Application of RE-SNPs genotyping in phylogenic studies of Bacillus anthracis in Iran

M. Sekhavati* T. Naserpour Farivar** M. Esmaelizad*** K. Tadayon****

*M.Sc. Student of Medical Bacteriology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
**Professor of Medical Microbiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
***Assistant Professor of Molecular Genetics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
****Assistant Professor of Medical Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Abstract

Background: Although the single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping is now a standard method in the evolutionary and epidemiological studies of anthrax, but application of this technique is not possible in low-budget laboratories due to its sequence-based nature. Molecular epidemiologic studies of Bacillus anthracis play an important role in identifying and differentiating different strains during the bioterrorism-related outbreaks.

Objective: The aim of this study was to investigate the application of restriction enzymes in Van Ert SNPs typing.

Methods: This applied study was conducted in research & development laboratory of aerobic veterinary bacterial vaccines department in Razi Vaccine and Serum Research Institute during 2014. The corresponding genomic segments of the B. anthracis Sterne 34F2 strain were searched in order to identify appropriate restriction enzymes to digest SNPs loci. The accuracy of the results was confirmed by sequencing of the PCR products.

Findings: Of 13 studied loci, 3 were found to be available for restriction enzymes due to their target SNPs. Feasibility of this technique was examined through enzymatic treatment of a 560 bp-long PCR product including the A.Br004 SNP of the standard strain by BsmI. The PCR product was digested and was divided into 224 bp and 336 bp long fragments.

Conclusion: With regards to the results, it seems that the RE-SNPs typing as a simple method is appropriate for the van Ert genotyping of B. anthracis and resolves the need for expensive sequencing.

Keywords: Bacillus Anthracis, Phylogeny, Genotyping Techniques, DNA Restriction Enzymes
Citation: Sekhavati M, Naserpour Farivar T, Esmaelizad M, Tadayon K. Application of RE-SNPs genotyping in phylogenic studies of Bacillus anthracis in Iran. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 18 (6): 4-10.

Corresponding Address: Keyvan Tadayon, Department of Aerobic Veterinary Bacterial Vaccines Research and Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shahid Beheshti Blvd., Karaj, Iran
Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir
Tel: +98-26-34502892
Received: 26 May 2014
Accepted: 15 Sep 2014

Archive of SID

www.SID.ir

کاربرد روش RE-SNPs در مطالعه‌های فیلوژنی باسیلوس آنتراسیس در ایران

محمد سخاوتی* دکتر تقی ناصرپور فریور** دکتر مجید اسمعیلی‌زاد*** دکتر کیوان تدین****

* دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
** استاد میکروب‌شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
*** استادیار ژنتیک مولکولی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
**** استادیار میکروب‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: کرج، بلوار شهید بهشتی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تحقیق و تولید واکسن‌های هوازی دام‌پزشکی
تلفن ۳۴۵۰۲۸۹۲- ۰۲۶
Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۴

چکیده

زمینه: علی‌رغم این که امروزه SNP ژنوتایپینگ به عنوان روش استاندارد در مطالعه های تکاملی و همه‌گیرشناسی آنتراکس مطرح است، اما به دلیل نیاز به تعیین توالی در این روش، امکان اجرای آن در آزمایشگاه‌هایی که با محدودیت بودجه مواجه هستند، وجود ندارد.

هدف: مطالعه به منظور بررسی امکان استفاده از آنزیم‌های محدودکننده در اجرای سیستم SNP ژنوتایپینگ ون ارت (Van Ert) انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه کاربردی در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه تحقیق و توسعه بخش واکسن‌های هوازی دام‌پزشکی مؤسسه رازی کرج انجام شد. به منظور شناسایی آنزیم‌های محدودکننده مناسب جهت هضم لوکوس‌های SNP، قطعه‌های مربوطه بر روی ژنوم سویه 34F2 باسیلوس آنتراسیس بررسی شدند. صحت نتایج با استفاده از تعیین توالی محصولات PCR تأیید شد.

