

Rafał Gierczyński

Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny  
ul. Chocimska 24, 00-791, Warszawa; e-mail: rgierczynski@pzh.gov.pl

1. Wprowadzenie – wąglik wczoraj i dziś. 2. Wąglik: rezerwuuar, objawy, leczenie i zapobieganie. 2.1. Wąglik – występowanie dawniej i obecnie. 2.2. Wąglik jako broń biologiczna i czynnik terroryzmu. 3. Charakterystyka i czynniki chorobotwórczości laseczki wąglika. 3.1. *Bacillus cereus* ssp. *anthracis*? 4. Identyfikacja laseczki wąglika. 5. Rozwój metod typowania szczepów laseczki wąglika. 5.1. MLVA. 5.2. SNR. 5.2. canSNPs. 6. Filogeneza i molekularna epidemiologia laseczki wąglika. 6.1. Zróżnicowanie szczepów *B. anthracis* w skali globalnej. 6.2. Zróżnicowanie izolatów *B. anthracis* w epidemiach lokalnych. 7. Charakterystyka molekularna szczepów laseczki wąglika w Polsce. 8. Podsumowanie

### Diagnostics and molecular epidemiology of *Bacillus anthracis*

**Abstract:** Although anthrax is rare in developed countries liable *B. anthracis* spores still remain in a soil in these European countries, where few decades ago the disease occurred yearly. In Poland anthrax was endemic for centuries. This has triggered vast genetic diversity of *B. anthracis* as shown by MLVA genotyping. Strains of two main phylogenetic lineages: A and B (B2) were found in Poland. This is in accordance with the global phylogeographic model of *B. anthracis* distribution. Lineage A is most numerous and encompasses diverse strains world-wide, while B1, B2 and the recently established C lineage are uncommon and seem to be geographically limited to South Africa, Europe and USA, respectively. *B. anthracis* is highly monomorphic within a single epidemic cycle and is capable to occupy the same territory for decades, where it remains apparently unaltered. Anthrax agent has followed ancient tribes in their route from Africa to Europe, Asia and *via* Silk Road to China, then to North America. More recently anthrax emerged in Australia and in Texas, USA, where it was most probably brought by first settlers from England and China, respectively.

1. Introduction – anthrax past: and present. 2. Anthrax: infection-cycle, clinical manifestations, treatment and prevention. 2.1. Occurrence of anthrax – history and today. 2.2. *B. anthracis* – warfare and terrorist agent. 3. Biological features and virulence factors of the anthrax agent. 3.1. *Bacillus cereus* ssp. *anthracis*? 4. *B. anthracis* identification and diagnostics. 5. Molecular approaches to *B. anthracis* typing – development and description. 5.1. MLVA. 5.2. SNR. 5.2. canSNPs. 6. Phylogeny and molecular epidemiology of *B. anthracis*. 6.1. Diversity of the global *B. anthracis* population. 6.2. Monomorphism of *B. anthracis* isolates in local outbreaks. 7. Molecular characterization of *B. anthracis* in Poland. 8. Concluding remarks

---

**Słowa kluczowe:** *Bacillus anthracis*, MLVA, canSNPs, SNR

**Key words:** *Bacillus anthracis*, MLVA, canSNPs, SNR

---

## 1. Wprowadzenie – wąglik wczoraj i dziś

Wąglik jest ostrą chorobą zakaźną zwierząt roślinożernych, które pośrednio stanowią główne źródło zakażeń ludzi i zwierząt drapieżnych [8]. Zapisy historyczne wskazują, że zoonoza ta trapiła ludzkość już za czasów Homera. Jej etiologiczny czynnik – laseczkę wąglika (*Bacillus anthracis*) – odkryto w pierwszej połowie XIX w. W tym czasie choroba dziesiątkowała bydło i owce w Europie [43]. Jej ofiarami stawali się często ludzie, którzy zajmowali się zakażonymi zwierzętami lub trudnili się obróbką produktów pochodzenia zwierzęcego. Wysoką śmiertelność na wąglik odnotowywano przeważnie wśród osób zajmujących się przeladunkiem skór i sierści zwierząt. W Polsce, jeszcze w latach międzywojennych wąglik stanowił plagę. Epidemie tej choroby zdarzały się corocznie jeszcze w latach 1950–1960 [28]. Natomiast w kolejnym dwudziestolecu liczba zachorowań uległa tak znacznemu

ograniczeniu, że od początku lat 90. przypadki tej choroby odnotowywane były jedynie sporadycznie.

Obecnie w Europie naturalne epidemie wąglika wśród zwierząt zdarzają się w południowych Włoszech [9]. Choroba ta wciąż występuje endemicznie w azjatyckiej części Turcji [16], w Pakistanie i sąsiadujących prowincjach Indii [37], a także w Chinach [39], w Afryce, w niektórych stanach USA [39] i Ameryce Południowej.

