde prevalansı gittikçe azalan infeksiyöz hastalıklardan biri olan Anthrax birçok sıcak kanlı hayvanı etkileyen zoonoz hastalıktır. Fakat henüz dünya genelinden sporlarının doğada infektivitesini uzun yıllar koruması nedeniyle tamamen eradike edilememiştir. Günümüzde, sporadik Anthrax vakaları tüm dünya kıtalarında ortaya çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde çok düşük seviyelerde görülmesine rağmen, aşılamanın

yetersiz olduğu birçok Asya ve Afrika ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir [11]. Afrika'da Gine Nijer, Çad, Zambiya ve Zimbabve'de, Asya'da Myanmar ve Tacikistan'da hiper endemiktir [12, 13]. İnsan ve hayvan Anthrax vakaları, Avrupa'da Türkiye, Yunanistan, Balkan ülkeleri, İtalya ve İspanya da dahil olmak üzere Akdeniz'e bitişik ülkelerde nispeten yaygındır. Ayrıca özellikle Kafkasya bölgesinde, Rusya Federasyonu'nda endemiktir. Ülkemizde ise Anthrax vakaları genelde sporadik özellikte olup bazı yörelerde ise endemik boyuta varmış durumdadır.

Anthrax, hayvanlar ile yakın teması olan veteriner hekimler, çobanlar, kasaplar ve çiftçiler için meslek hastalığıdır [14]. Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre Türkiye genelinde, 2007-2019 yılları arasında biri yabani hayvanda 1.332'si de çiftlik hayvanlarında, olmak üzere 1333 Anthrax mihrakı bildirilmiştir [15]. Anthrax mihrakları bu süre zarfında 2018 yılında 160 vaka ile zirveye ulaşmıştır. İl bazında hastalık vakaları sırası ile Erzurum, Kars, Ankara ve Ağrı'da daha sık görülmüştür. Fakat Türkiye'de hayvan ve insan Anthrax vakaları aşağı yukarı illerin tamamında yenileyen vakalar şeklinde endemiktir. Zaman zaman da bölgesel salgınlar halinde, hayvan ve insan sağlığı için önemli risk faktörü olarak güncel varlığını korumaktadır [16].

Biyoterörizm

Biyoterörizm; biyolojik savaş ajanlarının savunmasız ve hazırlıksız topluluklarda hastalık ve korku oluşturmak amaçlarıyla kullanılmasıdır [17]. Biyoterörizm ajanları doğrudan insan hayatını tehdit edebileceği gibi insan yaşamı için gerekli olan bitki ve hayvanları öldürerek insan hayatını ve yaşam koşullarını zorlaştırabilir. 180'den fazla patojenin biyoterör ajanı olarak kullanılabilirdiği rapor edilmiştir [18]. 1900'lu yılların başında Anthrax ile ilgili biyoterörizm kaynaklı enfeksiyonlar görülmüştür.

Birinci Dünya savaşı sırasında Almanya Anthrax'ı düşmanlarına at tedarik eden tarafsız ülkeler üzerinde biyo-silah olarak kullanmıştır [19]. Biyolojik silah ajanları CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından Kategori A, B, C olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Tablo 1), [20]. Grup A en yüksek risk grubu olarak değerlendirilirken, Grup B daha düşük hastalık oluşturma potansiyeli olan ajanlardan oluşurken Grup C'deki ajanlar ise gelecekte yüksek morbidite ve mortalite oluşturma potansiyeli olan etkenlerden oluşmaktadır [8]. *B. anthracis* A grubu tehdit unsuru etkenler arasında bulunmaktadır.