یافته‌ها: از میان ۱۳ لوکوس بررسی شده، ۳ لوکوس به واسطه نوع SNP خود، توسط آنزیم‌های محدودکننده قابل افتراق بودند. قطعه ۵۶۰ جفت بازی مربوط به لوکوس A.Br004 در سویه استاندارد و جدایه حاد تحت تأثیر آنزیم BsmI قرار داده شد که دو قطعه با اندازه‌های ۳۳۶ و ۲۲۴ جفت باز حاصل شد. در بررسی امکان اجرای روش، سویه استاندارد به واسطه نوع SNP خود توسط آنزیم شکسته شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها به نظر می‌رسد پس از تکمیل فرآیند تحقیق، RE-SNP تایپینگ روشی ساده و مناسب جهت اجرای سیستم ژنوتایپینگ ون ارت باشد و نیاز به انجام روش پرهزینه تعیین توالی مرتفع شود.

کلیدواژه‌ها: باسیلوس آنتراسیس، فیلوژنی، روش‌های ژنوتیپی، آنزیم‌های محدودکننده DNA

مقدمه:

آنتراکس از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده در تاریخ بشر است که سلامت آدمی را برای هزاران سال تهدید کرده است. پیشینه موارد مشکوک ابتلای انسان و دام به این بیماری در دست نوشته‌های زبان سانسکریت و همچنین در کتاب‌های مذهبی قدیمی نظیر تورات (Exodus) دیده می‌شود.[۱] انتشار جهانی آنتراکس از نظر جغرافیایی متأثر از فعالیت‌های دام‌پروری و مبادله تجاری دام و فرآورده های دامی است.[۲] امروزه باسیلوس آنتراسیس به عنوان مهلک‌ترین جنگ افزار زیست‌شناختی مطرح است. لذا توجه جامعه بین‌المللی در سال‌های اخیر به همه‌گیرشناسی آنتراکس افزایش یافته است.[۲] از نظر تکاملی، باسیلوس آنتراسیس میان تمام باکتری‌های

Archive of SID

www.SID.ir

پاتوژن کم‌ترین تغییرات ژنتیکی را دارد و به عنوان یک باکتری جوان محسوب می‌شود.[۳] با توجه به ماهیت کلونال و تفاوت‌های ژنتیکی بسیار محدود سویه‌های باسیلوس آنتراسیس، تنها روش‌های ژنتیکی دارای توانایی تشخیص افتراقی زیاد، قادر به شناسایی سویه‌های این پاتوژن هستند. پلی‌مورفیسم ناشی از واحدهای تکراری پشت سرهم (Tandem Repeat Polymorphism) که در سه نوع (شامل minisatellites، microsatellites و تکرارهای single-nucleotide) طبقه‌بندی می‌شوند همراه با پلی‌مورفیسم ناشی از جای‌گزینی انفرادی نوکلئوتیدها (Single Nucleotide Polymorphism) از معدود روش‌هایی هستند که این توانایی را دارند.[۴و۵] در حال حاضر روش Multi- locus-variable number of tandem repeat (MLVA) که به نام VNTR analysis نیز شناخته می‌شود، با تکیه بر ۱۵ لوکوس (شامل ۱۱ لوکوس حاضر در کروموزوم و ۴ لوکوس پلاسمیدی) یکی از روش های استاندارد شده ژنوتایپینگ باسیلوس آنتراسیس است.[۶] در سال ۲۰۰۷ ون ارت و همکاران با اتکا بر اطلاعات مقایسه‌ای به دست آمده از تعیین توالی کامل ژنوم چندین سویه از باسیلوس آنتراسیس، روش ژنوتایپینگ SNP را معرفی کردند. آن‌ها با اعمال این روش بر روی بزرگ‌ترین مجموعه بین‌المللی باسیلوس آنتراسیس (در برگیرنده ۱۰۴۴ جدایه از ۴۲ کشور جهان از جمله یک جدایه منفرد از ایران) ۱۲ گروه ژنتیکی اصلی را در تمام جهان شناسایی کردند.[۷و۸]