W przeciwieństwie do początkowego okresu XX wieku, obecnie wąglik jako odzwierzęca choroba ludzi występuje na tyle rzadko, że lekarze klinicyści mają trudności z jej szybkim i jednoznacznym rozpoznaniem. Taka sytuacja zaistniała w 2001 roku w USA, gdzie doszło do epidemii tej choroby u ludzi [14]. Przyczyną zakażeń były przesyłki pocztowe celowo skażone przetrwalnikami *B. anthracis* i rozesłane w ramach działań o charakterze terrorystycznym. Od tego czasu, wąglik postrzegany jest przez opinię

publiczną i ekspertów jako choroba, która może zagrozić społeczeństwu na masową skalę w wyniku aktu terrorystycznego [4]. Z tego względu, w ostatnich latach szczególną wagę przywiązywano do badań mających na celu rozwój metod umożliwiających szybką identyfikację laseczki węgliką oraz pozwalających na efektywne różnicowanie szczepów tego drobnoustroju, celem zwiększenia skuteczności dochodzenia epidemiologicznego ognisk węgliką. Pośrednio, działania te przyczyniły się też do znacznego wzrostu wiedzy w zakresie biologii, molekularnej epidemiologii i filogenetyki *B. anthracis*.

## 2. Wąglik: rezerwuuar, objawy, leczenie i zapobieganie

Naturalnym rezerwuarem laseczki węgliką jest gleba skażona przetrwalnikami *B. anthracis*. Przetrwalniki, zwane potocznie sporami, są odporne na skrajne warunki środowiska, podstawowe środki higieniczne i dezynfekcyjne, a ponadto mogą przez dziesięciolecia zachowywać zdolność wywoływania zakażeń. W okresie ulewnych deszczy przetrwalniki laseczki węgliką są wymywane z gleby i zostają przenoszone przez wodę do zagłębień terenu, gdzie po opadnięciu wody osadzają się na powierzchni roślin znajdujących się na ich dnie [8]. Następnie, wraz z roślinnością, przetrwalniki są zjadane, a także wdychane przez żerujące zwierzęta roślinożerne, u których dochodzi do „kiełkowania” przetrwalników (germinacja) i rozwinięcia się form wegetatywnych – Gram-dodatnich laseczek węgliką. Formy wegetatywne dzięki wytwarzaniu specyficznej toksyny i obfitej otoczki szybko mnożą się w organizmie zwierzęcia, licznie występują we krwi oraz w innych płynach ustrojowych i w okresie 2–4 dni powodują toksemie i śmierć zwierzęcia. Zgon poprzedzony jest z reguły silnymi zaburzeniami neurologicznymi, które zwiększają podatność zwierzęcia na atak drapieżników, czy też w przypadku zwierząt hodowlanych, wpływają na podjęcie decyzji o ich uboju.

Laseczki węgliką znajdujące się w płynach ustrojowych bardzo szybko wytwarzają przetrwalniki, które wraz z płynami fizjologicznymi wyciekają ze zwłok do gruntu lub zakażają zwierzęta drapieżne albo ludzi zajmujących się obróbką skór, sierści i kości zwierząt zakażonych tym drobnoustrojem [42].

W zależności od wrót zakażenia u ludzi wyróżnia się trzy podstawowe kliniczne postaci węgliką: skórną, płucną i żołądkowo-jelitową [15].

Postać skórną, do której dochodzi poprzez przeniknięcie przetrwalników węgliką przez skórę w miejscach zranień, jest najczęściej obserwowana u osób mających kontakt z chorymi zwierzętami lub trudniących się tradycyjną uprawą ziemi na obszarach skażonych przetrwalnikami. W miejscu wnikięcia przetrwalników,

na skórze pojawia się charakterystyczna czarna krostka ze strupem otoczonym pęcherzykami [15]. Postać skórną, zwłaszcza zlokalizowaną z dala od głowy (dłonie, stopy) często ulega samowyleczeniu w ciągu kilku tygodni. Przy innym umiejscowieniu zmian, może dojść do przedostania się laseczek węgliką do krwioobiegu i wstępującej posocznicy, która od trzeciej doby po wystąpieniu pierwszych objawów jest z reguły śmiertelna, nawet gdy stosuje się właściwą antybiotykoterapię [42].

Postać płucną węgliką rozwija się u osób, które przebywały w pomieszczeniach, w których rozpylone były przetrwalniki *B. anthracis*. W XIX wieku, ta postać choroby występowała u dokerów w Anglii, którzy zajmowali się przeładunkiem importowanych skór, sierści i runa owczego. Aktualnie na wystąpienie postaci płucnej narażone mogą być głównie ofiary ataku bio-terrorystycznego. Przyjmuje się, że do efektywnego zakażenia człowieka wystarcza dawka 8–10 tys. przetrwalników [15]. Zakażenie objawia się jako ostre, przypominające grype, zapalenie dróg oddechowych, które po 2–4 dniach przechodzi w ciężką niewydolność oddechową z towarzyszącą posocnicą. Z reguły chorzy, u których pojawiły się takie objawy umierają w ciągu kolejnych 36–48 godzin nawet, gdy są poddawani właściwej antybiotykoterapii i leczeniu objawowemu [15].

Postać żołądkowo-jelitową występuje u osób które spożyły mięso zwierzęcia chorego na wąglik, a w szczególności, gdy nie zostało ono poddane długotrwałej obróbce termicznej. Objawy zakażenia są nietypowe (nudności, bóle brzucha, gorączka i krwawa biegunka). U 25–60% osób zakażonych dochodzi do toksemii, sinicy i zgonu w okresie od 2 do 5 dni od wystąpienia objawów. Podobnie jak przy postaci płucnej szanse na wyleczenie są nikłe.