Tablo 1. *Biyolojik ajanların sınıflandırılması* [21]

Kategori	Biyolojik ajan	Hastalık
A	<i>Variola Major</i>	Çiçek
	<i>Bacillus anthracis</i>	Şarbon
	<i>Yersinia pestis</i>	Veba
	<i>Clostridium botulinum</i> (botulinum toksinleri)	Botulismus
	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemi
	Filovirüs ve Arena virüsler (Ebola virus, Lassa virus vb.)	Viral kanamalı ateşler
B	<i>Coxiella burnetii</i>	Q ateşi
	<i>Brucella</i> spp.	Bruselloz
	<i>Burkholderia mallei</i>	Ruam
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidoz
	Alpha virüsler (Venezuela ensefaliti, Doğu at ensefaliti, Batı at ensefaliti)	Ensefalit
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Tifüs
	<i>Chlamydia psittaci</i>	Psittakoz
	Toksinler (Risin, Stafilokokkal enterotoksin B)	Toksik sendromlar
	Gıda kaynaklı ajanlar (<i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> O157:H7)	
	Su kaynaklı ajanlar (<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i>)	
C	Nipah virus	Ensefalit
	Hantavirüsler	Hantapulmoner virüs sendrom
	Kene kaynaklı viral hemorajik ateşler	Kırım Kongo hemorajik ateş
	Falavi virüs	Sarıhumma
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Çoklu ilaç dirençli tüberküloz

“B. anthracis’in” Tiplendirme Yöntemleri

B. anthracis'in genetik tiplendirme çalışmalarının temel amacı, mihraklar arasındaki ilişkiyi ve suşlar arasında ilişkiyi belirlemek, bulaşma kaynaklarını araştırmak ve biyoterörizm ajanı olarak kullanılma potansiyelinin bulunması sebebiyle ülkelerin majör genotipik klonları bilinerek olası saldırılara hazırlıklı olmaktadır [12]. Aynı zamanda mikroorganizma DNA'sında meydana gelen mutasyonları ve değişimleri yakında

izlenebilir. *B. anthracis*'in olası bulaşma kaynaklarını araştırmak ve suşlar arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için tüm genom sekanslama, kanonik tek nükleotid polimorfizmleri (canSNP), Tek Nükleotid Polimorfizm, Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi ile SNP Ayrımı ve Çok Lokuslu Değişken-Sayı Tekrar Analizi (MLVA) kullanılmaktadır [22].

Tüm Genom Sekanslama

Son yıllarda, tüm genom dizileme (WGS), klinik mikrobiyolojide devrim yaratma potansiyeline sahip bir teknoloji olarak algılanmıştır. Bir hücrenin tüm genomik DNA sekansının tek bir zamanda analizi olup, genomun en kapsamlı karakterizasyonunu sağlar. Tüm genom sekanslaması yaparken önce polimeraz zincir reaksiyonu ile sekanslamak istediğimiz DNA'nın milyonlarca kopyası üretilir. Daha sonra floresans boyalar ile işaretlenmiş dideoksinüleotidler (ddNTP) kullanılarak zincir uzaması durdurulur. Burada önemli olan her bir nükleotid için kullanılan farklı ddNTP'lerin zincir uzamasının farklı noktalarda durduruyor olmasıdır. Elde edilen DNA parçaları jel elektroforezi ile elektrik yükü ve molekül büyüklüklerine göre ayrıştırılır. Floresan boyalar ile etiketlenen nükleotidler renklerine karşılık gelen harflerin bilgisayar ortamında art arda dizilmesiyle süreç sonlanır [23].

Tüm genom sekanslama verilerinin kullanılmasıyla *B. anthracis*'in yayılım haritalarının oluşturulmasını sağlamakta aynı zamanda mutasyonlar belirlenmekte [24] ve uluslararası epidemiyolojik önlem politikalarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır [25].

Tek Nükleotid Polimorfizm

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), bir tek nükleotidin bir diğerinin yerini almasıyla DNA da oluşan varyasyondur. Diğer polimorfizm türlerinden daha yaygın olduğu saptanmıştır. Genom boyunca 1000 bp'de bir frekansta meydana gelir. SNP'ler kodlanmış bir amino asiti değiştirebileceği gibi sessiz veya kodlama yapılmayan bölgelerde gerçekleşebilir. *B. anthracis*'lerin doğada kısa süre vejetatif formda bulunması ve SNP'lerin oldukça kararlı olması bu patojeni alt tiplere için SNP'leri ideal imzalar haline getirir [26].

Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi ile SNP Ayrımı

HRM yöntemi 1997 yılında real time PCR'dan geliştirilmiş genetik varyasyonları belirlemek için kullanılan ve DNA'nın erime kinetiğini belirlemek için geliştirilen bir yöntemdir. Kapalı tüp sisteminde gerçekleşen çift zincirli DNA sıcaklıkla ayrışır, boya salınır ve floresan azalır. Floresandaki bu azalış DNA'nın %50'sinin denatüre (Tm) olmasıyla hızla artar [27]. Her 2 saniyedeki 0,1-1,0°C sıcaklık artışına bağlı floresan sinyal değişiminin ölçüm ile erime eğrileri oluşturulur [28, 29].

Çoklu Lokus Değişken Analizi (MLVA)

B. anthracis yüksek homojen genoma sahip olması nedeniyle, birçok bakteride standart olarak kullanılan “pulsed-field gel electrophoresis” yönteminin suşların tiplendirilmesinde sağlıklı olarak kullanılamamaktadır [30, 31]. Suşlar arasındaki genetik ilişkiyi gösterebilen çok sayıda lokustaki tekrarlayan gen bölgelerinin analizi yöntemi geliştirilmiştir. (Multilocus variable number tandem repeat analysis, MLVA). MLVA, genomik yapısı yüksek derecede korunmuş olan *B. anthracis* suşlarının moleküler tiplendirmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır [32, 33, 34].

MLVA yanında “single nucleotid polymorphism” (SNP) yöntemi de *B. anthracis* suşları arasındaki genel epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymak için kullanılmaktadır [35]. *B. anthracis* suşları arasındaki genetik ilişkiyi gösterebilen MLVA8, MLVA15, MLVA20, MLVA25 ve MLVA31 geliştirilmiştir [15].

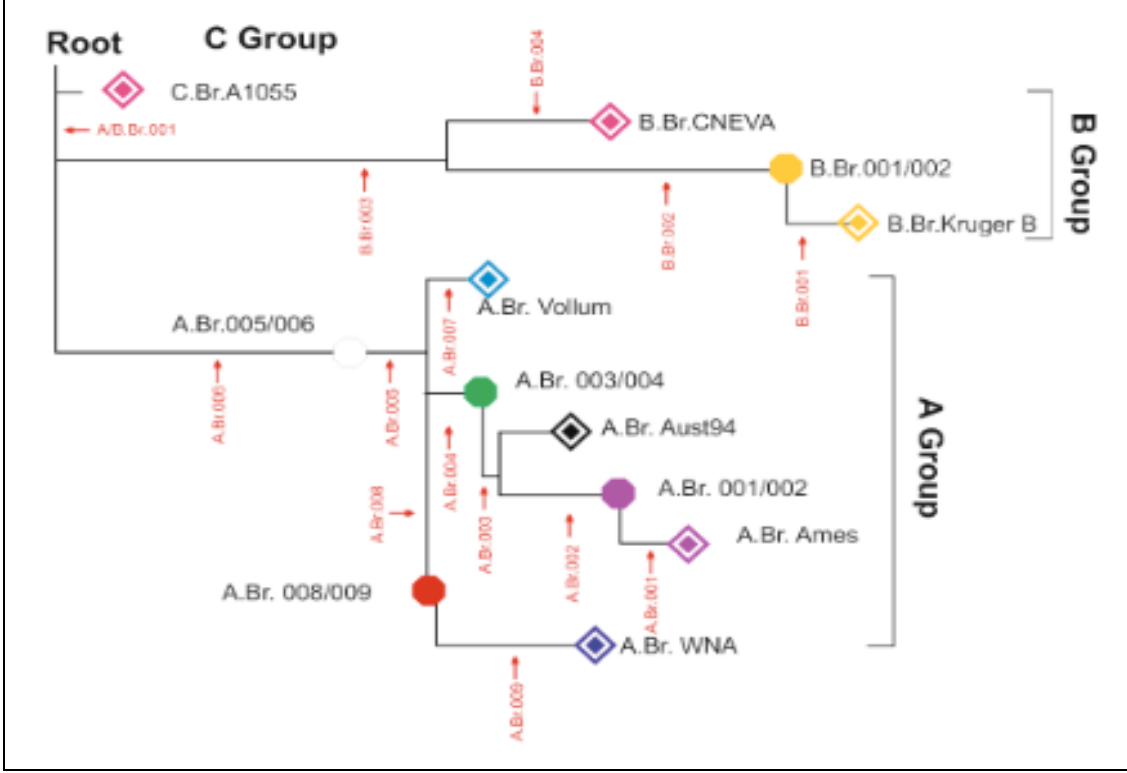
B. anthracis için yapılan ilk çok lokuslu analiz, sekiz lokuslu MLVA (MLVA-8)'dir. MLVA-8; altısı kromozomal (vrrA, vrrB1, vrrB2, vrrC1, vrrC2, GG3), ikisi plazmit (pXO1, pXO2) olmak üzere toplam sekiz lokus içermektedir [36]. Ancak MLVA-8'in ayırım gücünün yetersizliği kısa sürede anlaşılmış ve incelenen lokus sayısı önce on beşe (MLVA-15), yirmi (MLVA20), yirmi beşe (MLVA-25) ve en son otuz bire (MLVA-31) kadar çıkartılmıştır [37]. Bu yöntemle belirlenen genotiplerin daha önce belirlenmiş olanlarla kıyaslaması yapılarak suşların orijini ve coğrafik dağılımı belirlemek mümkün olabilmektedir [12].