منطقه خاورمیانه و ایران یکی از خاستگاه‌های اصلی اهلی کردن دام در جهان است[۹] ضمن آن که بخش مهمی از شاهراه کهن اقتصادی دنیای قدیم یعنی جاده ابریشم از ایران عبور می‌کرده است. بدین ترتیب، با آگاهی از این نکته که ایران از جمله کانون‌های آندمیک سنتی آنتراکس در جهان است،[۱۰] آگاهی از همه‌گیرشناسی مولکولی باسیلوس آنتراسیس در این کشور از اهمیت ویژه جهانی برخوردار است. با وجود انجام مطالعه‌های بالینی و همه‌گیرشناسی بر روی آنتراکس در ایران،[۱۱-۱۸] ژنتیک جمعیتی این پاتوژن برای نخستین بار توسط مؤذنی جولا بر روی ۱۶ جدایه ایرانی با استفاده از روش ژنوتایپینگ MLVA و با استفاده از ۸ لوکوس (vrrA, vrrB1, vrrB2, vrrC1, vrrC2, CG3, pxO1-aat, pxO2-at) انجام شد که وجود حداقل ۷ تیپ ژنتیکی را در این کشور نشان داد (تدین، اطلاعات منتشر نشده).

در روش ژنوتایپینگ SNP ابداعی ون ارت ساختار نوکلئوتیدی ۱۳ لوکوس ژنتیکی باسیلوس آنتراسیس پس از آمپلی فیکاسیون به روش PCR بررسی می‌شود؛ به نام‌های مشخصه A.Br.001, A.Br.002, A.Br.003, A.Br.004, A.Br.006, A.Br.007, A.Br.008, A.Br.009, B.Br.001, B.Br.002, B.Br.003, B.Br.004, A/B.Br.001 ، پس از تعیین هر نوکلئوتید هدف در هر لوکوس، نتایج به دست آمده به صورت تجمیعی با آنچه که از ۱۲ تیپ تعریف شده قبلی وجود دارد مقایسه و تیپ ژنتیکی جدایه مورد بررسی تعیین می‌شود. روش ون ارت دو ویژگی فنی دارد: نخست آن که طراحی پرایمرهای مورد نیاز برای آمپلی فیکاسیون قطعه‌های ۱۳ گانه هدف به گونه‌ای است که اندازه همه ۱۳ محصول مفروض کوچک‌تر از ۱۰۰ زوج باز است. بدین ترتیب جداسازی و تخلیص این گونه قطعات پس از تکثیر و همچنین اجرای آزمون تعیین توالی نوکلئوتیدهای آن‌ها با ماشین‌های متعارف تعیین توالی معمولاً با اشکال همراه است. دوم این که استفاده از آن به جهت نیاز به تجهیزات گران قیمت عموماً در توان آزمایشگاه‌های تحقیقاتی کشورهای در حال توسعه نیست.[۱۳-۱۵]

این مطالعه به منظور بررسی امکان استفاده از آنزیم‌های محدودکننده در اجرای سیستم SNP ژنوتایپینگ ون ارت انجام شد.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه کاربردی در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه تحقیق و توسعه بخش واکسن‌های هوازی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد. تمام مراحل کشت و آزمون‌های مولکولار در آزمایشگاه کلاس

Archive of SID

www.SID.ir

II و زیر کابینت ایمنی ضد میکروبی و براساس دستور کار سازمان جهانی بهداشت دام اجرا شد.

سویه واکسینال باسیلوس آنتراسیس Sterne 34F2 به عنوان سویه استاندارد و یک جدایه حاد باسیلوس آنتراسیس اخذ شده از یک بیمار در استان تهران در آرشیو میکروبی مؤسسه رازی با هدف بررسی کارایی یافته‌های کاربردی مطالعه استفاده شد. هویت جدایه مورد اشاره پیش از این براساس روش‌های استاندارد میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بررسی و به عنوان باسیلوس آنتراسیس شناخته شده بود.