Leczenie polega na jak najwcześniejszym podaniu antybiotyku i ewentualnym leczeniu objawowym. Większość dzikich szczepów laseczki węgliką jest wrażliwa na penicylinę, doksycylinę, makrolidy i ciprofloksacynę [15]. U osób, u których podejrzewana jest inhalacja przetrwalników *B. anthracis* wskazane jest stosowanie antybiotykoterapii prewencyjnej przez 6 dni, a niekiedy także przez okres do 40 dni. Szczepienia dają późną i krótkotrwałą odporność. Przeznaczone są dla osób z grup ryzyka.

Zapobieganie szerzeniu się węgliką u zwierząt hodowlanych polega na odizolowaniu i sanitarnym uboju osobników zakażonych lub podejrzanych o zakażenie oraz właściwej utylizacji zwłok – spalanie lub ostatecznie umieszczenie zwłok w głębokim wykopie [15]. Do niedawna zalecano też posypywanie zwłok wapnem chlorowanym, lecz ostatnie doniesienia wskazują, że zabieg ten może być niewskazany [3]. Pomocne bywa też stosowanie szczepień zapobiegawczych u zwierząt

na terenach przyległych do miejsca wystąpienia zachorowań [15], gdyż istnieje możliwość roznoszenia choroby przez owady gryzące [8].

## 2.1. Wąglik – występowanie dawniej i obecnie

Zdaniem części autorów, piąta i szósta plaga egipska opisana w Biblii może prawdopodobnie stanowić jeden z najstarszych zapisów świadczących o występowaniu wąglika. Wiernie przypominające wąglika opisy objawów chorobowych u ludzi i zwierząt można znaleźć już w zapiskach antycznych [43]. Wyniki analizy tych zapisów sugerują, że wąglik towarzyszył człowiekowi już w czasach bitwy o Troję. Na przestrzeni wieków wąglika opisywany był wielokrotnie, także w pismach Hipokratesa, Galena i autorów z X wieku. We Francji, Włoszech, Anglii, Polsce i Węgrzech wągliki pojawiały się często w tekstach różnych autorów z okresu XVI–XVIII w [43]. W kolejnym stuleciu, choroba ta stanowiła istotny problem zdrowotny ludzi i była poważną przyczyną strat w hodowli zwierząt.

Zapisy historyczne i dane epidemiologiczne wskazują, że wągliki w Polsce występowały od dawna i stanowiły poważny problem. Dane z lat 1923–1927 pokazują, że w tym okresie chorobę rozpoznano u 19 tys. zwierząt w 4,5 tys. gospodarstwach w Polsce [28]. Rocznie zakażeniu ulegało w tym czasie około 60 osób. W latach 1951–1961 liczba zachorowań u ludzi w kraju spadła do około 10 przypadków rocznie, podczas gdy na półwyspie Iberyjskim i Apenińskim oraz na Bałkanach zachorowania stwierdzano u setek osób [28].

W czasach obecnych zachorowania ludzi na wągliki w Polsce praktycznie nie występują. Odnotowywane są one natomiast w Azji Mniejszej i przylegającej części Indii [37]. Na początku 2010 r. pojawiły się alarmujące doniesienia o przypadkach tej choroby w Szkocji [36] i w Niemczech [35]. Łącznie zakażenie laseczką wąglika potwierdzono u 15 osób, z których 8 zmarło. Źródłem zakażenia była prawdopodobnie heroina zanieczyszczona przetrwalnikami *B. anthracis*, którą narkomani podawali sobie dożylnie.

W USA stwierdzano też przypadki zakażeń laseczką wąglika u rzemieślników wytwarzających ludowe instrumenty muzyczne, głównie bębny. Instrumenty te były wytwarzane z zachowaniem tradycyjnej afrykańskiej technologii i naturalnych materiałów. Przypadki wąglika odnotowywano też sporadycznie u osób wykorzystujących tego typu instrumenty.

W od wielu lat ogniska wąglika u zwierząt zdarzały się w USA, głównie w stanach Nebraska, Iowa i w obu stanach Dakota oraz w okolicach stanu Teksas [39]. W Europie zachorowania odnotowywano we Włoszech i Francji [9]. W Australii, gdzie chorobę tę uznano za opanowaną, na przełomie lat 2007 i 2008

w rejonie miejscowości Hunter Valley nieoczekiwanie pojawiło się duże ognisko wąglika u bydła [7]. Uznano, że zwierzęta zakażyły się przetrwalnikami pozostałymi po ubiegłych epidemiach, z których ostatnia miała miejsce w 1939 r. Przetrwalniki te zostały wymyte z gleby przez ulewne deszcze, które padały w połowie i pod koniec 2007 r. Według ostatnich danych prasowych, podobna sytuacja miała również niedawno miejsce w Słowacji. Natomiast u dzikich zwierząt epidemie wąglika odnotowywane są regularnie w parkach narodowych w USA i Kanadzie [29], we Włoszech [8] i w RPA [40].