Yapılmış Çalışmalar

B. anthracis sporları toprakta olduğu gibi çevrede de prolifer olmaksızın yıllarca kalabilir. Bu nedenle genomunda genetik sapmalar düşük orandadır. *B. anthracis* genetik ve fenotipik olarak aşırı homojen, monomorfik bir türü temsil eder. Bu nedenle klasik yöntemler *B. anthracis* suşlarını ayırt etmek için uygun değildir. 2016 yılında *B. anthracis*'nin filogenetik yapısı A, B ve C olmak üzere üç ana dala ayrılmıştır (Şekil 1). A ve A suşları tüm dünyada yaygın olarak dağılırken, B ve C daha dar bir coğrafi dağılım sergilemektedir. Bu gruplar şu ana kadar anahtar nokta mutasyonlar (canSNP) ile güçlü şekilde tanımlanmış 13 ayrı soya bölünür [38].

A sınıfı dünya çapında en dağınık dal olmasına rağmen, alt gruplar belirli coğrafi dağılım gösterir. A dizisi dört alt gruba ayrılmıştır: A.Br.005 /006, A.Br. Vollum, A. Br.010/008 ve A.Br.010/004 [26]. A.Br.005/006 grubu diğer alt grupların göre temeldir ve Afrika'da izole edilen suşları içerir [39, 40]. A.Br. Vollum Pakistan ve Afganistan'da baskın olarak görülse de geniş bir coğrafyada yayılmıştır [2]. A.Br. Vollum suşları, Batı Çin, Avrupa ve Kuzey Amerika ve dünyanın diğer bölgelerinden sıklıkla izole edilir [41, 42, 43]. A. Br. 008 Asya ve Avrupa'da geniş bir yayılım gösterirken Çin'de oldukça yaygındır. Avrupa'da A. Br. 008, 'Avrupa' kümesi B.Br.004 ile birlikte bulunur. Alt soy A.Br.014 Batı Çin, Türkiye ve Hindistan'da yaygınken, A.Br.081 Doğu ve Orta Çin'de daha yaygındır. A.Br.034 büyük ölçüde Güney Afrika ile sınırlı kalmıştır. Kuzey Amerika kıtasında izole edilen suşlar ağırlıklı olarak A. Br. 009'dır. A.Br.054 ise Güney

Amerika'da görülür. B ve C soyları sınırlı dağılım gösterir. C sadece Kuzey Amerika'da, B ise Avrupa ve Güney Afrika'da tespit edilmiştir [26].