جهت کشت جدایه و سویه استاندارد از اسپور باکتری‌ها استفاده شد. ابتدا اسپور باکتری بر روی محیط TSA کشت داده شد. سپس یک عدد کلنی تک از آن به محیط کشت TSB تلقیح، به مدت ۱۴ تا ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری[۱۹] و جهت استخراج از آن‌ها استفاده شد. معادل ۸۰۰ میکرولیتر از محیط TSB حامل باکتری به یک تیوب میکروفیوژ مجهز به O-ring منتقل و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور g۶۰۰۰ انجام شد. مایع رویی را دور ریخته و ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE به رسوب حاصل از سانتریفیوژ افزوده شد. میکروفیوژهای محتوی سوسپانسیون‌های باکتری در عمق یک بن ماری با دمای ۹۵ قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در این حالت نگه‌داری شدند. سپس محتویات لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع فوقانی پس از عبور از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر به میکروفیوژ جدید انتقال داده شد.[۲۰] جهت اطمینان از غیرفعال شدن باکتری، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه فیلتر شده بر روی یک پلیت آگار خون‌دار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و از نظر احتمال رشد باسیلوس آنتراسیس بررسی شد. نمونه‌های غیرفعال به عنوان سوسپانسیون محتوی ژنوم باکتری، تا هنگام استفاده در آزمون‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

به منظور بررسی‌های بیوانفورماتی، ژنوم کامل سویه باسیلوس آنتراسیس Sterne 34F2 با استفاده از برنامه Artemis[۲۱] جستجو شد. سپس تمام ۱۳ لوکوس معرفی شده توسط ون ارت براساس پرایمرهای پیشنهاد شده مکان‌یابی و آلل‌های قابل تصور در مورد هر لوکوس براساس یافته‌های ون ارت مشخص شد. برای دست‌یابی به قطعات محتوی لوکوس‌های ۱۳ گانه با اندازه بزرگ‌تر (۴۵۰ تا ۷۰۰ زوج باز) در مقایسه با روش ون ارت، از نرم‌افزار پرایمر ۳[۲۲و۲۳] استفاده شد تا امکان طراحی بهترین زوج پرایمر براساس یک قطعه به اندازه ۲ کیلو باز از ژنوم سویه باسیلوس آنتراسیس Sterne 34F2 بررسی شود. با استفاده از برنامه SNP Cutter (قابل دسترسی در http://bioinfo.bsd.uchicago.edu/SNP_cutter/) ، وجود آنزیم هضم‌کننده با دامنه اثر محدود مناسب در مورد هر لوکوس بررسی شد.

سپس واکنش PCR بر روی هر دو نمونه DNA استخراج شده انجام شد. بدین منظور از پرایمرهای اختصاصی لوکوس A.Br 004 با توالی 5CTGGAATTGGTGGAGGTAAGGA3 و 5CCGATACCAGTAAACGACGACAT3 استفاده شد. این پرایمر یک قطعه ۵۶۰ جفت بازی را تکثیر می‌کنند. دستور کار اجرایی جهت تکثیر این لوکوس در جریان مطالعه پیشین بهینه شده بود. طبق این دستور کار، حجم نهایی واکنش ۸ میکرولیتر بود که به شرح زیر تهیه شد: ۴ میکرولیتر مخلوط تجاری آماده مصرف Ampliqon® حاوی تمام اجزای مورد نیاز PCR (به جز نمونه DNA و پرایمر) از جمله dNTPs، آنزیم Taq DNA polymerase، $Mgcl_2$ و مقادیر کافی از املاح و مکمل‌های متعارف PCR (Germany، Roche)، ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۱۵ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت 10 pmol/ml) و ۲/۷ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر. جهت انجام واکنش‌های PCR از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Manheim, Germany) استفاده شد. واکنش PCR مشتمل بود بر یک دور حرارت

