

# Bacillus anthracis - uzročnik antraksa

---

**Potočnik, Mateo**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:917311>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-17**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**ODJEL ZA BIOLOGIJU**

ZAVRŠNI RAD  
***BACILLUS ANTHRACIS* – UZROČNIK ANTRAKSA**  
Mateo Potočnik

Split, rujan 2024.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**ODJEL ZA BIOLOGIJU**

ZAVRŠNI RAD  
***BACILLUS ANTHRACIS* – UZROČNIK ANTRAKSA**  
Mateo Potočnik

Split, rujan 2024.

*Ovaj rad, izrađen u Splitu 2024. godine, pod mentorstvom doc. dr. sc. Tomislava Rončevića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije.*

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

## ***BACILLUS ANTHRACIS* - UZROČNIK ANTRAKSA**

Mateo Potočnik

### **SAŽETAK**

*Bacillus anthracis* je gram-pozitivna štapićasta bakterija, uzročnik zoonoze antraks i jedna je od vrsta koja u nepovoljnim uvjetima može producirati spore, infektivni oblik bolesti. Genetskim istraživanjima potvrđeno je da se vrsta pojavila u subsaharskoj Africi, a ljudima je od davnina poznata. Genom vrste je tripartitan i sastoji se od nukleoida i dva virulentna plazmida – *pXO1* i *pXO2*. Na njima se nalaze geni koji kodiraju za glavne faktore virulencije. Plazmid *pXO2* kodira za poli-D-glutaminsku kapsulu, dok plazmid *pXO1* kodira za antraks toksin, koji je odgovoran za kliničku sliku antraksa. On se sastoji od tri proteinske komponente: zaštitni antigen (PA), faktor edema (EF) i smrtonosni/letalni faktor (LF). Antraks, kao zoonoza, je prvenstveno bolest koja napada životinje, a to su najčešće herbivori (goveda, ovce, koze). Ljudi se mogu zaraziti kada dođu u doticaj sa sporama putem kontaminiranih životinjskih proizvoda, konzumiranjem kontaminiranog mesa, udisanjem spora i dr. Ovisno o načinu ulaska spora u organizam, javljaju se četiri tipa antraksa: kožni, koji je i najčešći tip, slijede gastrointestinalni, inhalacijski (plućni) i najrjeđi, injekcijski antraks. Danas je najučinkovitija kontrola bolesti cijepljenje životinja.

**Ključne riječi:** *Bacillus anthracis*, antraks, spore, plazmidi *pXO1* i *pXO2*, poli-D-glutaminska kapsula, antraks toksin

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 37 stranica, 9 slika i 44 literaturnih navoda  
Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** doc. dr. sc. Tomislav Rončević

**Ocjenjivači:** doc. dr. sc. Tomislav Rončević  
izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović  
dr. sc. Juraj Kamenjarin, v. pred.

**Rad prihvaćen:** 25. rujna 2024.

## Basic documentation card

Undergraduate thesis

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

### ***BACILLUS ANTHRACIS* - CAUSATIVE AGENT OF ANTHRAX**

Mateo Potočnik

#### **ABSTRACT**

*Bacillus anthracis* is a Gram-positive rod-shaped bacterium, the causative agent of zoonosis anthrax, and is one of the species that, under unfavorable conditions, can produce spores, infectious form of the disease. Genetic research has confirmed that the species appeared in sub-Saharan Africa, and it has been known to people since ancient times. The genome of the anthrax bacillus is tripartite and consists of a nucleoid and two virulent plasmids - *pXO1* and *pXO2*. They contain the genes that code for the main virulence factors. Plasmid *pXO2* codes for poly-D-glutamine capsule, while *pXO1* codes for anthrax toxin, which is responsible for the clinical symptoms of anthrax. It consists of three protein components: protective antigen (PA), edema factor (EF) and lethal/lethal factor (LF). Anthrax, as a zoonosis, is primarily a disease that attacks animals, most often herbivores (cattle, sheep, goats). People can become infected when they come into contact with spores through contaminated animal products, by eating contaminated meat, by inhalation, etc. Depending on the way that the spores enter the body, there are four types of anthrax: cutaneous, which is the most common type, followed by gastrointestinal, inhalation (pulmonary) and the rarest, injection anthrax. Today, the most effective control of the disease is animal vaccination.

**Key words:** *Bacillus anthracis*, anthrax, spores, *pXO1* and *pXO2* plasmids, poly-D-glutamine capsule, anthrax toxin

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

**Thesis consists of:** 37 pages, 9 pictures and 44 references  
Original language: Croatian

**Mentor:** Assist. Prof. Tomislav Rončević

**Reviewers:** Assist. Prof. Tomislav Rončević  
Assoc. Prof. Željana Fredotović  
Dr. Juraj Kamenjarin

**Thesis accepted:** 25<sup>th</sup> September 2024

# IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

## ***BACILLUS ANTHRACIS* – UZROČNIK ANTRAKSA**

izradio samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Tomislava Rončevića. U radu sam primijenio metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristio literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo u završnom radu na uobičajen, standardan način citirao sam i povezoao s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Student

Mateo Potočnik

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. RAZRADA TEME .....	3
2.1. SPORULACIJA, GRAĐA ENDOSPORE .....	3
2.1.1. STRUKTURA SPORE .....	5
2.2. EVOLUCIJA BAKTERIJA IZ PORODICE BACILLACEAE .....	7
2.3. POVIJEST <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> I ANTRAKSA .....	10
2.4. <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> .....	11
2.4.1. STANIČNA MORFOLOGIJA I RAST .....	11
2.4.2. GENOM .....	13
2.4.3. ANTRAKS TOKSIN - ULAZAK U STANICU I MEHANIZAM DJELOVANJA .....	14
2.5. ANTRAKS ILI BEDRENICA .....	17
2.5.1. ANTRAKS KOD ŽIVOTINJA .....	17
2.5.2. ANTRAKS KOD LJUDI .....	20
2.5.2.1. KOŽNI ANTRAKS .....	21
2.5.2.2. GASTROINTESTINALNI (GI) ANTRAKS .....	21
2.5.2.3. INHALACIJSKI ILI PLUĆNI ANTRAKS .....	22
2.5.2.4. ANTIBIOTICI I CJEPIVO .....	23
2.5.3. ANTRAKS KAO BIOLOŠKO ORUŽJE .....	24
3. ZAKLJUČAK .....	26
4. LITERATURA .....	27



# 1. UVOD

Predstavnici iz porodice Bacillaceae, red Bacillales, jedne su od najotpornijih bakterija na Zemlji, a razlog se pripisuje mogućnosti formiranja otpornih endospora. Spore omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima kroz kraća ili dulja vremenska razdoblja, čak i tisućama godina. Vjeruje se da je upravo to svojstvo ovih bakterija ključ za razumijevanje njihove ekologije. Rasprostranjene su u prirodnom okolišu, a njihova staništa su vrlo raznolika koliko i ekološke niše koje su ljudi planirali istražiti. Pronađene su u tlu, zraku, slatkovodnim i morskim ekosustavima, aktivnom mulju (Mandic-Mulec et al., 2015) (aktivni mulj nastaje kao nusprodukt biološkog tretmana otpadne vode u pročištaču te zahtjeva posebnu tehnologiju obrade i stabilizacije) (Nekić Dvorski, 2011), u raznim fermentiranim proizvodima, a nedavno i u ekstremnim okolišnim uvjetima, određenim vrućim čvrstim i tekućim sustavima (primjerice, slana jezera i solane). Gledajući porodicu Bacillaceae, tu spadaju pretežito aerobne ili fakultativno anaerobne vrste s tipičnom gram-pozitivnom staničnom stijenkom. Godine 2015. unutar porodice je bilo nešto više od 60 rodova i 457 vrsta, no nove se vrste i rodovi stalno otkrivaju pa je taj broj danas puno veći (Mandic-Mulec et al., 2015).

Unutar roda *Bacillus* se uglavnom nalaze aerobne vrste koje produciraju spore i većinom su nepokretne (Kalenić, 2019). Kao jedini obligatni patogen unutar ovoga roda, ističe se vrsta *Bacillus anthracis*, uzročnik antraksa, što je i tematika ovoga rada.

*B. anthracis* ima dugu povijest kao životno ugrožavajući uzročnik kod ljudi i životinja širom svijeta. Međutim, mjere aktivne kontrole, osobito zabranjeno zakopavanje uginulih životinja i otpada iz klaonica te programi cijepljenja životinja tijekom prve polovice 20. stoljeća, značajno su smanjili pojavnost antraksa u mnogim industrijaliziranim područjima. Antraks je potencijalno zarazan za većinu sisavaca, ali primarno uzrokuje bolesti kod preživača, s obzirom na to da su oni i najizloženiji ovome uzročniku u okolišu. Antraks se na ljude najčešće prenosi kontaktom sa zaraženom životinjom ili zbog izloženosti, bilo profesionalno ili prehrambeno, kontaminiranim proizvodima životinjskog podrijetla – mesu, krznu ili koži (Pilo and Frey, 2018).

Infektivni oblik bolesti su spore koje, kada uđu u stanicu domaćina, ulaze u proces germinacije spora tj. prelaska iz neaktivne u rastuće vegetativne stanice. Takve se stanice počinju umnožavati velikom brzinom te dolazi do ekspresije antraks toksina i poli-D-

glutaminske kapsule, glavnih faktora virulencije, kodiranih genima smještenima na plazmidima virulencije, *pXO1* i *pXO2*. Antraks toksin sastoji se od tri proteina koji moraju biti zajedno da bi došlo do aktivacije istoga, a to su: zaštitni antigen (PA, *protective antigen*), faktor edema (EF, *edema factor*) i smrtonosni faktor (LF, *lethal factor*) (Zasada, 2020). Kod ljudi se pojavljuju tri osnovna tipa antraksa ovisno o načinu ulaska spora u organizam - kožni, gastrointestinalni i inhalacijski ili plućni antraks (Cote and Welkos, 2015).