Şekil 1. canSNP'lerine dayalı isimlendirmeyi özetleyen şematik *B. anthracis* filogenetik ağaç [26]

Keim ve ark. [36], 426 *B. anthracis* suşunu kullanarak yaptıkları çok uluslu çalışmada MVLA- 8 tiplendirmesi ile 89 farklı genotip tanımlanmışlardır. Bu genotipler A1, A2, A3, A4, B1, B2 olmak altı majör küme içinde tanımlanmıştır. A kümesi dünya genelinde, B kümesinde yer alan B1 baskın olarak Güney Afrika'da, B2 ise Avrupa'da yayılım göstermiştir. A kümesinin dört alt kümesinden biri olan A1 Kuzey Amerika'nın batı kısmında baskın olmak üzere dünya genelinde dağılım göstermektedir. A2 Pakistan'da görülürken A3 dünyanın birçok yerinde gözlenen predominant genotipleri içermektedir. A4 kümesi Avrupa Asya ve Amerika'da dağınık olan genotipleri kapsamaktadır.

2014 yılında Thierry ve ark. [15] Fransız Ulusal Referans Laboratuvarı izolatlarının karakterize etmek için MLVA31 uygulamışlardır. MLVA31 ile 130 suşu 35 genotipe ayırmışlardır.

Durmaz ve ark. [12], 1983-2011 yılları arasında Türkiye genelinde toplanan *B. anthracis* suşlarını MLVA-8 yöntemi ile analiz etmişler ve 12 genotip ortaya çıkarmışlardır. 12 genotipin hepsinin daha önce Keim ve arkadaşları tarafından belirlenen 89 genotiplerine karşılık geldiğini bulmuşlardır. MLVA25 analizi ile 251 *B. anthracis* izolatından sonucunda 33'ü sadece bir izolat olmak üzere 62 farklı genotip elde edilirken, geri kalan 29 genotip 2 - 43 izolat olmak üzere toplam 218 izolat (%86,9) bulunmuştur. Bu bulgular Türkiye'deki Anthrax vakalarında çok yüksek çapraz bulaşma oranlarına işaret etmektedir. Türkiye'de teşhis edilen genotipler A majör kümesinde yer almaktadır.

Demiraslan ve ark. [44] 2017 yılında yaptıkları çalışmada MLVA-8 tiplendirmesinde genotip 43 (4 izolat), genotip 33 (2 izolat), genotip 36 (1 izolat), genotip 40 (1 izolat) ve genotip 45 (1 izolat) olmak üzere beş farklı genotip gözlenmiş ve tüm genotiplerin A3.a majör kümesine ait olduğu tespit edilmiştir. MLVA-25 tiplemesi ile ise genotip 1 (3 izolat), genotip 2 (2 izolat) ve genotip 3-6 (her biri için 1 izolat) olmak üzere altı farklı genotip gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ortaya çıkan genotipler, Türkiye'de verilen için *B. anthracis* genotip ölçeği ile örtüşmektedir [44].

Türkiye ve Gürcistan'ın bazı bölgeleri de dahil olmak üzere Güney Kafkasya bölgesinde yaygın olarak bulunan *B. anthracis*'ler A.Br. Aust94 ve A.Br.008/009'u gruplarındandır. Şahin ve ark. [45], 2018 yılında yapıları çalışmada Kars ilinden toplanan suşlarda yeni SNP'ler keşfetmişler ve bu suşları ve coğrafi olarak ilişkili olduğu A anadalının Aust94 grubununa bağlı KafkasB- Geo 1-3 olarak adlandırdıkları üç yeni dalına keşfetmişlerdir.

Yalçın ve ark. [46], 2010- 2021 yılları arasında Türkiye'nin farklı yerlerinden izole edilen 114 *B. anthracis* suşunu MLVA- 31 yöntemi ile analiz etmişler ve Türkiye'deki Anthrax mihraklarının A, C1, C2 ve C3 olmak üzere 4 majör kümeye ait olduğunu ve 70 adet farklı genotipte olduklarını tespit etmişlerdir. Türkiye'de baskın kümenin C2 (%68,4), baskın genotipin ise G18 (%17,5) ve G21 (%6,4) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın diğer çalışmalarda farklı sonuç vermesi ise Türkiye'de iller arası hayvan hareketlerinin fazla olmasına ve her vakanın ihbar edilmemesi ile iller ve bölgeler arası çapraz kontaminasyon olduğuna bağlanmıştır.