Archive of SID

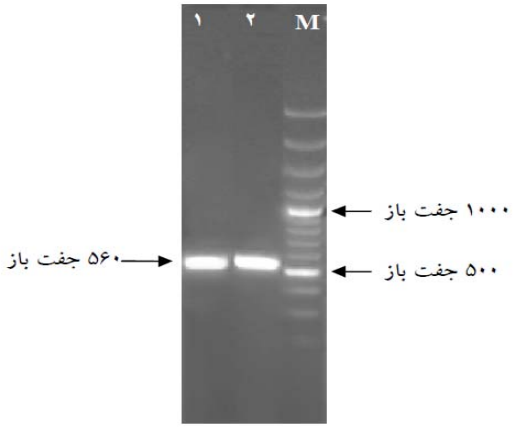
www.SID.ir

مقدماتی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه تکراری شامل مراحل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه که با یک مرحله تکثیر تکمیلی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه پایان یافت.

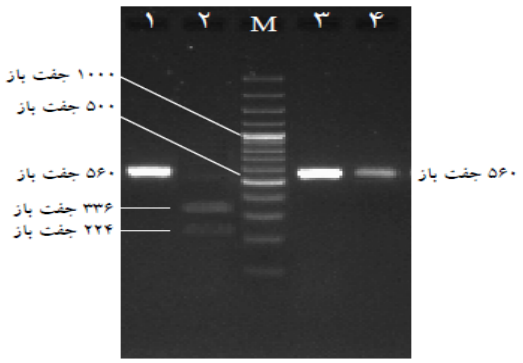
هضم آنزیمی براساس دستور کار سازنده انجام شد. برای این کار ۵ میکرولیتر از محصولات PCR، ۲ میکرولیتر آنزیم، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰× و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر افزوده شد. محصولات هضم شده طی سه نوبت (۵ ساعت، ۱۰ ساعت و ۱۶ ساعت پس از افزودن آنزیم) بر روی ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی شده با Red Safe الکتروفورز شدند. در این مرحله محصولات PCR بدون آنزیم در کنار محصولات حاصل از هضم آنزیم الکتروفورز شدند تا تأثیر آنزیم به خوبی مشخص شود.

❋ یافته‌ها:

جستجو به دنبال آنزیم‌های هضم‌کننده متقارن با ۱۳ لوکوس هدف، در مورد ۳ لوکوس با موفقیت همراه بود؛ بدین ترتیب آنزیم اختصاصی BsmI دارای منطقه برش GAATGC در مورد لوکوس A.Br004 و آنزیم‌های اختصاصی BseYI و BssSI به ترتیب در مورد لوکوس‌های A.Br002 و A.Br006 شناسایی شدند. در بررسی بازار و عرضه‌کننده‌های آنزیم‌های هضم‌کننده در ایران فقط آنزیم BsmI یافت شد. در نتیجه اجرای آزمون PCR بر روی ژنوم هر دو سویه واکسینال و جدایه حاد باسیلوس آنتراسیس با موفقیت یک محصول به طول مورد انتظار ۵۶۰ زوج باز حاصل شد (شکل شماره ۱). در فرایند هضم آنزیمی به صورت مستقل بر روی هر دو محصول PCR، الکتروفورز آمپلیکون مربوط به سویه واکسینال نشان داد پس از هضم آنزیمی، قطعه‌ای به طول ۵۶۰ زوج باز همچنان بدون تغییر باقی ماند. در حالی که جدایه حاد هضم آنزیمی توسط BsmI سبب شکست محصول PCR به دو قطعه پیش‌بینی شده به طول ۳۳۶ و ۲۲۴ زوج باز شد (شکل شماره ۲). درستی این یافته‌ها با استفاده از روش تعیین توالی نوکلئوتیدها بررسی و جای‌گزینی نوکلئوتید A در ژنوم سویه واکسینال با نوکلئوتید T در ژنوم جدایه حاد (که در مرکز جایگاه عمل آنزیم BsmI قرار گرفته است) مشخص شد (شکل شماره ۳).



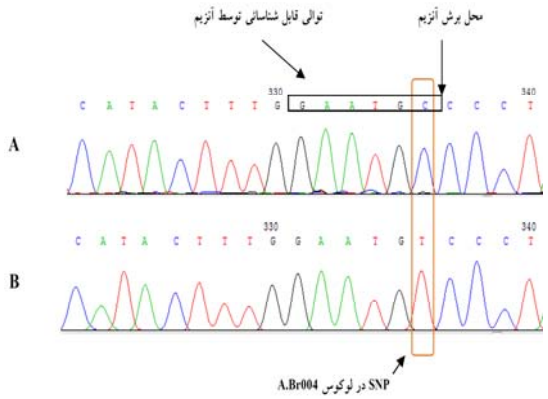
شکل ۱- تکثیر قطعه ۵٦۰ جفت بازی مربوط به لوکوس A.Br004 در سویه واکسینال Sterne 34F2 باسیلوس آنتراسیس (۱) و جدایه تحت مطالعه (۲) در کنار نشان‌گر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (M)



شکل ۲- محصولات PCR پس از هضم آنزیمی توسط اندونوکلئاز BsmI. سویه استاندارد Sterne 34F2 باسیلوس آنتراسیس بدون آنزیم (۱) همراه با آنزیم (۲) جدایه باسیلوس آنتراسیس بدون آنزیم(۳) همراه با آنزیم (٤) در کنار نشان‌گر وزن مولکولی ۱۰۰جفت بازی (M)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- کروماتوگرام مربوط به لوکوس A.Br004

❋بحث و نتیجه‌گیری:

در مطالعه حاضر دو تغییر در روش پیشنهادی ون ارت داده شد که به نظر می رسد سبب تسهیل در اجرای این روش شده است. نخست این که اندازه تمام محصولات PCR در روش اصلی کوچک‌تر از ۱۰۰ زوج باز است که در آزمایشگاه‌های مجهز به ماشین‌های ترموسایکلر و همچنین سیستم ژل الکتروفورز متعارف، کار کردن با قطعات در این اندازه به طور معمول با اشکال همراه است. در تحقیق حاضر طراحی پرایمرهای مربوط به لوکوس‌های مورد بررسی به گونه‌ای انجام شد که اندازه محصولات PCR بین ۴۵۰ تا ۷۰۰ زوج باز باشد.

یافته‌های منتشر نشده تدین و همکاران در مورد به کارگیری این روش بر روی تعدادی از جدایه‌های ایرانی و غیرایرانی باسیلوس آنتراسیس در مؤسسه رازی وجود حداقل سه تیپ ژنتیکی را در میان این جدایه ها نشان می‌دهند. براساس اطلاعات موجود از مجموع ۱۳ لوکوس پیشنهادی ون ارت فقط ۵ لوکوس در جمعیت ایرانی باسیلوس آنتراسیس پلی مورف و بقیه آن‌ها در تمام جدایه‌های مورد بررسی، ثابت و بدون تغییر بوده‌اند. لوکوس A.Br004 یکی از ۵ لوکوس فوق است که به نظر می‌رسد در مطالعه‌های آنتراکس در ایران از اهمیت بیش‌تری برخوردار باشد.

دومین تغییر مؤثر مطالعه حاضر معرفی امکان جای‌گزینی هضم آنزیمی کنترل شده به جای تعیین توالی نوکلئوتیدها در این روش ژنوتایپینگ بود. نویسندگان امیدوارند با دست‌یابی به دو آنزیم دیگر مشخص شده، توانایی این روش را کامل‌تر کنند.

❋سپاس‌گزاری:

از همکاری مؤسسه تحقیقات واکسن سرم‌سازی رازی کرج و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت تأمین هزینه‌های این پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد این دانشگاه قدردانی می‌شود.

❋مراجع:

1. Coker PR, Smith KL, Fellows PF, et al. Bacillus anthracis virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. J Clin Microbiol 2003 Mar; 41 (3): 1212-8

2. Grunow R, Klee S, Beyer W, et al. Anthrax among heroin users in Europe possibly caused by same Bacillus anthracis strain since 2000. Euro Surveill 2013 Mar 28; 18 (13): 1-9

3. Keim P, Gruendike JM, Klevytska AM, et al. The genome and variation of Bacillus anthracis. Mol Aspects Med 2009 Dec; 30 (6): 397-405

4. 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 Apr 6; 6: 33

5. Stratilo CW, Lewis CT, Bryden L, et al. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping Bacillus anthracis isolates. J Clin Microbiol 2006 Mar; 44 (3): 777-82

6. Antwerpen M, Ilin D, Georgieva E, et al. MLVA and SNP analysis identified a unique

Archive of SID

www.SID.ir

genetic cluster in Bulgarian Bacillus anthracis strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011 Jul; 30 (7): 923-30
7. Van Ert MN, Easterday WR, Simonson TS, et al. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the Bacillus anthracis Ames strain. J Clin Microbiol 2007 Jan; 45 (1): 47-53
8. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, et al. Global genetic population structure of Bacillus anthracis. PloS One 2007 May 23; 2 (5): e461
9. Hiendleder S, Phua S, and Hecht W. A diagnostic assay discriminating between two major Ovis aries mitochondrial DNA haplogroups. Anim Genet 1999 Jun; 30 (3): 211-3
10. Ingram RJ, Metan G, Maillere B, et al. Natural exposure to cutaneous anthrax gives long-lasting T cell immunity encompassing infection-specific epitopes. J Immunol 2010 Apr 1; 184 (7): 3814-21
11. Maddah G, Abdollahi A, Katebi M. Gastrointestinal anthrax: clinical experience in 5 cases. Caspian J Intern Med 2013 Spring; 4 (2): 672-6
12. Beheshti S, Rezaian S. Swelling of face. Cutaneous anthrax. Int J Occup Environ Med 2011 Apr; 2 (2): 124-5
13. Khoddami M, Shirvani F, Esmaeili J, Beladimogaddam N. Two rare presentations of fatal anthrax: meningeal and intestinal. Arch Iran Med 2010 Sep; 13 (5): 432-5
14. Hatami H, Ramazankhani A, Mansoori F. Two cases of gastrointestinal anthrax with an unusual presentation from Kermanshah (western Iran). Arch Iran Med 2010 Mar; 13 (2): 156-9
15. Esfandbod M, Malekpour M. Images in clinical medicine. Cutaneous anthrax. N Engl J Med 2009 Jul 9; 361 (2): 178
16. Amidi S, Dutz W, Kohout E, Ronaghy A. Human anthrax in Iran. Report of 300 cases and review of literature. Tropenmed Parasitol 1974 Mar; 25 (1): 96-104
17. Vahedi F, Moazeni Jula G, Kianizadeh M, Mahmoudi M. Characterization of Bacillus anthracis spores isolates from soil by biochemical and multiplex PCR analysis. East Mediterr Health J 2009 Jan-Feb; 15 (1): 149-56
18. Kohout E, Sehat A, Ashraf M. Anthrax: a continuous problem in Southwest Iran. Am J Med Sci 1964 May; 247 (5): 565-75
19. Sanz P, Teel LD, Alem F, et al. Detection of Bacillus anthracis spore germination in vivo by bioluminescence imaging. Infect Immun 2008 Mar; 76 (3): 1036-47
20. Marston CK, Allen CA, Beaudry J, et al. Molecular epidemiology of anthrax cases associated with recreational use of animal hides and yarn in the United States. PLoS One 2011; 6 (12): e28274
21. Carver T, Harris SR, Berriman M, et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. Bioinformatics 2012 Feb 15; 28 (4): 464-9
22. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 2012 Aug; 40 (15): e115
23. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC bioinformatics 2012 Jun 18; 13: 134

Archive of SID

www.SID.ir