## 2.2. Wąglik jako broń biologiczna i czynnik terroryzmu

W okresie I wojny światowej podjęto pierwsze próby wykorzystania wąglika jako broni biologicznej. W trakcie II wojny światowej zainteresowanie militarnym wykorzystaniem laseczki wąglika znacznie wzrosło w Wielkiej Brytanii i USA [43]. W kolejnych latach działania te rozwijał ZSRR, aż do poważnego wypadku w Swierdłowsku, gdzie w 1979 roku w wyniku awarii zachorowało i zmarło kilkadziesiąt osób [31].

W czerwcu 1993 roku terroryści z japońskiej sekty Aum Shinrikyo po raz pierwszy wykorzystali hodowlę laseczek wąglika przeciwko mieszkańcom miasta Kameido [18]. Szczęśliwie, aparat rozpylający zawieszinę bakteryjną został szybko wykryty, a szczep którym posłużyli się terroryści był szczepem szczepionkowym, o obniżonej zjadliwości, dzięki czemu atak ten nie spowodował ofiar. Kolejny atak bio-terrorystyczny miał miejsce w USA w 2001 roku. Łącznie zakażeniu uległy tam 22 osoby, z czego 5 zmarło [14].

## 3. Charakterystyka i czynniki chorobotwórczości laseczki wąglika

Formy wegetatywne *B. anthracis* są Gram-dodatnimi laseczkami tworzącymi charakterystyczne kolonie na pożywce z dodatkiem krwi baraniej, które kształtem przypominają głowę meduzy. Większość dzikich szczepów nie wykazuje zdolności do ruchu i hemolizy, choć znane są wyjątki [42]. Chorobotwórczość laseczki wąglika związana jest głównie z dwoma czynnikami: toksyną i otoczką.

W 1961 roku wykazano, że toksyna wąglika składa się z trzech komponentów: czynnika obrzęku (Edema factor) czynnika letalnego (Lethal factor) oraz antygeny ochronnego (Protective antigen), a w latach 1980–1989 poznano sekwencje aminokwasowe tych podjednostek i opracowano model działania toksyny [25]. Wykazano, że podjednostki toksyny kodowane są przez

geny: *pagA*, *lef* i *cya* zlokalizowane w plazmidzie pX01 (181,6 kpz). Geny te znajdują się w obrębie wyspy patogenności o wielkości 44,8 kb, która obejmuje również geny regulatorowe, kontrolujące wytwarzanie toksyny. Wyspa ta zawiera także geny odpowiedzialne za proces kiełkowania przetrwalników, zgrupowane w operon *gerX* [30].

Otoczkę, będącą drugim istotnym czynnikiem chorobotwórczości *B. anthracis*, opisano w 1903 roku. W latach 1933–1937 udało się ją oczyścić i wykazać, że zbudowana jest z polimeru kwasu D-glutaminowego [27]. Prawie pięćdziesiąt lat później stwierdzono, że wytwarzanie otoczki warunkują geny *capA*, *capB* i *capC*, zlokalizowane w plazmidzie pX02 (96,2 kpz). Geny te wraz z genem *dep* związanym z depolimeryzacją otoczki, tworzą w plazmidzie pX02 wyspę patogenności [27, 33]. Późniejsze badania przyczyniły się do identyfikacji czynników inicjujących wytwarzanie toksyny i otoczki oraz lepszego poznania mechanizmów regulujących procesy wytwarzania i kiełkowania przetrwalników *B. anthracis*.

Analiza porównawcza kompletnych genomów różnych szczepów *B. anthracis* wykazała, że drobnoustroje należące do tego gatunku charakteryzują się niezmiernie wysokim podobieństwem sekwencji nukleotydów oraz niemal bez wyjątku, posiadają identyczną organizację genomu [20]. Warto zauważyć, że blisko 37% szczepów *B. anthracis* znajdujących się obecnie w kolekcjach laboratoryjnych na świecie wykazuje zróżnicowanie nie przekraczające 100 pojedynczych mutacji punktowych (SNPs) [21].

### 3.1. *Bacillus cereus* ssp. *anthracis*?

Badania molekularne przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu pokazały, że *B. anthracis* jest blisko spokrewniony z kilkoma innymi gatunkami laseczek z rodzaju *Bacillus*, określanymi mianem „grupy *Bacillus cereus*” [20]. Uważa się, że laseczka wąglika mogła wyewoluować z gatunku *B. cereus* (*sensu stricto*) lub *B. thuringiensis*, w wyniku pozyskania plazmidów pX01 i pX02, które umożliwiły temu drobnoustrojowi skuteczne namnażanie się w organizmie zwierząt roślinożernych. Co więcej, stale rośnie liczba danych piśmiennictwa, które wskazują, że proces przechwytywania plazmidów, wykazujących znaczą homologie do pX01 i pX02, przez różne szczepy *B. cereus* i *B. thuringiensis* wciąż zachodzi w środowisku [24]. Podobieństwo „genetycznego szkieletu” laseczki wąglika i innych przedstawicieli grupy *B. cereus*, a także fakt, że część szczepów z tej grupy może posiadać plazmidy przypominające pX01 i pX02 znacząco utrudnia molekularną identyfikację laseczki wąglika, zwłaszcza w próbkach materiału ze środowiska [6, 24].

## 4. Identyfikacja laseczki wąglika

Początkowo identyfikacja *B. anthracis* ograniczała się do prób biologicznych na zwierzętach. W 1903 roku McFadyean opracował metodę barwienia błękitem metylenowym pozwalającą obserwować otoczkę *B. anthracis*. Od 1966 r. zastosowanie w izolacji i identyfikacji laseczki wąglika znalazło selektywne podłoże PLET (polimyksyna-lizozym-EDTA-octan talawy) opisane przez Knisleya [23]. W nielicznych laboratoriach do identyfikacji *B. anthracis* wykorzystywany jest też specyficzny bakteriofag gamma, wyosobniony w 1955 r. przez Brown i Cherry [2].

Natomiast testami PCR poszukuje się przeważnie plazmidowych genów związanych z wytwarzaniem toksyny wąglika lub otoczki, co wystarcza do identyfikacji dzikich szczepów *B. anthracis* lecz jest mało przydatne dla wykrywania szczepów, które utraciły jeden lub dwa plazmidy. Co więcej, testy te mogą dawać wyniki wątpliwe lub nawet fałszywie dodatnie, gdy w badanym materiale znajdować się będą laseczki z grupy *B. cereus* posiadające plazmidy homologiczne do pX01 i pX02 [32, 33]. Chociaż, sytuacja taka zdarza się w diagnostyce wąglika rzadko, to może ona stanowić istotny problem w badaniach próbek materiału środowiskowego na obecność laseczki wąglika [6]. Dlatego, dla potrzeb identyfikacji *B. anthracis* opracowano szereg chromosomalnych markerów, w tym: BA813, SG749 [5], *rpoB* [45], z których najbardziej swoisty jest regulatorowy gen *plcR* [19]. Gen ten zawiera pojedynczą mutację punktową typu non-sens, która powoduje, że jego produkt ulega skróceniu u *B. anthracis* podczas, gdy u innych szczepów z grupy *B. cereus* jest on wytwarzany w normalnej długości. Uważa się, że zmiana wielkości białka regulatorowego PlcR wpływa na szereg funkcji w komórce, odróżniając laseczkę wąglika od innych laseczek z grupy *B. cereus* [1]. Co ważne, obecność tej mutacji w *plcR* można wykryć przy już użyciu podstawowych technik molekularnych [11].

## 5. Rozwój metod typowania szczepów laseczki wąglika

Badania prowadzone w latach 1990–2000 pokazały, że szczepy *B. anthracis* charakteryzują się znikomym zróżnicowaniem genetycznym. Zauważono, że techniki przydatne do genotypowania innych bakterii, w tym PFGE (makrorestrykcyjna analiza chromosomalnego DNA i elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym), są bezużyteczne przy próbach typowania szczepów laseczki wąglika. Dopiero zastosowanie metody AFLP (polimorfizm amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych) pozwoliło dokonać pierwszej udanej próby różnicowania szczepów laseczki wąglika, co

przyczyniło się do odkrycia dwóch głównych linii filogenetycznych *B. anthracis* [13]. Opracowanie bardziej wydajnych metod różnicowania szczepów laseczki wąglika stało się możliwe dopiero po poznaniu sekwencji nukleotydowej genomu *B. anthracis* [38]. Wyśiłki w tym zakresie zostały zintensyfikowane po wydarzeniach z 2001 r. w USA tak, że do chwili obecnej poznane zostały genomy pięciu szczepów *B. anthracis*. Porównawcza analiza genomów różnych szczepów laseczki wąglika potwierdziła wyjątkową genetyczną jednorodność tego drobnoustroju [44].

### 5.1. MLVA

Dochodzenie epidemiologiczne ognisk wąglika niezmiernie ułatwiła nowa metoda genotypowania *B. anthracis*, wykorzystująca polimorfizm tandemowych sekwencji powtórzonych: variable-number tandem-repeats (VNTR) [17]. Sekwencje te charakteryzuje tak wysoka zmienność, że uznawane są one za najbardziej polimorficzne odcinki genomu bakteryjnego. Metoda ta, zwana multiple-locus VNTR-analysis (MLVA), została opracowana w 2000 roku. Dzięki wykorzystaniu ośmiu wysoce polimorficznych markerów VNTR (*vrrA*, *vrkB*<sub>1</sub>, *vrkB*<sub>2</sub>, *vrnC*<sub>1</sub>, *vrnC*<sub>2</sub>, CG3, pXO1-*aat*, pXO2-*at*) po raz pierwszy osiągnięto wysoki potencjał dyskryminacyjny w różnicowaniu szczepów *B. anthracis*. Wyróżniono 89 genotypów wśród 426 szczepów laseczki wąglika, co pokazało, że MLVA jest skuteczną metodą genotypowania *B. anthracis*.

Aby zapewnić wyższy potencjał różnicujący metody MLVA, w kolejnych latach zwiększono liczbę markerów VNTR do 15 [44], a nawet do 25 [26], uzyskując szczegółowy wgląd w globalną i lokalną strukturę populacji *B. anthracis*. Metoda ta umożliwiła przygotowanie dokładnych modeli filogenetycznych *B. anthracis* [17, 39, 44].

### 5.2. SNR

W 2006 roku opracowano nową metodę subtypowania *B. anthracis*, która pozwalała na różnicowanie szczepów należących do tego samego genotypu MLVA [41]. Metoda ta przypomina swoimi założeniami MLVA lecz przedmiot analizy stanowi 21 markerów (loci) zawierających powtórzenia jednonukleotydowe (Single Nucleotide Repeats). Metoda SNR wymaga stosowania technik gwarantujących odróżnianie odcinków DNA różniących się tylko pojedynczym nukleotydem. Ze względu na dużą pracochłonność tego typu analiz, inni autorzy wykorzystywali w swoich badaniach jedynie cztery markery wykazujące największy potencjał różnicujący [22]. Metoda SNR okazała się przydatna w epidemiologicznym dochodzeniu lokalnych ognisk wąglika u dzikich zwierząt [9].

### 5.2. canSNPs

Porównawcza analiza genomów różnych szczepów laseczki wąglika umożliwiła opracowanie kolejnej metody różnicowania *B. anthracis* [44]. Metoda ta wykorzystuje 14 specyficznych *loci* zawierających punktowe mutacje reprezentatywne dla 12 linii filogenetycznych *B. anthracis* [34, 39]. Mutacje te, a właściwie polimorficzne nukleotydy, nazywane są polimorfizmami kanonicznymi (canSNP), gdyż pozwalają zidentyfikować poszczególne linie filogenetyczne *B. anthracis* bez konieczności każdorazowego badania kilkuset nukleotydów polimorficznych rozproszonych w całym genomie [34]. Ta nowa metoda typowania jest często stosowana w połączeniu z MLVA [44, 39] i może być szczególnie przydatna w charakteryzowaniu szczepów wyisobnionych w trakcie dochodzeń epidemiologicznych ognisk wąglika i w rekonstrukcjach filogenetycznych [44, 39, 31].

## 6. Filogeneza i molekularna epidemiologia laseczki wąglika

Wyniki badań szczepów pochodzących z wielu krajów (USA, Francja, Polska, Włochy, RPA, Kanada, Rosja, Chiny) pokazują, że wąglik jest zoonozą wywodzącą się z południa Afryki, która rozprzestrzeniła się globalnie wraz z wędrownymi plemionami pasterskimi [44]. Choroba dotarła do Europy, Azji i jedwabnym szlakiem do Chin [39]. W 1847 roku wąglik został zawleczony przez osadników do Australii. Podobnie, w początku XIX wieku wąglik dotarł do południowych rejonów Ameryki Północnej [39]. Natomiast do północnej części tego kontynentu choroba mogła zostać zawleczona już przez pierwotne plemiona wędrownie, które kilka tysięcy lat temu przebyły Cieśninę Beringa [39].

Wyniki przeprowadzonego niedawno genotypowania szczepów *B. anthracis* wyizolowanych w Chinach wskazują, że występujący na południu USA szczep Ames wywodzi się najprawdopodobniej z Chin, a nie z Europy czy też z Ameryki Północnej [39].

### 6.1. Zróżnicowanie szczepów *B. anthracis* w skali globalnej

Połączenie MLVA i can-SNP pozwoliło uzyskać szczegółowy wgląd w przebieg i dynamikę lokalnych epidemii wąglika, a także umożliwiło stworzenie ujednoczonego, modelu filogenetyczno-geograficznego *B. anthracis* w skali globalnej [44, 39].

Obecnie wiadomo, że gatunek *B. anthracis* obejmuje dwie główne linie filogenetyczne: A i B, z których linia A grupuje liczne i wyraźnie zróżnicowane szczepy występujące obecnie na wszystkich zamieszkałych

przez człowieka kontynentach, zaś linia B ogranicza się do szczepów występujących w południowej części Afryki (B1), których część również trafiła do Europy (linia B2), gdzie utrzymują się od lat w swojej niszy ekologicznej [10, 21]. Szczepy z grupy B2 wykrywano we Francji, w Polsce i na Bałkanach [10]. Ponadto w Ameryce Północnej znaleziono też nieliczne szczepy, które reprezentują odrębną linię filogenetyczną – C. Część autorów uważa, że linia C obejmuje filogenetycznie najstarsze szczepy *B. anthracis* [34]. Szczepy linii C wykryto w trakcie szeroko zakrojonych badań, które nie były jak dotąd prowadzone na taką skalę poza USA, z tego względu nie można jednoznacznie wykluczyć występowania szczepów linii C także na innych kontynentach.

Szczepy *B. anthracis* z linii A reprezentują dwa duże rejonu geograficzne: zachodnią Amerykę Północną (WNA) i Eurazję (TEA), które łącznie obejmują około 37% populacji. Ponadto można tu wyróżnić też dwie kolejne grupy szczepów: Vollum (5%) i Ames (1%).

Wśród szczepów z linii B dominuje afrykańska podgrupa B1 – do niedawna uważana za najbardziej pierwotną populację laseczki wąglika – obejmująca około 6%, a także mniej liczna afro-europejska grupa B1 (1%). Szczepy linii C obejmują zaledwie 0,2% populacji.

Na obszarze obu Ameryk dominują liczebnie klonny *B. anthracis* z linii A reprezentujące jednakowy lub zbliżony typ MLVA i canSNP, co może być następstwem względnie niedawnego zawleczenia choroby i szybkiego szerzeniem się jej czynnika etiologicznego, czemu sprzyjać może intensywna hodowla bydła w formie dużych stad. Porównywalny stopień klonalności obserwowano też wśród szczepów *B. anthracis* wyizolowanych w Australii [44], gdzie wąglik zawleczono zaledwie 160 lat temu.

## 6.2. Zróżnicowanie izolatów *B. anthracis* w epidemiach lokalnych

Badania prowadzone w Parku Narodowym Pollino, Basilicata w południowych Włoszech, gdzie od lat okresowo zdarzają się naturalne epidemie wąglika wśród dziko-żyjących zwierząt roślinożernych pozwoliły śledzić cykle epidemiczne wąglika i wykazały jedynie śladowy zakres molekularnego zróżnicowania poszczególnych izolatów *B. anthracis* wyosabnionych od kolejnych zwierząt, które padły na wąglik w trakcie szerzenia się epidemii tej choroby [9]. Wyniki tych badań pokazały, że z jednym wyjątkiem, zachorowania w 41 ogniskach, do których doszło w trakcie epidemii, spowodowane były tym samym szczepem *B. anthracis*. Szczep ten występował na terenie parku od lat. Podobnych informacji dostarczyły też wyniki analogicznych badań przeprowadzonych w Kanadzie [29].

## 7. Charakterystyka molekularna szczepów laseczki wąglika w Polsce

Przeprowadzone metodą MLVA retrospektywne badania szczepów *B. anthracis* wyizolowanych w Polsce [10, 12] wykazały wysoki, w porównaniu do innych krajów europejskich, stopień zróżnicowania szczepów laseczki wąglika w kraju. Dostępne dane piśmiennictwa wskazują, że na terenie Polski występowały szczepy *B. anthracis* należące przynajmniej do 7 różnych genotypów MLVA, które reprezentowały dwie główne linie filogenetyczne A i B (B2). Tak znaczne zróżnicowanie populacji *B. anthracis* w Polsce może być następstwem efektywnej, lokalnej ewolucji szczepów tego drobnoustroju, która zachodziła przez kolejne stulecia, podczas rokrocznych epidemii wąglika. Ponadto, szczepy z różnych rejonów Europy i Azji Mniejszej mogły być na przestrzeni stuleci sprowadzane na teren Polski wraz z migrującymi stadami bydła, owiec i koni, w następstwie licznych działań wojennych bądź wymiany handlowej.

## 8. Podsumowanie

Wąglik, jako choroba zwierząt i ludzi została w Polsce i w Europie niemal całkowicie wyeliminowana, choć są regiony gdzie wciąż występuje ona endemicznie. Należy też pamiętać, że przetrwalniki *B. anthracis* zachowują żywotność przez wiele dziesięcioleci i przy korzystnych warunkach pogodowych (ulewne deszcze, powódzie) mogą zostać wyplukane z gleby i wywołać lokalne ogniska wśród zwierząt na terenach, na których od dziesięcioleci nie obserwowano tej choroby. Z tego względu konieczne jest podtrzymywanie stałej zdolności do szybkiej identyfikacji i typowania tego drobnoustroju w kraju, co ze względów ekonomicznych powinno być w gestii stałego, referencyjnego laboratorium.

Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie pozwoliły poznać filogenezę i molekularną epidemiologię laseczki wąglika, czyli dostrzec zależności pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym szczepów *B. anthracis*, a ich geograficznym występowaniem, sposobem szerzenia się w trakcie epidemii, rezerwuarem i historycznym pochodzeniem. Drobnoustrój ten od wieków towarzyszył ludzkości i wraz z jej ekspansją wkraczał na nowe tereny i zajmował nowe nisze ekologiczne [21], w których pozostanie jeszcze przez wiele pokoleń.

## Piśmiennictwo

1. Agaisse H., Gominet M., Økstad O.A., Kolstø A.B., Lereclus D.: PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1043–1053 (1999)

2. Brown E.R., Cherry W.B.: Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.* **96**, 34–39 (1955)
3. Chelsea G. Himsworth. The danger of lime use in agricultural anthrax disinfection procedures: the potential role of calcium in the preservation of anthrax spores. *Can. Vet. J.* **49**, 1208–1210 (2008)
4. Chomiczewski K., Kocik J., Szkoda M.T.: Bioterroryzm. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
5. Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R., Sorlini C.: A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1298–1303 (1999)
6. Daffonchio D., N. Raddadi i wsp.: A strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1295–1301 (2006)
7. Durrheim D.N., Freeman P., Roth I., Hornitzky M.: Epidemiologic questions from anthrax outbreak, Hunter Valley, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 840–842 (2009)
8. Fasanella A., Galante D., Garofolo G., Jones M.H.: Anthrax undervalued zoonosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 318–331 (2010)
9. Garofolo G., Ciammaruconi A., Fasanella A., Scasciamacchia S., Adone R., Pittiglio V., Lista F.: SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic. *BMC Vet. Res.* **28**, 6–11 (2010)
10. Gierczyński R., Kałużewski S., Rakin A., Jagielski M., Zasada A., Jakubczak A., Borkowska-Opacka B., Rastawicki W.: Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland – the molecular echoes of the past outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**, 235–240 (2004)
11. Gierczyński R., Zasada A.A., Raddadi N., Merabishvili M., Daffonchio D., Rastawicki W., Jagielski M.: Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. *FEMS Microbiol. Letters*, **272**, 55–59 (2007)
12. Gierczyński R., Jakubczak A., Jagielski M.: Extended multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 3–7 (2009)
13. Jackson P.J., Hill K.K., Laker M.T., Ticknor L.O., Keim P.: Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 263–269 (1999)
14. Jernigan D.B., P. L. Raghunathan i wsp.: Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1019–1028 (2002)
15. Kałużewski S.: Wąglik (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. wyd. IV red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała 2007, str. 317–322
16. Karahocagil M.K., Akdeniz N., Akdeniz H., Calka O., Karsen H., Bilici A., Bilgili S.G., Evirgen O.: Cutaneous anthrax in Eastern Turkey: a review of 85 cases. *Clin. Exp. Dermatol.* **33**, 406–411(2008)
17. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugh-Jones M. E.: Multiple-locus variable-number tandem repeats analysis reveals genetic relationship within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **182**, 2928–2936 (2000)
18. Keim P., K.L. Smith i wsp.: Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4566–4567 (2001)
19. Keim P.: Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1995–1997 (2005)
20. Keim P., Gruendike J.M., Klevytska A.M., Schupp J.M., Challacombe J., Okinaka R.: The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects. Med.* **30**, 397–405 (2009).
21. Keim P.S., Wagner D.M.: Humans, evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 813–821 (2009)
22. Kenefic L.J., Trim C., Huynh L., Zanecki S., Matthews M., Schupp J., Van Ert M., Keim P.: A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*. *J. Microbiol. Methods*, **73**, 269–272 (2008)
23. Knisley R.F.: Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **92**, 784–286 (1966)
24. Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A.: What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 451–476 (2009)
25. Lacy D.B., Collier R.J.: Structure and function of anthrax toxin (w) w: Anthrax (red.) Koehler T.M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002
26. Lista F., Faggioni G. i wsp.: Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiology*, **6**, 33 (2006).
27. Makino S.I., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M.: Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**, 722–730 (1989)
28. Naruszewicz-Lesiuk D.: Wąglik (w) Choroby zakaźne w Polsce i ich zwalczanie w latach 1919–1962, red. Kostrzewski J., PZWL, Warszawa, 1964
29. Nishi J.S., Ellsworth T.R., Lee N., Dewar D., Elkin B.T., Dragon D.C.: Northwest Territories. An outbreak of anthrax (*Bacillus anthracis*) in free-roaming bison in the Northwest Territories, June–July 2006. *Can. Vet. J.* **48**, 37–38 (2007)
30. Okinaka R.T., Cloud K. i wsp.: Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* **181**, 6509–6515 (1999)
31. Okinaka R.T., Henrie M. i wsp.: Single nucleotide polymorphism typing of *Bacillus anthracis* from Sverdlovsk tissue. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 653–656 (2008)
32. Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske C.R.: *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J. Bacteriol.* **184**, 134–141 (2002)
33. Pannucci J., Okinaka R.T., Williams E., Sabin R., Ticknor L.O., Kuske C.R.: DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*; <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/3/34> (2002)
34. Pearson T., J.D. Busch i wsp.: Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13536–13541 (2004)
35. Radun D., Bernard H. i wsp.: Preliminary case report of fatal anthrax in an injecting drug user in North-Rhine-Westphalia, Germany, December 2009. *Euro. Surveill.* **14**, 15(2). pii: 19464 (2010)
36. Ramsay C.N, Stirling A. i wsp.: An outbreak of infection with *Bacillus anthracis* in injecting drug users in Scotland. *Euro. Surveill.* **14**, 15(2), pii: 19465 (2010)

37. Ray T.K., Hutin Y.J., Murhekar M.V.: Cutaneous anthrax, West Bengal, India, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 497–499 (2009)
38. Read T.D., Peterson S.N. i wsp.: The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, **423**, 81–86 (2003)
39. Simonson T.S., Okinaka R.T. i wsp.: *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiol.* Apr **15**, 9–71 (2009)
40. Smith K.L., DeVos V., Bryden H., Price L.B., Hugh-Jones M.E., Keim P.: *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3780–3784 (2000)
41. Stratilo C.W., Lewis C.T., Bryden L., Mulvey M.R., Bader D.: Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 777–782 (2006)
42. Turnbull, P.C.B. i wsp.: Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. 3rd ed. WHO/EMC/ZDI./98.6.
43. Turnbull P.C.B.: Anthrax history, disease and ecology [w:] Anthrax [red.] Koehler T.M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002
44. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M. i wsp.: Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PloS ONE*, **2** (5), e461 (2007)
45. Zasada A.A., Gierczyński R., Raddadi N., Daffonchio D., Jagielski M.: Some *Bacillus thuringiensis* strains share *rpoB* nucleotide polymorphisms also present in *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1606–1607 (2006)