SONUÇ

Suşların genetik ve filogenetik analizi coğrafi dağılımı ve *B. anthracis* 'in evrimi düzeyinde elde edilen bilgilerin ötesinde, türler arası çeşitliliği analiz etmek için geliştirilen moleküler araçlar, geriye dönük adli araştırmalar için değerlidir. Ayrıca vaka orjinli *B. anthracis* suşlarının filogenetik analizinin belirlenmesi epidemiyolojik açıdan moleküler epidemiyolojik çalışmaların ötesinde bulaşma kaynaklarının ortaya çıkarılmasında ortak kaynak epidemilerini aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Keim, P., Gruendike, J. M., Klevytska, A. M., Schupp, J. M., Challacombe, J., Okinaka, R. (2009): The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Molecular aspects of medicine*, 30(6): 397–405.
- [2] Derzelle, S., Girault, G., Roest, HJ ve Koene, M. (2015): Hollanda'da *Bacillus anthracis*'in Moleküler Çeşitliliği: Tüm Genom SNP Keşfini Kullanarak Dünya Çapındaki Nüfusla İlişkinin Araştırılması. *Enfeksiyon, Genetik ve Evrim*, 32: 370-376.
- [3] Salgado, J. R., Rabinovitch, L., Gomes, M. F. D. S., Allil, R. C. D. S., Werneck, M. M., Rodrigues, R. B., Picão, R. C., Oliveira Luiz, F. B., Vivoni, A. M. (2020): Detection of *Bacillus anthracis* and *Bacillus anthracis*-like spores in soil from state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115: e200370.
- [4] Kılıç, S., (2006): Biyolojik Silah Olarak Bakteriler: “Kategori A ajanlar”. *Türk Hij Den Biyol Derg.*,63(1): 21.
- [5] Öğütlü, A. (2012). Şarbon . *Journal of Experimental and Clinical Medicine* , 29 (3s) , 155-162 . DOI: 10.5835/jecm.omu.29.s3.011.
- [6] Demiraslan, H., Borlu, A., Şahin, S., Büyük, F., Karadağ, Y., Doğanay, M., Şahin, M. (2017): Türkiye, İç Anadolu'da Bir Köyde Şarbon Salgınının Epidemiyolojik Araştırılması ve Kontrolü. *Patojenler ve Küresel Sağlık*, 111 (4): 206-211.
- [7] Martin, G.J., Friedlander, A.M. (2010): *Bacillus anthracis* (Anthrax). In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th ed). Churchill Livingstone Elsevier Philadelphia, 2715-2725.
- [8] Bağdatlı, Y., Çeviker, K. (2009): Biyolojik Silahların Kişi, Toplum ve Ülke Açısından Değerlendirilmesi. *Kimyasal, Biyolojik, Radyolojik, Nükleer (Kbrn) Kongresi, İstanbul*
- [9] Baldari, C. T., Tonello, F., Paccani, S. R., Montecucco, C. (2006): Anthrax Toxins: A Paradigm of Bacterial Immune Suppression. *Trends Immunol*, 27: 434 - 440.
- [10] Sherer, K., Li, Y., Cui, X., Eichacker, P. Q. (2007): Lethal and edema toxins in the pathogenesis of *Bacillus anthracis* septic shock: implications for therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(3): 211–221.
- [11] Turnbull, P. C. B. (1998): *Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals, Third Edition. United States.*
- [12] Durmaz, R., Doğanay, M., Şahin, M., Percin, D., Karahocagil, M. K., Kayabas, U., Otlu, B., Karagöz, A., Büyük, F., Çelebi, O., Öztürk, Z., Ertek, M., Anthrax Study Group (2012): Molecular Epidemiology of the *Bacillus anthracis* Isolates Collected Throughout Turkey from 1983 to 2011. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(10): 2783–2790.
- [13] Janik, E., Ceremuga, M., Niemcewicz, M., Bijak, M. (2020): Dangerous Pathogens as a Potential Problem for Public Health. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(11): 591.
- [14] Eshraghi, B., Zarrin, Y., Fazel, M. (2020): Palpebral Anthrax, a Rare Though Important Condition in Villagers: A Case Report and Literature Review. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 99: 260–262.
- [15] Thierry, S., Tourterel, C., Le Flèche, P., Derzelle, S., Dekhil, N., Mendy, C., Colaneri, C., Vergnaud, G., Madani, N. (2014): Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PloS one*, 9(6): e95131.
- [16] Topluoğlu, S. (2020): Türkiye’de Şarbon Mevcut Durum Raporu. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77(2): 1-20.