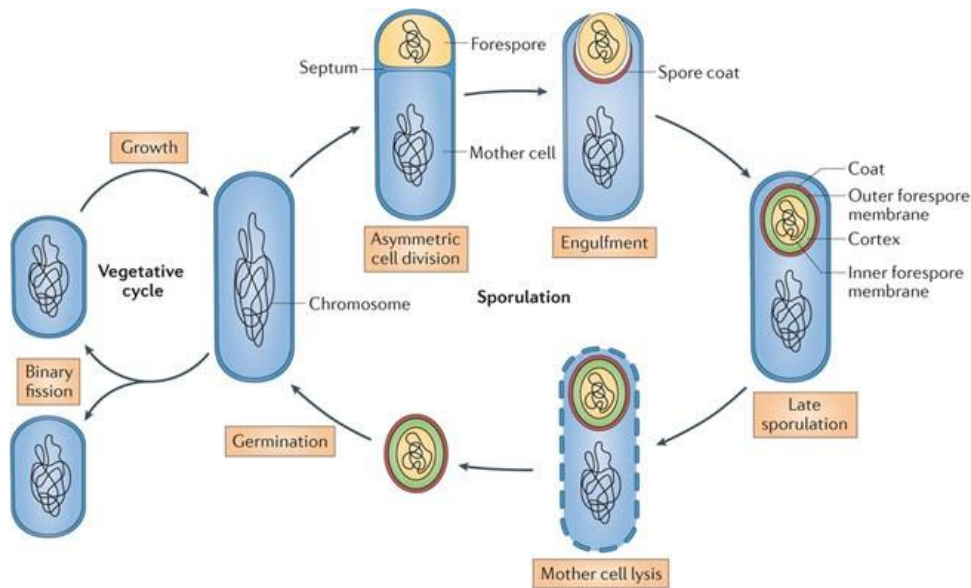
## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. SPORULACIJA, GRAĐA ENDOSPORE

Bakterije imaju pregršt strategija za preživljavanje mnogih okolišnih izazova s kojima se suočavaju. Te strategije uključuju brze promjene u ekspresiji gena koje privremeno mijenjaju fenotip stanice i na taj način omogućuju bakteriji preživljavanje. Bakterije su također razvile i druge načine za rješavanje stresnih uvjeta u okolišu - formiranje endospora, tj. sporulacija (McKenney et al., 2013). Taj se proces javlja obično kao odgovor na nedostatak nutrijenata u okolišu ili drugih molekula koje su bakterijama nužne za nesmetani rast. Međutim, vrijeme kada će bakterija sporulirati ovisi o vrsti te o ekološkoj niši kojoj je prilagođena takva ista vrsta. Primjerice, *B. anthracis* neće sporulirati tijekom infekcije domaćina, već se spore počinju stvarati nakon uginuća životinje i nakon što vegetativne stanice, koje se nalaze u krvotoku, dospiju u kontakt s okolišem. Kod *Clostridium difficile* se pak spore počinju stvarati kada uđu u organizam domaćina tj. tijekom infekcije (Swick et al., 2016). Sporulacija je predmet stalnih mikrobioloških istraživanja još iz razdoblja 19. stoljeća, za vrijeme kada su djelovali poznati i ugledni mikrobiolozi Robert Koch i Ferdinand Cohn (Higgins and Dworkin, 2012). Vraćajući se daleko u prošlost, događaj koji je označio istraživanje spora je bilo i samo otkriće endospora. Godine 1838. Christian Gottfried Ehrenberg, uočio je refraktilna tijela unutar bakterija. To je godina kada su endospore prvi put zabilježene. Endospore su se zatim, četiri desetljeća nakon, počele spominjati u istraživanjima, ranije spomenutih, Ferdinanda Cohna i Roberta Kocha. Cohn je proučavao otpornost spora *B. subtilis* na vrenje, dok je Koch, zajedno s Cohnom, promatrao cikluse sporulacija-germinacija i došao do zaključka da su spore i vegetativne stanice različiti oblici stanica iste bakterijske vrste i da mogu prelaziti iz jednog oblika u drugi. U godinama koje su uslijedile, brojni su znanstvenici pokušali opisati proces stvaranja endospora, tj. proces sporulacije kod različitih bakterija, međutim prepreku u tome su predstavljali, tada još nedovoljno razvijena, optička mikroskopija i ograničenje metoda bojenja. Otkriće elektronskog mikroskopa omogućilo je bolji uvid u citološki model sporulacije. Ranih 1960.-ih godina Young i Fitz-James su predstavili detaljniji opis sporulacije kod vrste *B. cereus*, a brojna su istraživanja uslijedila i na drugim vrstama iz istoga roda i roda *Clostridium*. Ubrzo, godine 1965. Antoinette Ryter definirala je šest različitih stadija sporulacije na temelju vlastitih istraživanja vrste *B. subtilis* i istraživanja koja su provela Young i Fitz-James na *B. cereus*, međutim ista je klasifikacija ubrzo proširena na osam stadija (Riley et al., 2021).

Poznato je za dvije taksonomske kategorije da produciraju spore, a to su aerobne bakterije iz porodice Bacillaceae (red Bacillales, razred Bacilli, odjeljak Firmicutes) te razred anaerobnih bakterija Clostridia. Neke vrste iz spomenutih kategorija su npr. patogeni *B. anthracis* i *C. difficile* te *B. subtilis*, pogodna bakterija kao modelni organizam. Zabilježeni su i brojni primjeri pronalaska spora, npr. u starim isprešanim biljnim uzrocima iz 17. stoljeća, također i u 60 godina zatvorenoj tikvici u laboratoriju Louisa Pasteura (McKenney et al., 2013). Bakterije koje stvaraju spore mogu imati i neke pozitivne strane. Njihovi oblici vegetativnih stanica i/ili spora produciraju enzime i metabolite koji se koriste za primjenu u agronomiji, veterini, zdravstvu i biotehnologiji. Primjerice, *B. thuringiensis* se danas često koristi zbog svojih toksina s bioinsekticidnim svojstvima koji se stvara u procesu sporulacije te *Bacillus* sp. koji se koriste za pospješivanje rasta biljaka i kao biognojivo (Bressuire-Isoard et al., 2018).

Endospora je metabolički dormantna i rezistentna je na okolišne uvjete pa je kao takva, sposobna preživjeti ekstremne temperature, isušivanje i ionizirajuće zračenje. Procjenjuje se da endospore mogu preživjeti tisuće godina, ali i milijune godina u tome obliku. Postavlja se pitanje, kako je moguće da bakterije mogu preživjeti brojne okolišne izazove u obliku endospora i da, kao takve, ostanu metabolički neaktivne tisućama godina. Ovdje su uključeni brojni čimbenici koji na to utječu, a neki od njih su dehidracija jezgre te zbijenost genetičkog materijala (DNA). Proces kojim dormantne endospore prelaze u aktivno rastuće stanice naziva se germinacija i događa se kada se u okolišu pojave povoljni uvjeti za bakterije, primjerice dostupnost aminokiselina. Endospore se građom dosta razlikuju od uobičajene rastuće stanice. Ta morfološka diferencijacija započinje asimetričnom diobom u blizini jednoga pola stanice, što rezultira stvaranjem manje stanice - prospore i dulje stanice - stanice majke/matične stanice koja predstavlja sporangij. Septum koji se stvara za vrijeme sporulacije je sličan onome koji se stvara za vrijeme diobe stanice, ali nije i identičan te sadržava tanji sloj peptidoglikana koji razdvaja dvije stanice. Po završetku, septum se počinje savijati i konačno, manja stanica tj. prospora biva u potpunosti okružena matičnom stanicom (Slika 1) (Higgins and Dworkin, 2012). Ovaj proces nalikuje procesu fagocitoze jer uključuje proždiranje prospore od strane matične stanice (McKenney et al., 2013). Tijekom kasnijih faza razvoja spore, vanjski i unutarnji proteinski slojevi spore se sjedinjuju te se sintetizira korteks koji se sastoji od debelog sloja peptidoglikana i sadržan je između vanjske i unutarnje membrane spore (Higgins and Dworkin, 2012). Sam proces sporulacije je potaknut aktivacijom histidin kinaza - KinA, KinB i KinC, koje prenose fosfat kroz prošireni sloj fosfata, što rezultira fosforilacijom glavnog regulatora sporulacije, a radi se o faktoru transkripcije Spo0A (McKenney et al., 2013).

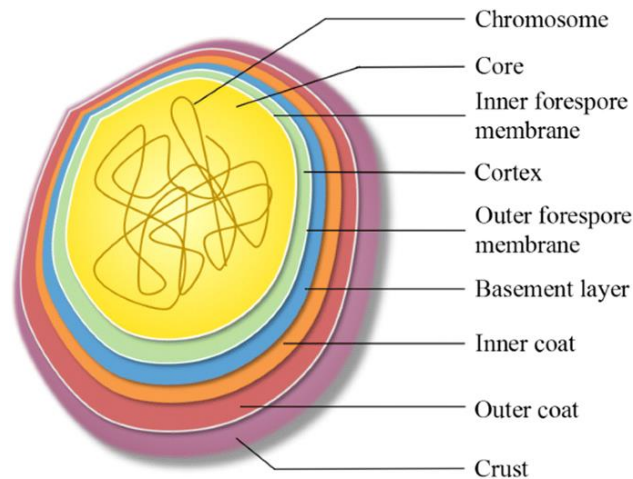


Nature Reviews | Microbiology

Slika 1 Proces sporulacije i germinacije kod vrste *B. subtilis*. Slika preuzeta iz McKenney et al. (McKenney et al., 2013)

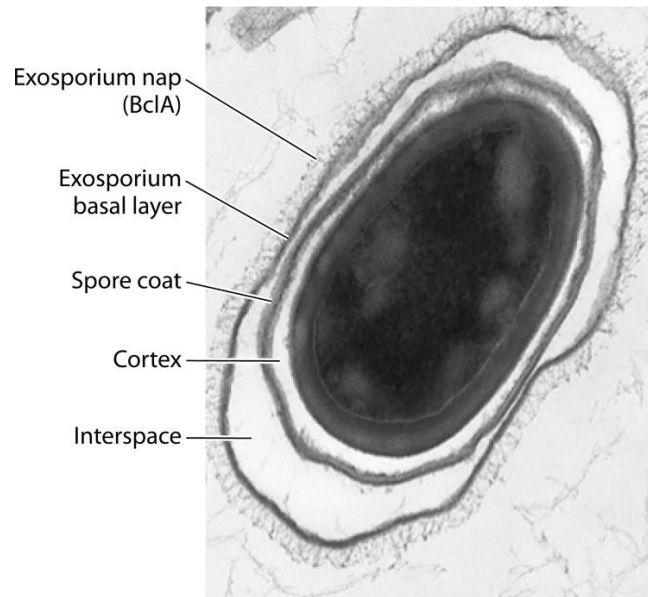
### 2.1.1. STRUKTURA SPORE

Početkom primjene elektronskog mikroskopa na bakterije koje produciraju spore, znanstvenici su ostali zapanjeni pravilnim koncentričnim rasporedom slojeva koji grade sporu. Genom je smješten unutar djelomično dehidrirane jezgre, gdje je većina vode zamijenjena  $\text{Ca}^{2+}$ -dipikolinskom kiselinom. Promatrajući sporu iznutra prema vani, jezgra je obavijena unutarnjom membranom, slijedi stanična stijenka „matične stanice“ (eng. *germ cell wall*) - to je tanki sloj peptidoglikana nalik onome kod vegetativne stanice, zatim korteks koji je građen od sloja peptidoglikana; vanjska membrana i na kraju, omotač. Većina navedenih struktura u procesu germinacije nestaje, omotač se odbacuje, a korteks se razgrađuje hidrolazama staničnih stijenki. Unutarnja membrana nakon procesa germinacije postaje stanična membrana vegetativne stanice, dok je sudbina vanjske membrane uglavnom nepoznata. Može se izgubiti tijekom razgradnje spore, međutim postoji bakterija, *Acetonema longum*, kod koje vanjska membrana ostaje prisutna pa u vegetativnoj stanici tako postoje dvije membrane, što podsjeća na gram-negativne bakterije. Elektronskim mikroskopom zabilježena su i četiri sloja koja grade omotač spore, a to su: bazalni sloj, unutarnji sloj, vanjski sloj i kora (Slika 2).



Slika 2 Shematski prikaz građe endospore. Slika preuzeta iz Lin et al. (Lin et al., 2020)

Kod nekih vrsta, primjerice *B. anthracis*, kora je zamijenjena strukturom koja se naziva egzosporium (Slika 3) (McKenney et al., 2013). Možemo reći da je to najudaljenija struktura mnogih spora, ali ne i svih, a definiran je svojim položajem i morfologijom. Odvojen je od omotača jednom prazninom koja se u ovom slučaju naziva međuprostor i njegova veličina varira. Danas se još ne zna sa sigurnošću koja je to tvar koja gradi međuprostor, a povezuje egzosporium zajedno s omotačem. Proučavan je samo kod nekoliko vrsta, a to su pretežito bili, spomenuti, *B. anthracis* i *B. cereus*. Zaključilo se da, kao i omotač, egzosporium predstavlja svojevrsno sito koje ne dopušta prolaz velikim molekulama. Što se tiče same poveznice između egzosporijuma i patogeneze određene bakterije, zna se da isti nije pokazatelj je li neka vrsta virulentna ili ne jer postoje bakterije tj. spore koje nemaju u svojoj strukturi egzosporium, a mogu uzrokovati bolest (Swick et al., 2016). Promatrajući samu površinu, razlike se očituju u prisustvu, odnosno odsustvu egzosporijuma, ali također i u pojedinim proteinima koji grade omotač. Budući da površina spora predstavlja poveznicu između same vrste i njezinog okoliša u kojem obitava, raznolikost u građi omotača spore može uvelike olakšati razumijevanje i definiranje ekoloških niša koje pojedine bakterije s mogućnošću formiranja spora zauzimaju (McKenney et al., 2013). Veličina, morfologija i lokacija spore variraju između bakterija i može poslužiti pri identifikaciji određene vrste. Primjerice, spore *C. tetani* su veće od poprečnog promjera bakterijske stanice, tvoreći strukturu koja nalikuje na štap za udaranje bubnjeva ili teniski reket, zato što se spora nalazi pri samome vrhu bakterijske stanice (Zhou and Li, 2015).



Slika 3 Transmisijska elektronska mikrografija spore *B. anthracis*, s egzosporiumom na vrhu. Slika preuzeta iz Stewart (Stewart, 2015)

## 2.2. EVOLUCIJA BAKTERIJA IZ PORODICE BACILLACEAE

Otkriće i opis dviju vrsta iz roda *Bacillus*, *B. anthracis* i *B. subtilis*, označilo je početak prema klasifikaciji onoga što danas poznajemo kao porodica Bacillaceae. Napredak u metodologiji sistematike bakterija za vrijeme kraja 19. i početka 20. stoljeća, uključujući razvoj i upotrebu raznih histoloških boja i metaboličkih testova doveo je do sistematike koja se danas temelji na fenotipskim, morfološkim i metaboličkim karakteristikama. Porodica Bacillaceae je izvorno opisana kao porodica aerobnih ili fakultativno anaerobnih gram-pozitivnih štapićastih bakterija s mogućnošću produkcije endospora. Međutim, kako je znanost napredovala, tako se mijenjala i taksonomija porodice. Pojavom molekularne filogenetike (kladistike), došlo je do značajnih promjena po pitanju evolucijske povezanosti među mikroorganizmima. Mnoštvo znanja o fenotipskim razlikama u porodici Bacillaceae dolazi iz laboratorijskih istraživanja čistih kultura. Rana fenotipska istraživanja pokazala su da je njihov metabolički kapacitet izrazito velik. Također, ustanovljeno je da se vrste poprilično razlikuju što se tiče mjesta izolacije, sposobnosti anaerobnog rasta, sastava stanične stijenke i membrane, produkcije raznih metabolita fermentacije, korištenja citrata ili propionata, tolerancije na salinitet, pokretljivosti, oblika i položaja endospora, pH i toleriranja temperaturnih razlika. Fenotipske razlike u porodici rezultat su dugotrajne evolucije od otprilike 2 milijarde godina. Obzirom na njihov položaj u bakterijskom evolucijskom stablu, podaci sugeriraju da je porodica Bacillaceae

drevna porodica koja je nekoć bila u potpunosti termo filna. Znanstvenici su dokazali, na temelju podataka genoma koji su prikupljeni iz predstavnika porodice, da iako je pronađeno 19 000 porodica gena u 19 vrsta, samo 814 ortolognih gena se nalazi među genomima svih vrsta. Prosječan broj gena u genomu svake istražene vrste iznosio je otprilike 5000.

Iako su *B. alcalophilus*, *B. badius*, *B. flexus* prvi puta izolirani početkom 20. stoljeća, gastrointestinalni trakt čovjeka je tek nedavno istražen kao sredina u kojem borave predstavnici porodice Bacillaceae. Uzorkovanjem na prisutnost *Actinobacteria* u već osušenim uzorcima fecesa iz deset dobrovoljnih darivatelja, otkriveno je da čak 81 izolat od njih ukupno 124 pripada vrstama iz porodice Bacillaceae. Kod većine donora pronađeni su *B. clausii* i *B. licheniformis*, također *Lysinibacillus*, *Ureibacillus*, *Oceanobacillus*, *Ornithinibacillus* i *Virgibacillus* sp. Postavlja se pitanje, kako su ove bakterije nastanjene na brojnim staništima. Odgovor se krije u sporama koje omogućuju bakterijama da se prošire na brojna staništa u okolišu. Pokazalo se istinitim da bakterije koje produciraju spore dominiraju u zajednicama bakterija koje su izolirane iz zraka, neovisno o dobu godine. Postoje brojni primjeri pronalaska drevnih spora u rasponu starosti od stotina pa sve do milijun godina u različitim okruženjima, poput osušenog tla, vječnog leda, ledenih jezgri, crijeva fosiliziranih pčela zarobljenih u jantaru itd. Iz takvih primjera možemo postaviti pitanje, do koje granice spore mogu opstati? Brojni su istraživači pokušali dati odgovor na njihovu izvanrednu dugovječnost, no brojni su bili kritizirani. Većina se kritika temelji na tri osnovna argumenta, prvo je da pronađeni organizmi predstavljaju kontaminante koji su mogli ući kroz sitne pukotine na uzorku. Druga tvrdnja govori da biološke molekule, a posebice DNA, ne mogu preživjeti tako dugačak period, ali činjenica je da je DNA u sporama izrazito zaštićena zbog čega i može opstati jako dugi niz godina. Dolazimo do treće tvrdnje koja se dotiče molekularne filogenetske analize. Naime, u ovom slučaju koristila se usporedba sekvenci 16S rDNA ili usporedbe sekvenci aminokiselina iz konzerviranih gena koji kodiraju za recA i splB proteine. U svim testiranim slučajevima pokazalo se kako su sekvence genoma iz drevnih sporulirajućih bakterija vrlo slične onim današnjim postojećim vrstama. Treća kritika također naglašava problem u određivanju apsolutne starosti bakterija na temelju molekularne filogenije. Zbog nedostatka fosilnih zapisa starih mikroba, bakterijska filogenetska stabla se formiraju iz DNA današnjih postojećih vrsta pa se može odrediti samo relativna starost, ali ne i apsolutna.

Evolucija svake bakterije na Zemlji ovisi o okolišu u kojem obitava; koji abiotički i biotički čimbenici utječu na njezino preživljavanje i dijeljenje. Napredovanjem tehnologije znanstvenicima je omogućeno bolje razumijevanje ekologije i evolucije Bacillaceae, što je



inače, kako za bakterije iz ove porodice, tako i za ostale, nešto kompliciranije u odnosu na neke druge organizme. Ekološki pristup u proučavanju evolucije kod Bacillaceae može se podijeliti na dvije osnovne metodologije, uzimanje uzoraka populacija za laboratorijske kulture i analize te opisivanje prirodnih populacija na temelju genetičkih podataka *in situ*. Najinteresantnija istraživanja koja se bave ekologijom Bacillaceae provedena su na dva mjesta na terenu, izraelski Evolution Canyons I i II te Dolina smrti u Kaliforniji, SAD. U spomenutim kanjonima istraživači su izolirali sojeve bakterije *B. simplex*, na područjima koja se razlikuju po abiotičkim čimbenicima koji ondje vladaju, intenzitet UV zračenja, temperatura i sastav tla. Mjerenja u laboratoriju koja su uključivala preživljavanje uz tretiranje UV zračenjem, stope mutacija te rast na visokim temperaturama, pokazala su jake korelacije između mjesta gdje su sojevi izolirani te fenotipa bakterijskog izolata, što sugerira na prilagodbe na tamošnje okolišne uvjete. Utvrđeno je da su sojevi *B. simplex*, izolirani s istih strmina izraelskih kanjona, ali na geološki udaljenim mjestima, genetski sličniji od sojeva koji su izolirani sa suprotnih strmina kanjona unutar istog kanjona (Fajardo-Cavazos et al., 2014).

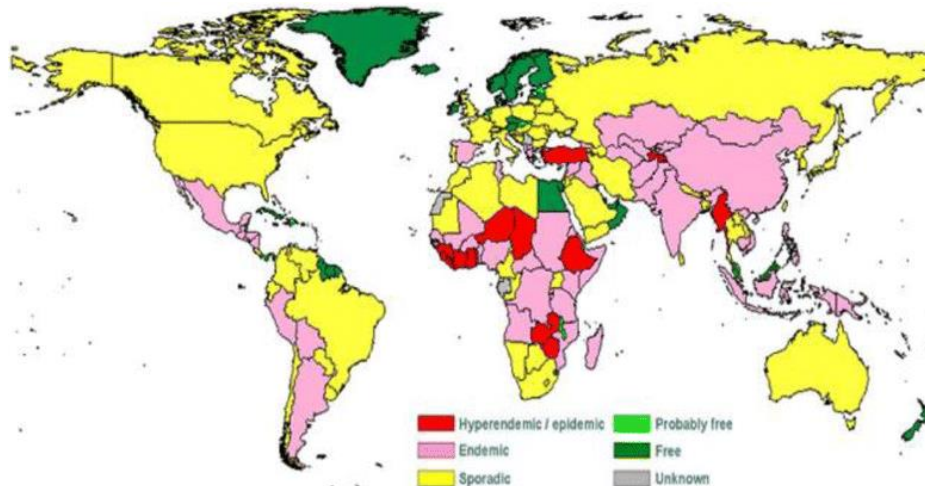
Promatrajući genetsku raznolikost današnjih sojeva vrste *B. anthracis*, ono nas vodi do zaključka da se patogen koji uzrokuje antraks razvio u subsaharskoj Africi i to vrlo vjerojatno mnogo prije nego što su ljudi migrirali diljem svijeta. Uzročnik se širio iz Afrike na Bliski istok i Europu prije 3000 do 6000 godina u srednjem holocenu. Sojevi koji su bili endemični samo za područje Europe su se proširili diljem svijeta zajedno s razvojem trgovine i pojavom kolonizacije. Iako je sama bolest povezana s uzgojem domaćih životinja, afričko podrijetlo ovog uzročnika pružalo je priliku da se ljudi susretnu s *B. anthracis* ili pretkom *B. cereus*, još u vrijeme dok su lovili i sakupljali divljač znatno prije pojave modernog uzgoja. Skupina znanstvenika analizirala je transkripcijski aspekt receptora za antraks toksin (ANTXR2) i rezultati su potvrdili hipotezu da su se ljudi prilagodili antraksu i njegovom uzročniku tijekom nekoliko razdoblja u evoluciji čovjeka. Ekološke promjene koje su u svezi s povećanim lovom i sakupljanjem otpada tijekom rane faze evolucije modernog čovjeka, mogle su dovesti do povećanih kontakata s *B. anthracis* u Africi. Doista, bolest je više pogađala poljoprivrednike i radnike koji su se bavili tekstilom tijekom 19. stoljeća. Ekspresija ANTXR2 receptora bila je veća u krvnim stanicama izoliranim iz lovaca sakupljača, nego u obližnjim poljoprivrednim populacijama u Africi. Spomenuta otkrića i rezultati impliciraju na složenu evolucijsku povijest ANTXR2 receptora, podržavajući model prema kojemu je selekcija na višestrukim alelima nastavila pokretati promjene u ekspresiji ANTXR2 receptora unutar ljudske populacije (Choate et al., 2021).

### 2.3. POVIJEST *BACILLUS ANTHRACIS* I ANTRAKSA

Antraks ima dugu povijest za koju se smatra da potječe još iz doba starog Egipta i Mezopotamije (D'Amelio et al., 2015). Spominje se u Bibliji u devetome poglavlju Knjige izlaska kao peta i šesta pošast koje su zadesile Egipat. Pretpostavlja se da je atenska kuga koja je trajala od 430. do 427. godine pr. Kr. bila epidemija inhalacijskog antraksa. Sama riječ antraks potječe od grčke riječi *anthrakites*, što u prijevodu znači nalik ugljenu, a odnosi se na karakteristični tzv. crni prišt na koži (Sternbach, 2003). Poznati rimski pjesnik Vergilije opisao je epidemije antraksa u svom djelu *Georgike*. Opisao ju je kao bolest koja hara među ovcama, konjima, govedima, psima i brojnim drugim životinjama. Primijetio je virulentnu i zaraznu prirodu uzročnika tj. bolesti te sposobnost da se proširi među ljude (Gupta, 2020). Najvažnija epidemija antraksa u svijetu ljudi, ali i među životinjama, bila je ona 1970.-ih godina na području današnje afričke države Zimbabve. Zaraženo je bilo više od 10 000 osoba, a najčešći tip antraksa je bio kožni, s jako malo slučajeva gastrointestinalnog tipa te par slučajeva inhalacijskog antraksa. Osim što je karakteristična po niskoj smrtnosti, ovu epidemiju je krasilo i niz drugih karakteristika; veliki broj slučajeva, neuobičajeno geografsko širenje, uključenost stoke te moguće širenje zrakom (D'Amelio et al., 2015).

U Europi *B. anthracis* postoji već stoljećima (Schmid and Kaufmann, 2002), a inhalacijski antraks, jedan od četiri tipova zaraze, poznat je još iz doba vladavine engleske kraljice Viktorije i to kao bolest prebirača vune. Razlog je bio učestalost zaraze kod radnika koji su radili na mlinu i pritom su bili izloženi životinjskim proizvodima koji su bili kontaminirani sporama bakterije (Sternbach, 2003). Zbog takvih brojnih slučajeva kod ljudi, a ni životinje nisu bile isključene, antraks je sve više dobivao pažnju od strane europskih znanstvenika tijekom 19. stoljeća (Schmid and Kaufmann, 2002), kada je Louis Pasteur napravio prvo cjepivo protiv antraksa. Isto se koristilo 50 godina za provođenje imunizacije kod životinja, a tridesetih godina prošloga stoljeća, cjepivo je zamijenjeno drugim i učinkovitijim kojeg je izradio Max Sterne, a isto je i danas u upotrebi (D'Amelio et al., 2015). Program cijepljenja životinja u mnogim europskim zemljama, koje se i danas nastavlja u područjima gdje je antraks još uvijek uvelike zastupljen, spriječilo je obnavljanje spora u tlu. Postojeće spore ili vegetativne stanice u tlu s vremenom nisu bile sposobne preživjeti okolišne uvjete, a koncentracije su se smanjile na tako niske razine da nisu mogle izazvati bolest ili su u potpunosti nestale. Bez obzira na navedeno, u nekim europskim zemljama antraks i dalje predstavlja ozbiljan problem za životinje, a nerijetko i za ljude. U središnjim i višim geografskim širinama Europe, antraks je danas kod

životinja nestao ili se javlja u rijetkim slučajevima. S druge strane, u zemljama koje imaju izlaz na Sredozemno more, antraks je i dalje česta pojava, primjerice u Turskoj, s najviše zabilježenih slučajeva u azijskome dijelu države. Neki slučajevi su zabilježeni u Grčkoj, balkanskim zemljama, Italiji i Španjolskoj (Slika 4). Države u kojima se izbijanje antraksa smatra čestom pojavom, na godišnjoj razini bilježe oko 20 slučajeva (Schmid and Kaufmann, 2002).



Slika 4 Globalna raširenost antraksa 2015. godine prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije. Slika preuzeta iz Head et al. (Head et al., 2016)

## 2.4. *BACILLUS ANTHRACIS*

### 2.4.1. STANIČNA MORFOLOGIJA I RAST

Bacil antraksa je gram-pozitivna bakterija, a iz imena roda lako se da zaključiti da ove bakterije imaju štapičastu morfologiju koja je pri optimalnim uvjetima rasta vrlo upečatljiva (Slika 5) (Koehler, 2009). Veličina stanice se kreće od 3 do 8  $\mu\text{m}$ , a više njih može živjeti pojedinačno, u paru ili u lancima. U preparatima *ex vivo* imaju jako izraženu kapsulu, stoga takvi lanci izgledaju poput bambusova štapa. U kulturi na umjetnim podlogama kapsula se smanjuje ili čak nestaje. Spore se ne nalaze u preparatima iz kliničkih uzoraka (Kalenić, 2019). Na agaru stvara „prljavo bijele“ kolonije nepravilnih rubova (Koehler, 2009), poput glave Meduze (Kalenić, 2019) i ima hrapavi izgled „brušenoga stakla“ kada se inkubira pod uvjetima koji nisu pogodni za sintezu kapsule. Kapsula se vrlo lako može uočiti primjenom indijskog mastila (eng. *India ink*).



Slika 5 *B. anthracis* i njegova jasno uočljiva štapićasta morfologija. Slika pruzeta iz Sapkota (Sapkota, 2022)

*B. anthracis* je fakultativni anaerob i može se lako razmnožavati u različitim laboratorijskim medijima koristeći razne šećere i aminokiseline kao izvor ugljika. Većina je istraživanja provedena kako bi se utvrdio odnos između konzumiranja šećera te stvaranja toksina. Danas se još ne zna sa sigurnošću koje su točno potrebe vrste za hranjivim tvarima, ali smatra se da one variraju između različitih sojeva. Za rast su potrebni metionin i tiamin, međutim medij koji sadrži glukozne soli s metioninom i tiaminom zahtjeva suplementaciju s više aminokiselina koje služe kao izvor dušika. Za uzgoj, proučavanje fiziologije vrste i ekspresije gena se najčešće koristi hidrolizirani kazeinski medij koji u svom sastavu ima glukozu, adenin, uracil, tiamin, triptofan, cistein, glicin i razne soli. Također se koristi definirani medij koji se sastoji od glukoze, tiamina, uracila, adenina, gvanina, kalcija i više aminokiselina. Temperatura za uspješan rast bakterije je oko 37°C, a na temperaturama iznad 43°C rast je inhibiran. Vrijeme udvostručavanja pri optimalnoj temperaturi iznosi od 30 do 60 minuta.

Nedavna istraživanja bazirala su se na prikupljanju željeza kod *B. anthracis*. Kod niskih koncentracija željeza, vrsta luči siderofore; bacilibaktin i petrobaktin koji imaju visoki afinitet za željezo i na taj način ga mogu vezati i potom prenositi u bakterijsku stanicu putem SBP proteina (eng. *substrate-binding proteins*) i ostalih ABC prenositelja. Nadalje, bacil antraksa, također, može uzimati željezo iz hema i proteina koji u svojoj strukturi imaju hem (npr. hemoglobin) putem Isd proteina (eng. *iron-regulated surface determinant proteins*), željezom regulirane površinske determinante. Tri proteina koji vezuju hem kod *B. anthracis* su IsdX1 (poznat i kao IsdJ), IsdX2 (poznat i kao IsdK) te IsdC. Oni sadrže NEAT domene koje su u svezi s vezivanjem na ligande koji sadrže željezo. IsdC protein je kovalentno vezan za staničnu

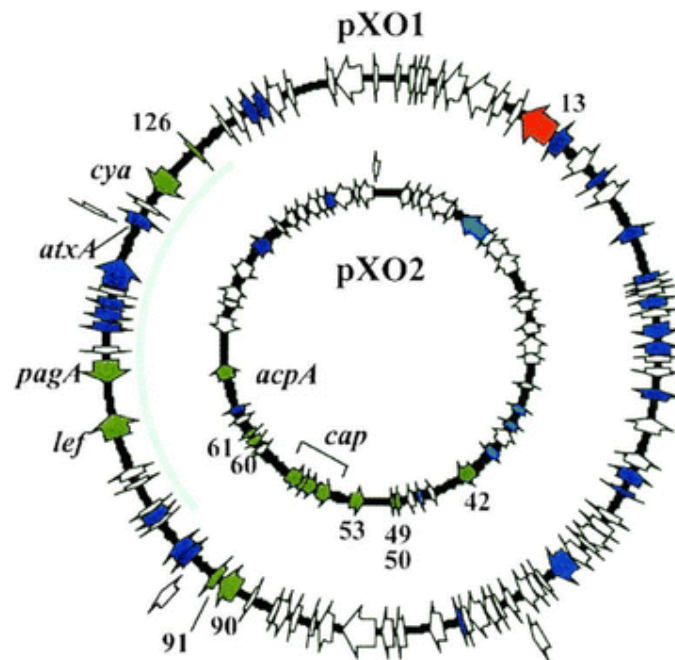
membranu pomoću transpeptidaze SrtB, dok se IsdX1 i IsdX2 nalaze u supernatantima kultura bez stanica (Koehler, 2009).

## 2.4.2. GENOM

Genom *B. anthracis* tripartitan je i sastoji se od jednog kružnog kromosoma (nukleoida) i dva kružna virulentna plazmida. Sastav nukleotida genoma više je „okrenut“ prema bazama adenin i timin, dok gvanin i citozin čine otprilike 35% svih baza. Plazmidi su relativno veliki i na njima se nalaze geni koji kodiraju za mnoštvo različitih proteina, ali među najvažnijima su oni geni koji kodiraju za kapsulu i antraks toksin (Keim et al., 2009). Virulencija vrste je određena spomenutim dvama plazmidima, *pXO1* i *pXO2* i genima koji su na njima smješteni (Liang et al., 2017). Antraks toksin i njegove komponente su kodirane na otoku patogenosti na plazmidu *pXO1*, a kapsula od poli- $\gamma$ -D-glutaminske kiseline, kao drugi važan čimbenik virulencije, je kodirana od strane operona *capBCADE*, koji je smješten na drugom plazmidu, *pXO2* (Moayeri et al., 2015). Osim što sadrži gene za sintezu kapsule, plazmid *pXO2* posjeduje i trans-djelujući regulator ekspresije gena za sintezu kapsule koji se zove *acpA* (Koehler, 2002). Kapsula štiti bakteriju od imunološkog sustava domaćina koja ujedno izaziva i septikemiju. Potpuno virulentni sojevi *B. anthracis* su oni koji posjeduju oba plazmida (Perego and Hoch, 2008), a gubitkom plazmida *pXO1*, sojevi gube svoju virulenciju jer nisu u mogućnosti sintetizirati toksin koji je, pored kapsule, esencijalni čimbenik virulencije. Sojevi, kao što je Sterne soj, a koji se koristi u cjepivima, bez plazmida *pXO2*, su atenuirani jer ne proizvode kapsulu (Liang et al., 2017). Dokazano je da sintezu kapsule i toksina regulira AtxA protein, kodiran genom sa plazmida *pXO1*. Stanični regulatori poput AbrB i sigma faktora SigH također utječu na ekspresiju faktora virulencije regulacijom sinteze AtxA. U kaskadi regulatornih kontrola, AtxA aktivira transkripciju AcpA i AcpB kodiranih na plazmidu *pXO2*, koji zauzvrat aktiviraju ekspresiju gena za sintezu kapsule. Gubitak gena za AtxA, osim što sprječava ekspresiju gena za faktore virulencije, uzrokuje i nedostatke u rastu bakterije u minimalnom mediju, što sugerira na vezanost između AtxA i ostalih regulatora plazmida i kromosomskih gena (Perego and Hoch, 2008).

Kapsula *B. anthracis* nije peptodglikanska kao kod većine bakterija, već je peptidna. Tijekom prve polovice 20. stoljeća dokazano je da je kapsula polimer D-glutaminske kiseline. Prije spomenuti operon *capBCADE*, ključan za sintezu kapsule, sadrži tri ključna gena – *capB*,

*capC*, *capA*. Detaljnijom analizom *cap* lokusa, dokazano je da postoji i četvrti gen, koji je u početku nazvan *dep*, a danas se zove *capD*. Također, otkriven je i peti gen, *capE*. Njihovi produkti, CapB, CapC, CapA i CapE su sastavni dio membrane i pretpostavlja se da oni čine jedan kompleks (Slika 6) (Fouet, 2009).



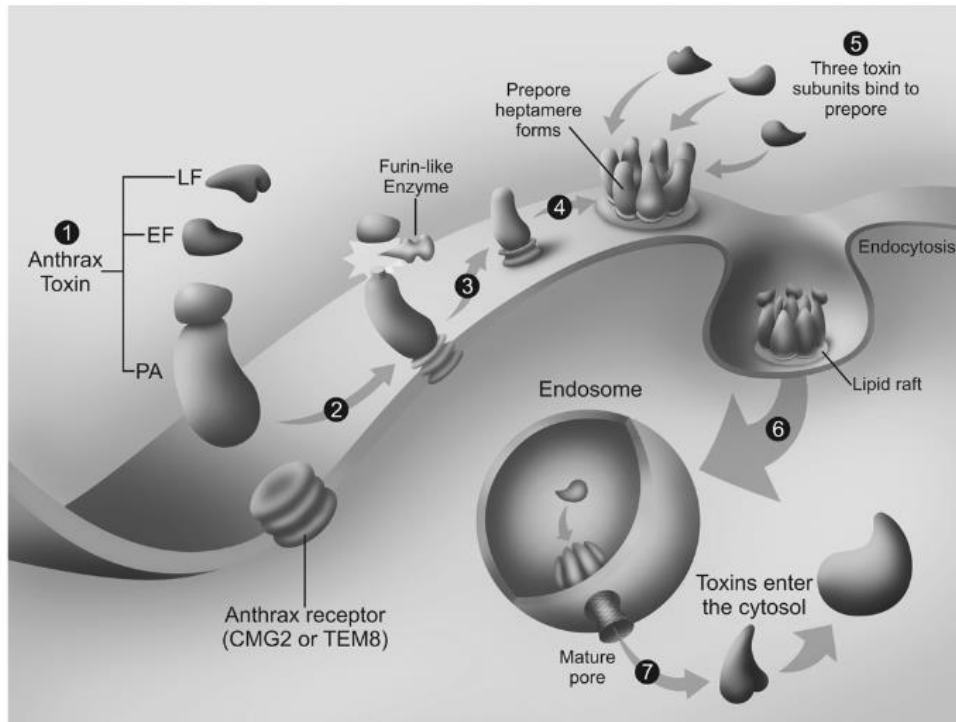
Slika 6 Prikaz *pXO1* i *pXO2* plazmida virulencije *B. anthracis* i ključnih gena koji se nalaze na plazmidima. Slika pruzeta iz Head et al. (Head et al., 2016)

### 2.4.3. ANTRAKS TOKSIN - ULAZAK U STANICU I MEHANIZAM DJELOVANJA

*B. anthracis* luči snažan toksin koji je glavni čimbenik njegove patogenosti. Toksin se sastoji od triju proteinskih komponenti: zaštitni antigen (eng., *protective antigen* - PA), faktor edema (eng., *edema factor* - EF) i letalni faktor (eng., *lethal factor* - LF). Svaka komponenta pojedinačno je netoksična, a EF zajedno s PA i LF čine snažne toksine koji dovode do kliničke slike antraksa. PA se veže na specifične stanične receptore i stvara kanaliće u staničnoj membrani. Na PA postoje receptori koji mogu vezati EF i LF te ih prebaciti u stanicu domaćina (Kalenić, 2019).

Da bi toksin uopće djelovao na stanicu domaćina, on mora dobiti pristup staničnoj citoplazmi gdje mogu djelovati dvije enzimske podjedinice toksina. Način na koji toksin dolazi u kontakt sa stanicama su stanični receptori: tumorski endotelni marker 8 (eng., *tumor*

*endothelial marker* 8; TEM8, ANTXR1) i gen kapilarne morfogeneze 2 (eng., *capillary morphogenesis gene* 2; CMG2, ANTXR2), a isti su otkriveni 2001. odnosno 2003. Njihova fiziološka uloga nije baš najbolje razjašnjena (Friebe et al., 2016). Vezivanje toksina na stanice domaćina postiže se klatrinom i endocitozom posredovanom receptorima. Najprije, PA ukupne mase od 83 kDa (PA83) se veže na TEM8 i CMG2. Dolazi do cijepanja proteazama sličnim furinom na jedinice PA20 i PA63, koja ostaje vezana na receptor i ondje stvara heptamere ili oktamere (Liu and Nestorovich, 2021). Samo se ovakav odcjepljeni oblik PA može strukturirati u oligomere (heptamere ili oktamere) (Friebe et al., 2016). Kristalografskom strukturom PA83 otkrivene su četiri domene koje čine PA, a svaka od njih ima različitu funkciju. Domena 2 tvori transmembranski kanal, dok domena 4 služi za vezanje na receptore. Strukturni i biokemijski rezultati podržavaju stvaranje heptamerne ili oktamerne  $\beta$ -bačve u procesu prelaska prepore u poru. Domena 2 sadrži pokretnu 2 $\beta$ 2–2 $\beta$ 3 petlju (ostaci 302 - 322). Tijekom konformacijskih promjena induciranim kiselim pH, sedam/osam 2 $\beta$ 2-2 $\beta$ 3 petlji u PA prepore se "ljušti" i formiraju transmembransku  $\beta$ -bačvu od 14/16 niti (Sun and Jacquez, 2016). Oligomeri receptora i toksina se grupiraju u lipidne splavi koje su poddomena stanične membrane. Lokalizacija oligomera na lipidne splavi izuzetno je važna, u suprotnom dolazi do greške u prijenosu toksina. Podjela na lipidne splavi kontrolirana je palmitoilacijom repa TEM8, a ovim procesom receptor se nalazi izvan lipidnih splavi. Receptor kojemu nedostaje ovaj proces će se brzo internalizirati, čime dolazi do neusklađenosti u vremenu. Ispravno funkcioniranje ovih procesa posredovano je posttranslacijskim modifikacijama receptorskog repa (Friebe et al., 2016). Slijedi internalizacija oligomernog kompleksa toksina u vezikulu vezane za membranu putem endocitoze posredovane receptorima ovisne o klatrinu. Internalizirana vezikula postaje kiseli endosom. Kiseli uvjeti unutar endosoma pokreću konformacijske promjene kompleksa, što dovodi do umetanja fleksibilne petlje svake molekule PA u lipidni dvosloj kako bi se stvorila pora. Formiranje pora omogućuje translokaciju LF i EF iz kasnog endosoma u citoplazmu stanice domaćina (Gupta, 2020). Translokacija kao proces ne zahtjeva ulaganje energije, već su faktori samo koncentracija protona i električni potencijal. Međutim, translokacija zahtjeva odmatanje LF i EF jer je promjer pore premali da bi uspješno prošao cijeli protein. Translokacija LF se odvija s N-terminusa pri čemu se LF  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 odmata nakon vezanja PA i umeće u šupljinu koju formiraju susjedne podjedinice PA. Uz stvaranje pora, niski pH koji se javlja u ranim i kasnim endosomima destabilizira EF i LF konformacije i na taj način dolazi do odmatanja proteina i brze translokacije (Friebe et al., 2016). Po ulasku toksina u citoplazmu, on doseže svoje ciljeve (Slika 7) (Gupta, 2020).



Slika 7 Mehanizam vezanja zaštitnog antigena (PA) za stanične receptore i ulazak toksina u stanicu procesom endocitoze. Slika pruzeta iz Gupta (Gupta, 2020)

LF je o cinku ovisna metaloproteaza, koja cijepa članove iz skupine MAP kinaza kinaza (MEK), što uzrokuje njihovu inaktivaciju. Nizvodno od MEK, nalaze se i putevi ERK, JNK i p38 koji su ključni u regulaciji staničnog stresa, rasta i sl. EF je visoko učinkovita adenilil ciklaza ovisna o kalmodulinu. Ovaj enzim može pretvoriti i do 2000 molekula ATP u cAMP u svega nekoliko sekundi, čime se značajno povećava njegova koncentracija. Oba se faktora oslanjaju na PA kako bi ušli u stanicu. Po ulasku toksina u stanicu, prvi zadatak je onesposobiti imunološki sustav domaćina. Čini se kako su prva meta toksina upravo mijeloidne stanice, kao što su makrofagi i neutrofili, omogućujući tako bakterijama nesmetani rast i dijeljenje. Miševi kojima je nedostajao CMG2 receptor u mijeloidnim prekursorima bili su otporni na infekciju antraksom, čime se ističe važnost takvih stanica za borbu protiv antraksa. Primarni faktor ovdje je LF koji inaktivira MEK kinaze i tako potiče apoptozu. Osim MEK kinaza, LF može ciljati na još neke stanične strukture. Naime, neki sojevi miševa i štakora imaju polimorfizam u NLRP1 proteinu, komponenti NLRP1 inflamiasoma, što čini ovaj protein vrlo osjetljivim na LF i posljedično dolazi do apoptoze ovisne o kaspazi-1. Zanimljivo je da posjedovanje osjetljivih makrofaga (eng., *susceptible macrophages*) pruža bolju zaštitu miševima, nego li otporni makrofagi (eng., *resistant macrophage*). Zašto je tomu tako? Odgovor se može kriti u povećanom lučenju upalnih citokina od strane osjetljivih makrofaga čime se aktivira imunološki sustav domaćina koji kontrolira dijeljenje bakterija (Friebe et al., 2016).



Budući da je njihova ekspresija pomno regulirana, oba toksina antraksa surađuju zajedno tijekom infekcije. Ovi toksini imaju različite mehanizme toksičnosti, ali ciljaju na slične tipove stanica. Oba, i LF i EF uzrokuju disregulaciju endotelne stanične barijere, smrt eritrocita, inhibiciju pokretljivosti neutrofila i fagocitoze te promjene u modulaciji citokina. Djelujući zajedno, EF i LF inhibiraju proizvodnju superoksida od strane neutrofila i proizvodnju citokina od strane dendritičnih stanica. EF pojačano djeluje na PA receptore u makrofagima i povećava njihovu osjetljivost na LF citotoksičnost. Konačno, pojava crne pigmentacije karakteristične za bolest antraksa mogla bi se objasniti kombiniranim učincima LF i EF na melanocyte (Gupta, 2020).

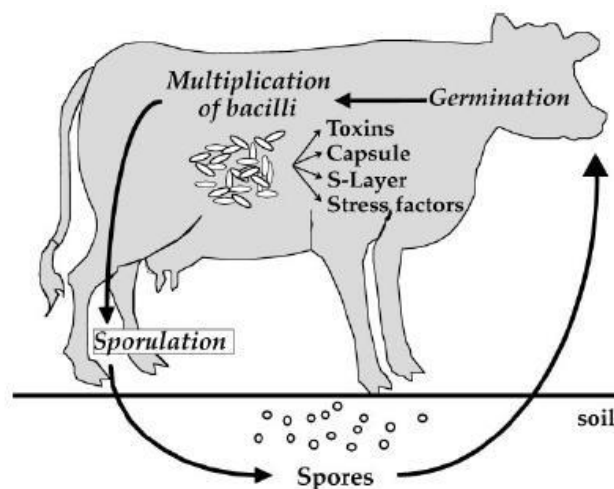
## **2.5. ANTRAKS ILI BEDRENICA**

Kao što je spomenuto gore, antraks je zoonoza uzrokovana bacilom, *B. anthracis*. Obično zahvaća domaće životinje, koje su najizloženije ovom bacilu, a povremeno se javlja i među ljudskom populacijom i globalno se širi. Od domaćih životinja govedo i ovce su najviše pogođene životinje, slijede koze, a također i konji. Patuljasta svinja i alžirska ovca su relativno otporne na ovog uzročnika (Alam et al., 2022). Slučajevi izravnog prijenosa s čovjeka na čovjeka nisu zabilježeni, ali kontaktom sa zaraženim životinjama i kontaminiranom hranom, infekcija se vrlo lako može pojaviti (Azarkar and Zare Bidaki, 2016). Azijske i afričke zemlje smatraju se najvećim žarištima antraksa, ali treba napomenuti da se bolest javlja i u europskim zemljama, u Sjedinjenim Američkim Državama, Australiji i dr. Proteklih godina zabilježeni su ponovni slučajevi izbijanja antraksa kod životinja u Bangladešu (Alam et al., 2022).

### **2.5.1. ANTRAKS KOD ŽIVOTINJA**

Prilikom ishrane, herbivori zajedno s hranom unose i različite čestice tla koje može biti kontaminirano sporama *B. anthracis* i na taj način može biti izvor zaraze. Prilikom ingestije spora bakterije, one unutar organizma domaćina germiniraju i prelaze u aktivni oblik stanica, koje rastu i razmnožavaju se. Razvije se gastrointestinalni oblik antraksa zbog čega životinja ubrzo i ugiba. Nakon smrti, započinje razgradnja životinje pod utjecajem saprofitskih mikroorganizama, uslijed čega ugibaju i vegetativne stanice. Da bi životni ciklus ove vrste bio potpun, vegetativne bi se stanice, nakon ugibanja životinje, trebale osloboditi u okoliš gdje bi

ponovno formirale spore (Slika 8). Djelomice, taj se postupak odvija u terminalnom dijelu infekcije gdje dolazi do iscjetka krvi iz zaražene jedinke i na taj način, stanice se jednostavnim putem oslobađaju u okoliš i mogu nastaviti svoj životni ciklus. Ovdje bitnu ulogu imaju veliki predatori i strvinari. Obzirom da zaražena životinja polako slabi, ona predstavlja lak plijen predatorima, a nerijetko jedu i već uginule životinje. Antraks obično pogađa velike životinje pa su njihovi predatori prisiljeni rastrgati tijelo životinje na manje dijelove. U tom slučaju, krv i ostaci tkiva kontaminiranim sporama dopijevaju u doticaj s tlom i spore se ponovno mogu formirati. Zanimljiva je činjenica da predatori i strvinari nakon što pojedu životinju koja je bila zaražena antraksom, gotovo nikad ne razviju infekciju, a ako ipak dođe do razvoja bolesti, radi se o blažem obliku. Da se zaključiti da predatori i strvinari u tom kontekstu sudjeluju u širenju uzročnika u okolišu, a sami ne podliježu razvoju bolesti (Bakhteeva and Timofeev, 2022). Drugi način širenja spora i kontaminacije pašnjaka sporama događa se kada neupućeni veterinari obavljaju obdukciju zaražene i uginule životinje na licu mjesta ili kada farmeri pokušavaju spasiti kožu životinje na način da ju odstranjuju s tijela uginule životinje. Čak i kada su tijela duboko zakopana u zemlju, spore se mogu naći na površini uslijed pomicanja kopna ili putem podzemnih voda (Fasanella et al., 2010).



Slika 8 Životni ciklus *B. anthracis*

(<https://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/assets/bio307/javaron/life%20cycle.html>)

Kao što je već rečeno, antraks je prvenstveno bolest sisavaca herbivora. Vrlo su osjetljivi na antraks i njihova je bolest akutna s kratkim periodom inkubacije nakon čega vrlo brzo infekcija završava letalnim ishodom. Antraks se rijetko pojavljuje kod mladih životinja, a razlog se može kriti u tome što se mladi hrane majčinim mlijekom, a ne biljkama kao njihovi roditelji. Također, njihov je gastrointestinalni sustav prilagođen na mliječnu ishranu; imaju manji

volumen i duljinu gastrointestinalnog trakta, burag je obično nerazvijen, dok su sirište i tanko crijevo uglavnom uključeni u probavu (Bakhteeva and Timofeev, 2022).

Teško je odrediti koje je točno vrijeme inkubacije nakon zaraze u prirodi, no obično se radi od tri do sedam dana nakon unosa uzročnika. Kod goveda vrijeme inkubacije obično varira između jednog do 14 dana ili čak i više. Sam tijek bolesti kod životinja može biti: perakutan, akutan, subakutan i kroničan. Nakon početka bolesti, perakutni tijek vidljiv je kod goveda, ovaca i koza, dok je akutna i subakutna faza vidljiva također kod goveda i ovaca, ali i konja. Kroničan oblik antraksa često se javlja kod svinja, a zabilježen je i kod goveda, konja, pasa i mačaka. Kod dijagnoze bolesti preporuka je da se ne koriste hematološki i biokemijski testovi krvi zbog mogućeg rizika od zaraze. U ranijoj fazi infekcije antraksom moguća je prisutnost bakterija u krvi pa se može koristiti hemokultura, koja se i smatra zlatnim standardom, ali rezultati su vidljivi tek nakon 12 sati ili čak i nekoliko dana. Koriste se također i metode bazirane na antitijelima za dokazivanje uzročnika te brojni testovi poput Ascolijevog termoprecipitacijskog testa, imunokromatografskog testa itd. Bacil antraksa osjetljiv je na brojne antibiotike, poput penicilina, oksitetraciklina, aminoksicilina, kloramfenikola, ciprofloksacina, doksiciklina, eritromicina, gentamicina i sulfonamida. Izdvajaju se penicilin i oksitetraciklin kao najučinkovitiji. Vrućica se javlja na početku bolesti, prije nego li se razviju i ostali simptomi bolesti pa životinje tada najbolje reagiraju na liječenje penicilinom.

Kontrola antraksa može se provesti na nekoliko načina: prekidanje izvora zaraze, praćenje tijeka bolesti, pravilno zbrinjavanje tijela uginulih životinja, pravilno rukovanje kontaminiranim materijalom, dezinfekcija kontaminiranog područja i cijepljenje životinja. Ukoliko dođe do izbijanja bolesti, a poznat nam je izvor infekcije, potrebno je poduzeti sve mjere kako bi se prekinuo ciklus širenja. Zaražene uginule životinje potrebno je spaliti. Drugi način zbrinjavanja uginulih životinja je zakapanje duboko u zemlju. Prije se kao dezinficijens koristilo živo vapno (kalcijev oksid), međutim, istraživanja su utvrdila da izlaganje spora *B. anthracis* kalciju može pospješiti njihovo preživljavanje. Iz toga razloga se živo vapno ili bilo koji drugi proizvod koji u svom sastavu sadrži kalcij više ne preporučuju za tretiranje uginulih životinja. Dezinfekcija kontaminiranog poda, soba, mesa, kože i vune zahtjeva posebnu pozornost. Vegetativne stanice bakterije mogu se uništiti redovitim dezinficiranjem površina ili toplinom (dovoljno je nekoliko minuta na temperaturi od 60°C). U današnje vrijeme, najbolja i najučinkovitija metoda suzbijanja antraksa je cijepljenje životinja (Alam et al., 2022).

## 2.5.2. ANTRAKS KOD LJUDI

Čovjek se zarazi antraksom unosom spora kroz oštećenu kožu (kožni antraks), nadalje, ingestijom spora razvija se gastrointestinalni antraks, dok udisanjem spora nastaje inhalacijski ili plućni antraks. Postoji i injekcijski tip koji je vrlo rijedak, a nedavno je opisan kod intravenskih ovisnika o opojnim drogama koji su injicirali kontaminirani heroin, bilo u kožu ili intravenski (Kalenić, 2019). Ono što je zajedničko svim tipovima antraksa je sljedeće: spore preuzimaju makrofagi i druge imunološke stanice, zatim, pretvaranje u vegetativni oblik stanica na ili u blizini mjesta inokulacije, vremenski period prijenosa bakterija do ciljnih organa, organi koji su ciljani za toksičnost, septikemija i otpuštanje topivih faktora koji uzrokuju smrt organizma.

*B. anthracis* nije kategoriziran kao intracelularni patogen pa koristi tkivne makrofage koji mu služe kao, možemo reći, određena vrsta utočišta gdje spore mogu germinirati u vegetativne stanice i to tijekom početne faze infekcije. Iako su spore otporne na superokside iz fagosoma, one su razvile posebnu prilagodbu u prepoznavanju receptora smještenih na površini fagosoma putem molekula koje su smještene na patogenu (eng., *pathogen-associated molecular patterns* - PAMP). Te iste molekule stupaju u interakciju s TLR receptorima na površini makrofaga, s dendritičkim stanicama i polimorfonuklearnim leukocitima. Spore antraksa mogu izazvati snažni upalni odgovor aktiviranjem TLR4 receptora na stanicama imunološkog sustava.

Značajan broj bakterija karakterističan je u kasnijim fazama bolesti. Odsustvo odgovora od strane imunološkog sustava zbog otpuštanja toksina antraksa, bacili se mogu nesmetano umnožavati do visokih koncentracija. Još se ne zna sa sigurnošću umnaža li se *B. anthracis* unutar makrofaga, kao što predlažu neka istraživanja, ili u krvotoku. Sačuvana krv iz zaraženih kunića i zamoraca ukazuje na to da se bakterije dijele sve do posljednjih sati života, a brojke se povećavaju na  $10^7$  odnosno  $10^9$  mL/krv. Bez obzira na put infekcije, sustavno širenje uglavnom zahvaća iste organe. Pluća i probavni trakt posebne su mete koje ciljaju bacili antraksa, a slezena, mozak, jetra i ostali organi postaju „kolonizirani“ unutar nekoliko sati ili dana. Smrt organizma izazvana je zbog izlučivanja topivih toksina koji se sintetiziraju iz vegetativnih stanica, a koji potom slabe imunološki sustav i pokreću smrt stanice (Gupta, 2020), kao što je opisano u prethodnim poglavljima rada.

### **2.5.2.1. KOŽNI ANTRAKS**

Kožni antraks je kod ljudi najčešći tip antraksa koji se javlja s učestalošću većom od 95%. Ovakav tip podrazumijeva ulazak spora kroz oštećenja na koži (ogrebotine ili posjekotine i sl.) (Savransky et al., 2020). Osoba s kožnim antraksom (ili drugim oblikom) ne može prenijeti infekciju na drugu osobu putem aerosola ili kapljica. Međutim, spore mogu zaostati na nečijoj koži, kosi, odjeći, također, osobe prilikom tuširanja ili presvlačenja vrlo lako mogu prenijeti spore na drugu osobu i na taj način izazvati bolest (Sidwa et al., 2020). U trenutku kad spore uđu u domaćina, one prelaze u vegetativni oblik stanica koje zatim stvaraju faktore virulencije. Na koži se mogu razviti satelitske kožne bulozne lezije. Obično se javljaju na licu, vratu, šakama i na ostalim dijelovima ruke. Vrijeme inkubacije može varirati od 12 sati pa do tjedan dana. Na početku, infekcija se može uočiti kao mala makula ili papula koja na kraju poprima smeđu boju s prstenom eritema i vezikulama. Nekoliko dana nakon toga, vezikularna tekućina postaje plave do crne boje zbog krvarenja i javlja se crna krasta otprilike petog ili sedmog dana. Želatinozni edem zajedno s crnom krastom, tipična je osobina kožnog antraksa (Slika 9). Od ostalih simptoma koji se mogu javiti, to su: glavobolja, malaksalost i niža temperatura. Bez obzira na liječenje, kožni antraks vrlo sporo prolazi (Savransky et al., 2020). Deset do 40 % neliječenih slučajeva kožnog antraksa završava smrću, no većina se oporavi uz liječenje. Također, moguće su i komplikacije bolesti u vidu meningitisa (Sidwa et al., 2020).



Slika 9 Kožni antraks (<https://www.immunize.org/clinical/image-library/anthrax/>)

### **2.5.2.2. GASTROINTESTINALNI (GI) ANTRAKS**

Gastrointestinalni (GI) antraks obično nastaje zbog konzumiranja nedovoljno termički obrađenog mesa koje je kontaminirano sporama antraksa (Savransky et al., 2020). Manifestira

se kao crijevna ili, rjeđe, orofaringealna infekcija. Inkubacija traje obično između jednog do šest dana, ali nije jasan mehanizam uspostavljanja infekcije na sluznici. Stopa smrtnosti varira, ukoliko se ne liječi iznosi 100%, a uz liječenje antibioticima pada na 40%. Orofaringealni antraks karakteriziraju ulceracije sluznice, grlobolja, povećanje vratnih limfnih čvorova, edem mekih tkiva i disfagija. Bolest započinje naglim mršavljenjem, mučninom, povraćanjem i vrućicom, dolazi do jake boli u trbuhu te krvi u stolici. Tijekom munjevitog napredovanja bolesti, bakterije se počinju širiti u ciljna tkiva i organe koji su dobro prokrvljeni. Razmnožavanjem bakterija u krvotoku, LT (smrtonosni toksin - radi se o kompleksu smrtonosnog faktora (LF) i zaštitnog antigena (PA)) i ET (edema toksin – faktor edema (EF) + zaštitni antigen (PA)) se akumuliraju velikom brzinom čime se dostiže, možemo to nazvati, kritična razina/prag što posljedično dovodi do smrti, bez obzira što je proliferacija bakterija ograničena uporabom antibiotika. U završnoj fazi GI antraksa toksini uzrokuju vaskularnu propusnost, smanjenje aktivnosti srca, slezene, bubrega, nadbubrežnih žlijezda i mozga.

Mehanizam kojim se pokreće infekcija antraksom unutar gastrointestinalnog trakta nije još najbolje proučen i razjašnjen. Tijekom iniciranja infekcije GI antraksom, dolazi do ingestije spora koje zatim germiniraju na ili unutar epitela gastrointestinalnog epitela, kako bi dobile pristup drenažnim limfnim žilama, uključujući i Peyerove mrlje. Pretpostavka je da je potreban mehanizam prolaska kroz GI epitel, bilo to u obliku primarne lezije ili na neki drugi način, koji bi izbjegao barijeru. O kolesterolu ovisni citolizini su porodica toksina koji su odgovorni za stvaranje pora, a sintetiziraju ih brojne bakterije, *Archanobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* i *Streptococcus*. Jedna je skupina znanstvenika, istražujući cjelovitost Caco-2 *brush border expressor* stanica (C2BBE stanice), koje tvore polarizirane monoslojeve s *tight junctions* spojevima, primijetila da jedna vrsta citolizina pod imenom antrolizin O, koji je specifičan samo za *B. anthracis*, može poremetiti funkciju epitelne barijere. Smatra se da je funkcija epitelne barijere ugrožena upravo zbog disfunkcije ovoga sloja (Owen et al., 2015).

### **2.5.2.3. INHALACIJSKI ILI PLUĆNI ANTRAKS**

Inhalacijski antraks čini manje od 5% slučajeva antraksa. Bolest nastaje kao posljedica udisanja spora koje su promjera od 1 do 5  $\mu\text{m}$  (Savransky et al., 2020). Minimalna doza unesenih spora još nije najbolje proučena, no za čimpanze se smatra da ta brojka varira između 40 000 i 65 000 spora. Ministarstvo obrane SAD-a procjenjuje da je smrtonosna doza za 50% ljudske populacije oko 8 000 do 10 000 spora (Shafazand et al., 1999). Istraživanja provedena

na životinjama su pokazala da udahnute spore preuzimaju fagociti i dendritičke stanice i transportiraju ih do traheobronhijalnih i medijastinalnih limfnih čvorova. U njima dolazi do germinacije spora i stvaranja bakterijske kapsule i oslobađanja toksina. Inkubacija traje obično jedan do šest dana i to nakon izlaganja sporama. Na početku bolesti klinička slika nalikuje onoj kao kod gripe, s blagom vrućicom, glavoboljom, umorom i mialgijom, kašljanjem i nelagodnom u prsnoj koži. U drugoj fazi bolesti temperatura se povisuje, javlja se dispneja, cijanoza i septički šok. Meningitis kao komplikacija bolesti se može javiti u 50% slučajeva, kao i hemoragični pleuralni izljevi. Bez pravovremene intervencije, smrtnost je 100%, međutim čak i uz liječenje smrt se može javiti i u 95% slučajeva, ako se s terapijom započne otprilike 48 sati nakon pojave prvih simptoma (Savransky et al., 2020).

Početak 20. stoljeća slučajevi inhalacijskog antraksa kod ljudi u SAD-u javljali su se uglavnom kod onih koji su radili u tekstilnoj i kožnoj industriji i tada se antraks smatrao bolešću razvrstavanja vune. U kasnom 20. stoljeću, s povećanjem zdravstvene zaštite i pravilnom kontrolom među životinjama i njihovim proizvodima, učestalost antraksa je smanjena, međutim smrtni slučajevi inhalacijskog antraksa su i dalje vrlo visoki (Azarkar and Zare Bidaki, 2016). Ovaj tip antraksa danas dobiva punu pažnju jer je prijetnja biološkim ratom danas opet uvećana (Shafazand et al., 1999).

#### **2.5.2.4. ANTIBIOTICI I CJEPIVO**

Antibiotici su učinkoviti protiv antraksa samo ako se daju već u ranim fazama bolesti, kada su simptomi u određenoj mjeri nespecifični. Istraživanja provedena na životinjama pokazuju da bolest doseže razinu u kojoj antibiotici ne mogu zaustaviti širenje bakterija zbog nakupljanja velikih količina toksina. Antibiotici djeluju samo na već germinirane spore, stoga neaktivne spore mogu germinirati unutar domaćina i uzrokovati bolest nakon što se terapija antibioticima zaustavi. Iz tog razloga, kako bi se izbjeglo naknadno „buđenje“ spora, potrebno je uzimati antibiotike što dulji period. Eksperimenti s rezus majmunima koji su vrlo dobar model za proučavanje inhalacijskog antraksa, pokazali su da spore mogu ostati u plućima primata i aktivirati se i 60 dana nakon izlaganja sporama. Preporuča se cijepiti zaražene osobe na početku terapije kako bi se moglo prekinuti dugotrajno liječenje nakon što osoba razvije zaštitni imunitet. Većina je sojeva osjetljiva na razne antibiotike uključujući penicilin, fluorokinolone, tetracikline, kloramfenikol i aminoglikozide (Bouzianas, 2009).

Budući da je zaštitni antigen (PA) jak imunogen i njegovom neutralizacijom sprječava se nastanak bolesti, sva cjepiva koja se proizvode u svom sastavu sadrže PA. Današnja cjepiva protiv antraksa temelje se na primjeni oslabljenih bakterija koje proizvode toksine ili djelomično pročišćenih pripravaka PA. Postoji američko cjepivo *Anthrax Vaccine Adsorbed* (AVA) i britansko cjepivo, *Anthrax Vaccine Precipitated* (AVP). Učinkovitost acelularnih cjepiva povijesno je dokazana 1950.-ih godina prošlog stoljeća, kliničkim ispitivanjem provedenim među radnicima u tvornicama gdje je antraks bio uobičajena pojava. Doista, pokazalo se kako je primjena cjepiva rezultirala manjim brojem slučajeva kožnog i inhalacijskog antraksa u usporedbi s necijepljenim radnicima (Chitlaru et al., 2011).

### 2.5.3. ANTRAKS KAO BIOLOŠKO ORUŽJE

Mnogo je bioloških agenasa za potencijalnu upotrebu u bioterorizmu. Neki su lakše dostupni i lakši za korištenje od drugih. Najvjerojatniji uzročnici koji će biti uključeni u bioterorističke napade uključuju *B. anthracis*, *Yersinia pestis* (uzročnik kuge), *C. botulinum* (uzročnik botulizma), *Francisella tularensis* (uzročnik tularemije), a moguće i virusne uzročnike afričke hemoragijske groznice (Cunha, 2002). Brojni istraživački centri diljem svijeta istražuju korištenje raznih mikroorganizama za izazivanje bolesti kod ljudi, životinja i biljaka, a sve u svrhu kako bi se nanijela šteta neprijatelju. Napredovanjem znanosti, danas je postalo moguće genetičkim inženjerstvom modificirati organizme ili čak i stvoriti nove u vojne svrhe, ali *B. anthracis* po pitanju potencijalnog biološkog oružja ostaje vrlo zanimljiv. Razlog je što se ova bakterija može proizvesti u velikim količinama, a sam antraks može se pojaviti u više tipova. Čini se kako je vjerojatnost upotrebe antraksa kao biološkog oružja u današnjem svijetu vrlo mala, no strah postoji, a uporaba ove bakterije u potencijalnom biološkom ratu ne samo da je moguća, nego se već i dogodila.

Bilo je to na samome početku ovoga stoljeća kada je antraks došao u svijest među ljudima zahvaljujući medijskim izvještajima o obolijevanju ljudi u SAD-u. Dokazano je da su spomenuti slučajevi upravo posljedica uporabe *B. anthracis* kao biološkog oružja. O čemu se zapravo radi? Naime, (bio)teroristi koji su počinili ovakve zločine su slali spore bacila antraksa u omotnicama koje su pristizale poštom (Railean et al., 2023) novinarskim agencijama u New Yorku te Kongresu u Washingtonu u SAD-u (Schmid and Kaufmann, 2002). Mnogi ljudi koji su došli u kontakt s takvim omotnicama su ubrzo i preminuli, s obzirom na to da se na samome



početku bioterorističkog napada nije smatralo da je antraks uzrokovao ova oboljenja (Railean et al., 2023). Dokumentirana su 22 slučaja, a od toga pet ih je završilo smrtnim ishodom (Schmid and Kaufmann, 2002).

Još jedan slučaj namjernog ispuštanja antraksa dogodio se u Japanu '90.-ih godina prošloga stoljeća. Pripadnici japanskog vjerskog kulta osnovanog 1980., Aum Shinrikyo izveli su niz napada koristeći botulin toksin, plinove serin i cijanid te *B. anthracis* kao aerosol. Tijekom četverodnevnog razdoblja pripadnici kulta su ispustili spore antraksa iz uređaja za raspršivanje smještenog na najvišem katu osmerokatnice, ali srećom nije bilo zabilježenih slučajeva. Neuspjeh napada leži u soju koji je korišten, a radi se o identičnom soju koji je korišten za imunizaciju životinja. Također, niska koncentracija spora u tekućem mediju, začepljenje i niska učinkovitost uređaja mogli su pridonijeti neuspjehu ovog napada (Schmid and Kaufmann, 2002).

Krajem prošloga stoljeća na sastanku koji je sazvao američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (*Center for disease control and prevention, CDC*) u Atlanti, antraks je uvršten među šest najopasnijih bioloških agensa iz kategorije A, na temelju sljedećih četiri katarakteristika: utjecaj na javno zdravlje, potencijal širenja, javna percepcija i posebna javnozdravstvena pripremljenost (D'Amelio et al., 2015).

### 3. ZAKLJUČAK

*B. anthracis* postoji na Zemlji od davnina, međutim tek je nedavno privukao pažnju mnogih mikrobiologa i liječnika diljem svijeta. Razlozi za to su brojni, a neki od njih mogu uključivati: mogućnost antraksa da se pojavi u više varijanti, proizvodnja u visokim količinama, utjecaj na javnozdravstveni sustav itd. Obzirom da antraks pogađa brojne životinje, a posebice stoku, ostavlja brojne posljedice na gospodarski sustav države tj. ekonomiju. Živimo u stoljeću kada nam je sve lako dostupno, znanost napreduje iz dana u dan, a uključimo li u to bolje higijenske uvjete i svjesnost građana, slučajevi antraksa su sve manji. Međutim, izuzev gore navedenoga, u nekim afričkim i azijskim zemljama antraks i dalje predstavlja veliki izazov. Bez obzira na mali broj slučajeva danas, *B. anthracis* i infekciju antraksom treba shvatiti ozbiljno. Antraks je takvog karaktera gdje je potrebno na vrijeme prepoznati simptome bolesti i znakove potencijalnog bioterorističkog napada, a sve kako bi se uspostavila kontrola nad bolešću. Potrebno je provesti još mnoga istraživanja kako bismo još bolje razumjeli evoluciju i ekologiju ove, i dalje tajanstvene, bakterije.

## 4. LITERATURA

1. Alam, M., Kamal, M., Rahman, M., Kabir, A., Islam, M., Hassan, J., 2022. Review of anthrax: A disease of farm animals. *J Adv Vet Anim Res* 9, 323. <https://doi.org/10.5455/javar.2022.i599>
2. Azarkar, Z., Zare Bidaki, M., 2016. A case report of inhalation anthrax acquired naturally. *BMC Res Notes* 9, 141. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1955-0>
3. Bakhteeva, I., Timofeev, V., 2022. Some Peculiarities of Anthrax Epidemiology in Herbivorous and Carnivorous Animals. *Life* 12, 870. <https://doi.org/10.3390/life12060870>
4. Bouzianas, D.G., 2009. Medical countermeasures to protect humans from anthrax bioterrorism. *Trends in Microbiology* 17, 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.006>
5. Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2018. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 614–626. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy021>
6. Chitlaru, T., Altboum, Z., Reuveny, S., Shafferman, A., 2011. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunological Reviews* 239, 221–236. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00969.x>
7. Choate, L.A., Barshad, G., McMahon, P.W., Said, I., Rice, E.J., Munn, P.R., Lewis, J.J., Danko, C.G., 2021. Multiple stages of evolutionary change in anthrax toxin receptor expression in humans. *Nat Commun* 12, 6590. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26854-z>
8. Cote, C., Welkos, S., 2015. Anthrax Toxins in Context of *Bacillus anthracis* Spores and Spore Germination. *Toxins* 7, 3167–3178. <https://doi.org/10.3390/toxins7083167>
9. Cunha, B.A., 2002. Anthrax, tularemia, plague, ebola or smallpox as agents of bioterrorism: recognition in the emergency room. *Clinical Microbiology and Infection* 8, 489–503. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00496.x>
10. D'Amelio, E., Gentile, B., Lista, F., D'Amelio, R., 2015. Historical evolution of human anthrax from occupational disease to potentially global threat as bioweapon. *Environment International* 85, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.009>

11. Fajardo-Cavazos, P., Maughan, H., Nicholson, W.L., 2014. Evolution in the *Bacillaceae*. *Microbiol Spectr* 2, 2.5.02. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0020-2014>
12. Fasanella, A., Galante, D., Garofolo, G., Jones, M.H., 2010. Anthrax undervalued zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140, 318–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.016>
13. Fouet, A., 2009. The surface of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.001>
14. Friebe, S., Van Der Goot, F., Bürgi, J., 2016. The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins* 8, 69. <https://doi.org/10.3390/toxins8030069>
15. Gupta, R.C. (Ed.), 2020. Anthrax, in: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 433–459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819090-6.00074-X>
16. Head, B.M., Rubinstein, E., Meyers, A.F.A., 2016. Alternative pre-approved and novel therapies for the treatment of anthrax. *BMC Infect Dis* 16, 621. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1951-y>
17. Higgins, D., Dworkin, J., 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* 36, 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
18. Kalenić, S., 2019. *Medicinska mikrobiologija*, 2nd ed. Medicinska naklada, Zagreb.
19. 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, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.08.005>
20. Koehler, T. M., 2002. *Bacillus anthracis* Genetics and Virulence Gene Regulation, in: Koehler, Theresa M. (Ed.), *Anthrax, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 143–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-05767-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05767-4_7)
21. Koehler, T.M., 2009. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004>
22. Liang, X., Zhu, J., Zhao, Z., Zheng, F., Zhang, H., Wei, J., Ji, Yon, Ji, Yinduo, 2017. The pag Gene of pXO1 Is Involved in Capsule Biosynthesis of *Bacillus anthracis* Pasteur II Strain. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 203. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00203>
23. Lin, P., Yuan, H., Du, J., Liu, K., Liu, H., Wang, T., 2020. Progress in research and application development of surface display technology using *Bacillus subtilis* spores.

- Appl Microbiol Biotechnol 104, 2319–2331. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10348-x>
24. Liu, W., Nestorovich, E.M., 2021. Anthrax toxin channel: What we know based on over 30 years of research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863, 183715. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183715>
  25. Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., Van Elsas, J.D., 2015. Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiol Spectr* 3, 3.2.16. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
  26. McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* 11, 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
  27. Moayeri, M., Leppla, S.H., Vrentas, C., Pomerantsev, A.P., Liu, S., 2015. Anthrax Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 185–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104523>
  28. Nekić Dvorski, D., 2011. EKOLOŠKO ZBRINJAVANJE AKTIVNOG MULJA PREHRAMBENE INDUSTRIJE. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* 73, 317–336.
  29. Owen, J.L., Yang, T., Mohamadzadeh, M., 2015. New insights into gastrointestinal anthrax infection. *Trends in Molecular Medicine* 21, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.003>
  30. Perego, M., Hoch, J.A., 2008. Commingling regulatory systems following acquisition of virulence plasmids by *Bacillus anthracis*. *Trends in Microbiology* 16, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.010>
  31. Pilo, P., Frey, J., 2018. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infection, Genetics and Evolution* 64, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024>
  32. Railean, V., Sobolewski, J., Jaśkowski, J.M., 2023. Anthrax in one health in Southern and Southeastern Europe - the effect of climate change? *Vet Res Commun.* <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10238-3>
  33. Riley, E.P., Schwarz, C., Derman, A.I., Lopez-Garrido, J., 2021. Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microb Cell* 8, 1–16. <https://doi.org/10.15698/mic2021.01.739>
  34. Sapkota, A., 2022. *Bacillus anthracis*- An Overview [WWW Document]. URL <https://microbenotes.com/bacillus-anthraxis/> (accessed 9.21.24).

35. Savransky, V., Ionin, B., Reece, J., 2020. Current Status and Trends in Prophylaxis and Management of Anthrax Disease. *Pathogens* 9, 370. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050370>
36. Schmid, G., Kaufmann, A., 2002. Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clinical Microbiology and Infection* 8, 479–488. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00500.x>
37. Shafazand, S., Doyle, R., Ruoss, S., Weinacker, A., Raffin, T.A., 1999. Inhalational Anthrax. *Chest* 116, 1369–1376. <https://doi.org/10.1378/chest.116.5.1369>
38. Sidwa, T., Salzer, J.S., Traxler, R., Swaney, E., Sims, M.L., Bradshaw, P., O’Sullivan, B.J., Parker, K., Waldrup, K.A., Bower, W.A., Hendricks, K., 2020. Control and Prevention of Anthrax, Texas, USA, 2019. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 2815–2824. <https://doi.org/10.3201/eid2612.200470>
39. Sternbach, G., 2003. The history of anthrax. *The Journal of Emergency Medicine* 24, 463–467. [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(03\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(03)00079-9)
40. Stewart, G.C., 2015. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Rev* 79, 437–457. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-15>
41. Sun, J., Jacquez, P., 2016. Roles of Anthrax Toxin Receptor 2 in Anthrax Toxin Membrane Insertion and Pore Formation. *Toxins* 8, 34. <https://doi.org/10.3390/toxins8020034>
42. Swick, M.C., Koehler, T.M., Driks, A., 2016. Surviving Between Hosts: Sporulation and Transmission. *Microbiol Spectr* 4, 4.4.26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015>
43. Zasada, A.A., 2020. Detection and Identification of *Bacillus anthracis*: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. *Microorganisms* 8, 125. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010125>
44. Zhou, X., Li, Y., 2015. Basic Biology of Oral Microbes, in: *Atlas of Oral Microbiology*. Elsevier, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00001-X>