- [17] Hüşan, U. H. (2010): Biyolojik Terör Riskine Karşı Tıbbi Müdahalenin Etkinliğinin İrdelenmesi ve Yerel Yanıtın Geliştirilmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Çanakkale.
- [18] Bossi, P., Garinb, D., Guihot, A., Gay, F., Crance, J.-M., Debordc, T., Autrand, B., Bricaire, F. (2006): Bioterrorism: Management of Major Biological Agents. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(19-20): 2196-2212.
- [19] Wheelis, M. (2002): Biological Warfare at the 1346 Siege of Caffa. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 971-975.
- [20] Şimşek, B. (2012): Biyoterörizm Ajanlarıyla Çalışırken Laboratuvarında Biyogüvenlik. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Biyogüvenlik. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği Yayınları, Ahmet C. Başustaoğlu ve Mustafa Güney (ed.), 288-302.
- [21] Serinken, M., Kutlu, S. S. (2009): Biyoterörizm ve Şarbon. *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 9(4): 185-190.
- [22] Liu, D. L., Wei, J. C., Chen, Q. L., Guo, X. J., Zhang, E. M., He, L., Liang, X. D., Ma, G. Z., Zhou, T. C., Yin, W. W., Liu, W., Liu, K., Shi, Y., Ji, J. J., Zhang, H. J., Ma, L., Zhang, F. X., Zhang, Z. K., Zhou, H., Yu, H. J., Li, W. (2017): Genetic source tracking of an anthrax outbreak in Shaanxi province, China. *Infectious diseases of poverty*, 6(1): 14.
- [23] Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A. (2011): Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (1), 11-18.
- [24] Gargis, A. S., McLaughlin, H. P., Conley, A. B., Lascols, C., Michel, P. A., Gee, J. E., Marston, C. K., Kolton, C. B., Rodriguez-R, L. M., Hoffmaster, A. R., Weigel, L. M., Sue, D. (2018): Analysis of Whole-Genome Sequences for the Prediction of Penicillin Resistance and β -Lactamase Activity in *Bacillus anthracis*. *mSystems*, 3(6): e00154-18.
- [25] Chiaverini, A., Abdel-Glil, M. Y., Linde, J., Galante, D., Rondinone, V., Fasanella, A., Cammà, C., D'Alterio, N., Garofolo, G., Tomaso, H. (2020): Whole Genome Sequencing for Studying *Bacillus anthracis* from an Outbreak in the Abruzzo Region of Italy. *Microorganisms*, 8(1): 87.
- [26] 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., Kachur, S. M., Leadem-Dougherty, R. R., Rhoton, S. D., Zinser, G., Farlow, J., Coker, P. R., Smith, K. L., Wang, B., Kenefic, L. J., Fraser-Liggett, C. M., Keim, P. (2007). Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PloS one*, 2(5), e461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>.
- [27] Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 245(2): 154–160.
- [28] Gundry, C. N., Bernard, P. S., Herrmann, M. G., Reed, G. H., Wittwer, C. T. (1999): Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes. *Genetic testing*, 3(4): 365–370.
- [29] Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., Elenitoba-Johnson, K. S. (2001): Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25: 430-42.
- [30] Harrell, L. J., Andersen, G. L., Wilson, K. H. (1995): Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *Journal of clinical microbiology*, 33(7): 1847–1850.
- [31] Zhong, W., Shou, Y., Yoshida, T. M., Marrone, B. L. (2007): Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 73(10): 3446-9.
- [32] Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., Hugh-Jones, M. E. (2000): Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology*, 182(10): 2928–2936.
- [33] Lista, F., Faggioni, G., Valjevac, S., Ciammaruconi, A., Vaissaire, J., le Doujet, C., Gorgé, O., De Santis, R., Carattoli, A., Ciervo, A., Fasanella, A., Orsini, F., D'Amelio, R., Pourcel, C., Cassone, A., Vergnaud, G. (2006): Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on

- automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC microbiology*, 6: 33.
- [34] Valjevac, S., Hilaire, V., Lisanti, O. (2005): 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*, 71(11): 6613-23.
- [35] Simonson, T. S., Okinaka, R.T., Wang, B. (2009): *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiol*, 9:71.
- [36] Keim, P., Van Ert, M. N., Pearson, T., Vogler, A. J., Huynh, L. Y., Wagner, D. M. (2004): Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 4(3): 205–213.
- [37] Derzelle, S., Aguilar-Bultet, L., Frey, J. (2016): Comparative Genomics of *Bacillus anthracis* From the Wool Industry Highlights Polymorphisms of Lineage A. *Br. Vullum. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 46: 50–58.
- [38] Pilo, P., Frey, J. (2018): Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 64: 115–125.
- [39] Girault, G., Blouin, Y., Vergnaud, G. and Derzelle, S. (2014): Fransa'da *Bacillus anthracis*'in yüksek verimli dizilimi: tüm genom SNP keşfini kullanarak genom çeşitliliğini ve popülasyon yapısını araştırmak. *BMC genomik*, 15 (1): 1-10.
- [40] Sahl, J. W., Pearson, T., Okinaka, R., Schupp, J. M., Gillece, J. D., Heaton, H., Birdsell, D., Hepp, C., Fofanov, V., Nosedo, R., Fasanella, A., Hoffmaster, A., Wagner, D. M., Keim, P. (2016): A *Bacillus anthracis* Genome Sequence from the Sverdlovsk 1979 Autopsy Specimens. *mBio*, 7(5): e01501-16.
- [41] Derzelle, S., Thierry, S. (2013): Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: Genotyping Methods in Forensic and Epidemiologic Investigations. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice and Science*, 11 (1): 166–176.
- [42] Pilo, P., Perreten, V., Frey, J. (2008): Molecular epidemiology of *Bacillus anthracis*: determining the correct origin. *Applied and environmental microbiology*, 74(9): 2928–2931.
- [43] Wattiau, P., Klee, S. R., Fretin, D., Van Hesse, M., Ménart, M., Franz, T., Imberechts, H. (2008): Aktif bir yün temizleme fabrikasında izole edilen *Bacillus anthracis* suşlarının oluşumu ve genetik çeşitliliği. *Uygulamalı ve Çevresel Mikrobiyoloji*, 74 (13): 4005-4011.
- [44] Demiraslan, H., Borlu, A., Şahin, S., Büyük, F., Karadağ, Y., Doğanay, M., Şahin, M. (2017): Türkiye, İç Anadolu'da Bir Köyde Şarbon Salgınının Epidemiyolojik Araştırılması ve Kontrolü. *Patojenler ve Küresel Sağlık*, 111 (4): 206-211.
- [45] Şahin, M., Büyük, F., Baillie, L., Wölfel, R., Kotorashvili, A., Rehn, A., Antwerpen, M., Grass, G. (2018): The identification of novel single nucleotide polymorphisms to assist in mapping the spread of *Bacillus anthracis* across the Southern Caucasus. *Sci Rep* 26, 8(1): 11254.
- [46] Yalçın, S. (2022): Türkiye'de insan ve hayvan orijinli *Bacillus anthracis* izolatlarının multiple locus variable-number tandem repeat analysis (mlva-31) ile moleküler karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye.