

Występowanie przetrwalników *Bacillus anthracis* w środowisku

AGATA BIELAWSKA-DRÓZD, MICHAŁ BARTOSZCZE

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Bielawska-Drózd A., Bartoszcze M.

Bacillus anthracis spores in the environment

Summary

93 environmental samples were collected and tested using molecular biology techniques. The presence of chromosomal sequence Ba813 was detected in three soil samples (SS1, SS3, ZL2) and in three dental pulp samples (ZZ3, ZZ5, ZZ8). The presence of pag gene (210 bp) was observed in SS3 and ZL2 samples. There were no positive reactions with primers targeting the capsule encoding gene (777 bp). Multiplex PCR reaction enables identification of capC gene (264 bp) in five samples: SS3, ZL2, ZZ3, ZZ5, ZZ8. The presence of pag gene (SS3, ZL2) and cap gene (SS3, ZL2, ZZ5) were observed in standard PCR. *Bacillus anthracis* spores were detected by SMART test in three samples: SS3, ZL2 and ZZ5. These strains were non-hemolytic, sensitive to penicillin and gamma phage. The PCR positive for pag gene isolates were able to produce PA (protective antigen).

Keywords: *Bacillus anthracis*

Wąglík jest chorobą zakaźną wywołaną przez Gram-dodatnią laseczkę *Bacillus anthracis*. W środowisku zewnętrznym laseczki *Bacillus anthracis* występują jedynie w formie przetrwalników. Po dostaniu się do organizmu przechodzą one w postać wegetatywną, odpowiedzialną za produkcję toksyn, które są przyczyną choroby, a nawet śmierci zakażonego organizmu. Laseczki węgliką po uwolnieniu z ciała zakażonego zwierzęcia lub ze zwłok przez naturalne otwory ciała, przedostają się do środowiska zewnętrznego (np. gleba) i wówczas wytwarzają przetrwalniki, stanowiące źródło zakażenia. Przetrwalniki są niezwykle odporne na niekorzystne warunki środowiska, dzięki czemu mogą przetrwać w glebie nawet dziesiątki lat (11, 16, 17, 24). Zdolność kiełkowania przetrwalników poza organizmem zakażonym ma miejsce jedynie przy odpowiednim składzie podłoża i korzystnych warunkach środowiskowych (5, 19). Najwyższy wskaźnik zachorowań na wąglík notuje się w porze letnio-jesiennej, szczególnie po opadach deszczu, co wiąże się z wypłukiwaniem przetrwalników z głębszych warstw gleby. Do zakażenia zwierząt na terenach endemicznych może również dochodzić podczas suszy, kiedy trawa zjadana jest przez zwierzęta wraz z wysuszoną ziemią zawierającą przetrwalniki (11). Istniejące dane o występowaniu w Polsce grzebowisk zwierząt i miejsc zanieczyszczonych przetrwalnikami *Bacillus anthracis*, nakazywały zbadanie ich przy użyciu dostępnych

metod biologii molekularnej i metod bakteriologii klasycznej. Miejsca takie stanowią bowiem potencjalne zagrożenie dla środowiska naturalnego, zwierząt, jak i człowieka.

Celem badań było sprawdzenie obecności *Bacillus anthracis* w miejscach podejrzanych o zanieczyszczenie tym zarazkiem.

Materiał i metody

Próbki gleby do badań na obecność *Bacillus anthracis* pobierano z określonych miejsc w miejscowościach: Szkrzypiów* (ok. 21 km na płn. zach. od Buska-Zdroju, woj. świętokrzyskie) – (próbki SS) i Zakrzów* (ok. 17 km na zach. od Buska-Zdroju) – (próbki ZL), okolice Nabroża (ok. 38 km na płn. wsch. od Tomaszowa Lubelskiego, woj. lubelskie, gdzie w 2001 r. stwierdzono 7 przypadków węgliką u krów, okolice Pińczowa koło Buska-Zdroju (województwo świętokrzyskie), z gospodarstw, gdzie w 1994 r. zanotowano przypadki jelitowej i płucnej postaci węgliką u jałówek i 4 świń oraz postać skórą u rzeźnika, okolice Kolna koło Łomży (województwo podlaskie), z gospodarstw w Janowie (ok. 19 km na płn. wsch. od Białej Podlaskiej), gdzie zanotowano w 1996 r. 2 przypadki węgliką u krów oraz w Łosewie (ok. 45 km na płn. zach. od Łomży) – jeden przypadek węgliką u krowy. Probki gleby pobierano (z użyciem kombinezonów gazoszczelnych typu A) w ilości 100 gramów, z powierzchni 100 cm × 100 cm wierzchniej warstwy gleby (do 10 cm głębokości) do tore-

bek Biohazard, które następnie umieszczano w pojemnikach przeznaczonych do transportu materiałów zakaźnych. Próbki do czasu wykonania badań przechowywano w temp. 4°C. Ze szczątków szkieletu krowy podejrzanego o węglik zakopanej w lesie we wsi Zakrzów w gminie Pińczów koło Buska-Zdroju (próbki ZZ) pobrano próbki kości i zuchwy postępując z nimi w sposób opisany powyżej.

W badaniach bakteriologicznych stosowano podłoża: PLET A (Fluka BioChemika, USA), Muellera-Hintona (Zakłady Enzymów i Peptonów, Biotechnologia BTL spółka z o.o.), agar krwawy podstawowy DM 100 Mast Diagnostica, Niemcy, bulion z wyciągiem mózgowo-sercowym produkcji DM 106 Mast Diagnostica, Niemcy, agar wzbogacony (Zakłady Enzymów i Peptonów, Biotechnologia BTL sp. z o.o.), bulion tryptonowo-sojowy DM 226 Mast Diagnostica, Niemcy).

Wykrywanie przetrwalników *Bacillus anthracis*. Stosowano test Smart™ II-Anthrax Spore, produkcji NHD Corp. (20), zgodnie z instrukcją producenta. Kontrolę ujemną stanowił *Bacillus cereus* ATCC10876, zaś dodatnią *Bacillus anthracis* 34F₂.

Izolacja *Bacillus anthracis* z próbek gleby. W tym celu stosowano metodę Beyera i wsp. (1).

Izolacja *Bacillus anthracis* z miazgi zębowej. Zęby poddawano 20-minutowej kąpeli w 50% roztworze wybielacza, płukano wodą destylowaną i poddano działaniu promieniowania UV; $\lambda = 325$ nm przez 20 minut (7). Miazgę zębową uwalniano i przy użyciu wymazówek przenoszono do 10 ml TSB (6). Próbki inkubowano przez 12 godzin w 37°C przy 150 rpm, po czym 3 ml hodowli odwirowywano przy 11 000-25 000 rcf, zawieszano w 1 ml płynu fizjologicznego i gotowano przez 15 minut, po czym poddawano analizie genetycznej na obecność markerów charakterystycznych dla *Bacillus anthracis*.

Wykrywanie antygeny PA *Bacillus anthracis* testem Smart™ II-Anthrax PA. Szczepy bakterii, wyizolowane z próbek gleby i miazgi zębowej inkubowano przez 18 godzin w 37°C w 3 ml płynnego podłoża BHI, które badano na obecność antygeny PA według instrukcji producenta.

Izolacja materiału genetycznego. Izolację plazmidowego i chromosomalnego DNA *Bacillus anthracis* przeprowadzono przy użyciu gotowych zestawów Plasmid Miniprep Plus i Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Gdynia).

Metoda PCR. Do amplifikacji sekwencji chromosomalnej Ba813 przygotowano 50 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 20 ng/µl DNA chromosomalnego, po 200 µM każdego z oligonukleotydów, po 1 µM starterów R1 i R2 (26) oraz polimerazę Taq 2,5 U/µl (Fermentas). Amplifikację DNA przeprowadzono zgodnie z profilem stosowanym przez Ramiisse i wsp. (26) w termocyklerze iCycler™ Thermal Cycler (Bio Rad). Produkty PCR analizowano metodą elektroforezy w buforze TBE w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny o stężeniu 5 mg/ml (Sigma-Aldrich) stosując wzorzec masy molekularnej – 100 bp DNA Ladder (Fermentas, LT) oraz kontrolę pozytywną (*Bacillus anthracis* 211). Produkty amplifikacji analizowano przy użyciu systemu do rejestracji żeli – ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech.). Do rejestracji żelu użyto programu

LIS. CAP wersji 1.0 przy wykorzystaniu programu Gel Scan 1.13 oraz LIS. CAP wersji 1.0.

Nested PCR. Do amplifikacji genów pag w plazmidzie pXO1 i cap w pXO2 użyto mieszaniny reakcyjnej zawierającej 20 ng/µl DNA, po 200 µM każdego z oligonukleotydów, po 1 µM starterów zewnętrznych PA 5, PA 8, Cap 6, Cap 103 (1). Amplifikację DNA przeprowadzono w termocyklerze iCycler™ Thermal Cycler (Bio Rad), stosując profil termiczny podany przez Bayera i wsp. (1). Produkty amplifikacji oznaczano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym stosując wzorzec masy molekularnej – 100 bp DNA ladder. Mieszaninę reakcyjną w nested PCR przygotowano w sposób podany wyżej, z użyciem starterów wewnętrznych (PA 6/7 i Cap 9/102). Jako matrycy użyto 2,5 µl produktów amplifikacji powstałych w rundzie pierwszej. Produkty amplifikacji oznaczano w identyczny co poprzednio sposób.

Multiplex PCR. Zastosowano do badań na obecność genów: cya, pag, genu capC oraz markera chromosomalnego Ba813. Do amplifikacji przygotowano 50 µl mieszaninę reakcyjną zawierającą: 20 ng/µl DNA, po 200 µM każdego z oligonukleotydów, polimerazę Taq 5 U/µl (Sigma) po 1 µM starterów Pag1, Pag2 oraz Cya 1, Cya 2, CapC 1, CapC 2 oraz R 1 i R 2 (26). Amplifikację DNA przeprowadzono w termocyklerze iCycler™ Thermal Cycler (Bio Rad), stosując profil termiczny podany przez Ramiisse i wsp. (26).

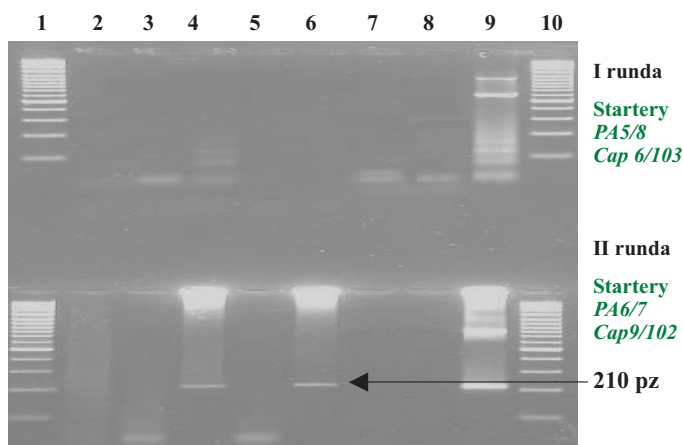
Wrażliwość na penicylinę. Przeprowadzono test dyfuzyjno-krażkowy na podłożu Muellera-Hintona, używając krążków z penicyliną o stężeniu 10 µg/µl (P 10). Wyniki odczytywano po 18 godzinnej inkubacji w atmosferze tlenowej w 37°C. Kontrolę stanowiły szczepy *Bacillus cereus* ATCC10876 i *Bacillus anthracis* 34F₂.

Test fagowy. Wykonano w sposób opisany przez Turnbulla i wsp. (33) stosując dla kontroli dodatniej *Bacillus anthracis* 34F₂, a ujemnej *Bacillus cereus* ATCC 10876 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Wynik dodatni polegał na pojawieniu się przejaśnień (fysinek) w miejscu naniesienia bakteriofaga (33).

Badania biochemiczne. Wykonano przy użyciu zestawu API 50 CHB według instrukcji producenta (Bio-Merieux). Ocenę wyników interpretowano na podstawie tabeli identyfikacyjnej i komputerowego programu API-LAB.

Wyniki i omówienie

Ogółem przebadano 93 próbki, z których 30 pochodziło z okolic Tomaszowa Lubelskiego, 30 z Łomży, a 33 z Buska Zdroju. W 30 próbkach izolowanych z okolic Tomaszowa Lubelskiego techniką PCR nie wykryto sekwencji Ba813, a metodą nested PCR również genów pag i cap, charakterystycznych dla *Bacillus anthracis*. W 30 przebadanych próbkach ziemi z okolic Łomży i 20 z okolic Buska Zdroju nie wykryto także żadnych produktów amplifikacji charakterystycznych dla *Bacillus anthracis*. Prawdopodobnie miejsca skąd pobierano próbki nie były dokładnie zidentyfikowane jako miejsca padnięcia zwierząt lub poddano je wcześniej skutecznym zabiegom dezynfekcyjnym, co mogło mieć wpływ na negatywne wyniki badań.



Ryc. 1. Wykrywanie techniką nested PCR obecności genu *pag* i *cap* *Bacillus anthracis* w próbkach gleby opracowanych metodą Beyera i wsp. (1) pobranych z okolic Skrzypiowa i Zakrzowa

Linie 1, 10 – wzorzec masy molekularnej; marker 100 bp DNA ladder;

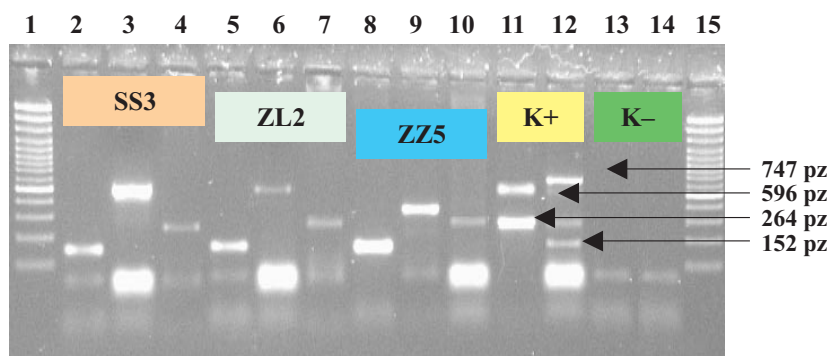
Linie 2-6 – próbki gleby (SS1, SS2, SS3, ZL1, ZL2);

Linia 7 – kontrola mastermixu;

Linia 8 – kontrola ujemna (K-) *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

Linia 9 – kontrola dodatnia (K+) *Bacillus anthracis* 211

Sekwencję chromosomalną Ba813 wykryto w próbkach SS1, SS3 i ZL2, a obecność genu *pag* (metodą nested PCR) wykazano w próbkach SS3 i ZL2 (ryc. 1). Metodą multiplex PCR w tych ostatnich stwierdzono produkt amplifikacji o długości 264 pz charakterystyczny dla genu *capC* (ryc. 2). Wyniki te potwierdzono standardowym PCR przy użyciu starterów PA 5/8 i CapC 1/2 otrzymując produkty amplifikacji 596 pz



Ryc. 3. Zestawienie wyników badań przy użyciu standardowego PCR szczepów wyizolowanych z próbek gleby i miazgi zębowej metodą Beyera i wsp. (1) na obecność sekwencji Ba813, genów *pag* i *cap*

Linie 1 i 15 – wzorzec masy molekularnej, marker 100 bp DNA ladder;

Linie 2, 5, 8 – produkty amplifikacji powstałe przy użyciu starterów R1/R2;

Linie 3, 6, 9 – produkty amplifikacji powstałe przy użyciu starterów PA 5/8 (SS3, ZL2) i Pag 1/2 (ZZ5);

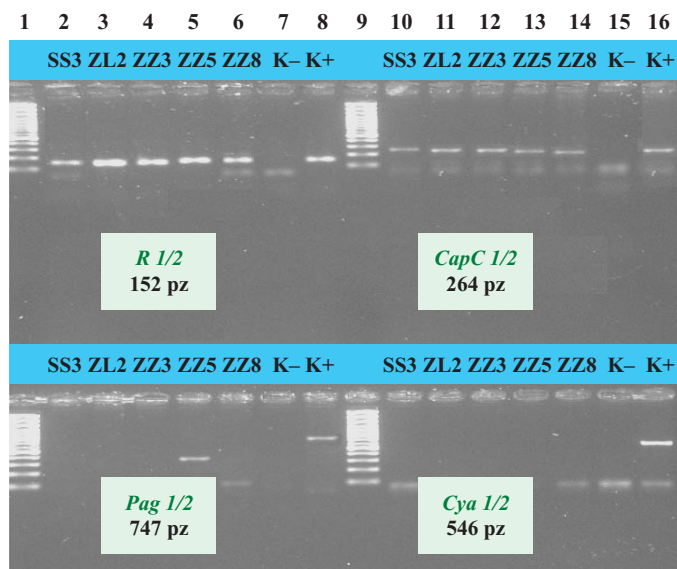
Linie 4, 7, 10 – produkty amplifikacji powstałe przy użyciu starterów CapC 1/2;

Linia 11 – kontrola dodatnia – *Bacillus anthracis* szczep 211; reakcja amplifikacji z udziałem starterów PA 5/8 i CapC 1/2;

Linia 12 – kontrola dodatnia – *Bacillus anthracis* szczep 211; reakcja amplifikacji z udziałem starterów Pag 1/2, CapC 1/2, R1/R2;

Linia 13 – kontrola ujemna – *Bacillus cereus* ATCC 10876; reakcja amplifikacji z udziałem starterów PA 5/8 i CapC 1/2;

Linia 14 – kontrola ujemna – *Bacillus cereus* ATCC 10876; reakcja amplifikacji z udziałem starterów Pag 1/2, CapC 1/2, R1/R2



Ryc. 2. Wyniki badań metodą multiplex PCR szczepów wyizolowanych metodą Beyera i wsp. (1) z próbek gleby pochodzących z okolic Skrzypiowa i Zakrzowa i miazgi zębowej

Linia 1 i 9 – wzorzec masy molekularnej, marker 100 bp DNA ladder;

Linie 7 i 15 – kontrola ujemna (K-) *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

Linie 8 i 16 – kontrola dodatnia (K+) *Bacillus anthracis* 211;

Linie 2-6 i 10-14 – izolaty z próbek gleby pobranych z okolic Skrzypiowa (SS) i Zakrzowa (ZL) oraz z miazgi zębowej z okolic Zakrzowa (ZZ)

dla genu *pag* i 264 pz dla genu *cap* (ryc. 3). W badaniach 8 próbek miazgi zębowej w trzech z nich (ZZ3, ZZ5, ZZ8) wykryto sekwencję chromosomalną Ba813. Przy badaniu ich na obecność genu *pag* i *cap* metodą nested PCR przy użyciu starterów PA 5/8, PA 6/7, Cap 6/103 i Cap 9/102 uzyskano wyniki negatywne. Obecność genu *cap* metodą multiplex PCR stwierdzono w próbkach ZZ3, ZZ5 i ZZ8 (ryc. 2). Sekwencja Ba813 występuje

wprawdzie u wszystkich szczepów *Bacillus anthracis*, ale stwierdza się ją także u szczepów przejściowych, w grupie *Bacillus cereus* (2, 3, 21, 23, 25-27). Szczepy przejściowe z sekwencją Ba813 izolowane są z miejsc padnięć zwierząt chorych na węglik (9, 23), jednak pochodzenie ich nie jest jeszcze dokładnie poznane (23). Izolowany w niniejszych badaniach szczep SS1 można zaliczyć do przejściowych, gdyż nie wykazywał on obecności innych poza Ba813 markerów genetycznych charakterystycznych dla *Bacillus anthracis*. Na uwagę zasługuje fakt uzyskiwania różnych wyników badań genetycznych w zależności od zastosowanych starterów, używanych do diagnostyki genetycznej *Bacillus anthracis*. Prawdopodobnie jest to związane ze zmianami w sekwencji odcinka genu targetowego badanych szczepów powstałymi na skutek mutacji (częściowych delecji zasad) w plazmidach pXO1 i pXO2. Zmiany w genomie i w plazmidach bakterii

pochodzących z próbek środowiskowych, poddawanych działaniu różnorodnych czynników fizycznych i chemicznych, mogą być częste (29).

Obecność szczepów posiadających tylko sekwencję genu *capC* (ZZ3, ZZ5 i ZZ8) może świadczyć o utracie przez nie plazmidu *pXO1*. W glebie, będącej środowiskiem bytowania różnorodnych gatunków bakterii, może mieć miejsce transfer genów (29), co może powodować trudności diagnostyczne (27) oraz stworzyć potencjalne zagrożenie epidemiologiczne. Donoszono np. o przypadkach izolacji *Bacillus cereus* przy zapaleniu przyzębia (8, 31) oraz zapaleniu płuc (10). W tym ostatnim przypadku wyizolowany szczep *Bacillus cereus* G9241 posiadał plazmid *pBCXO1*, wykazujący aż 99,6% podobieństwa z plazmidem *pXO1* *Bacillus anthracis*. Powodował on 100% śmiertelność zakażonych myszy, mimo że nie posiadał plazmidu *pXO2*.

Miejsca skąd pobierano próbki poddawane były rutynowo dezynfekcji po zagrzebaniu tam zwierząt padłych na węglik, co mogło mieć wpływ na wyniki izolacji. Być może, w miejscach, skąd pobrano próbki i wyizolowano szczepy SS1 i SS3 w składnicy padlin w Skrzypiowie oraz szczep ZL2 (na grzebowisku w Zakrzowie), dezynfekcja mogła być mniej skuteczna, o czym może świadczyć utrzymywanie się tam przetrwalników *Bacillus anthracis* prawdopodobnie przez dziesiątki lat.

Wykazanie obecności szczepów *Bacillus anthracis* w miazdze zębowej jest pierwszą informacją na ten temat w piśmiennictwie. Droncourt i wsp. (6) w 1998 r. wykryli obecność *Yersinia pestis* w próbkach miazgi zębowej pobranej z zębów ludzi zmarłych w średniowieczu w Marsylii, w czasie panowania dżumy. De Vos (cyt. 11) wyizolował *Bacillus anthracis* ze szczątków kości zwierząt pochodzących sprzed 200 lat.

W badaniach metodami mikrobiologii klasycznej wykazano, że szczepy wyizolowane z próbek SS3, ZL2 i ZZ5 nie miały właściwości hemolitycznych i były wrażliwe na penicylinę, co jest zgodne z danymi innych autorów (32). Niektórzy badacze donoszą jednak o występowaniu oporności na penicylinę u 3 do 5% szczepów *Bacillus anthracis* (9, 22) i wykazujących ponadto słabo wyrażone właściwości hemolityczne. Izolat posiadający jedynie marker chromosomalny Ba813 (SS1), wykazywał częściową hemolizę, nie tworzył błonki na powierzchni hodowli płynnej i był odporny na penicylinę. Podobne spostrzeżenia dotyczące szczepów *Bacillus sp.* Ba813⁺ poczynili inni autorzy (9, 27). Na podłożu PLET A w badaniach własnych obserwowano wzrost bardzo drobnych kolonii (o średnicy od 2 do 3 mm) jedynie izolatu ZZ5. Podłoże PLET A (12), pozwala na wykrycie *Bacillus anthracis* przy hamowaniu wzrostu innych szczepów z rodzaju *Bacillus sp.* Według Cheuna i wsp. (4) oraz Beyera i wsp. (1), podłoże to może stwarzać czasami trudności, hamując wzrost niektórych szczepów *Bacillus anthracis*, co obserwowano także w badaniach

własnych. W podłożu płynnym szczepy SS3, ZL2 i ZZ5 wykazywały charakterystyczny dla *Bacillus anthracis* wzrost w postaci delikatnej błonki na powierzchni pożywki, która po lekkim wstrząśnięciu próbką opadała na dno, tworząc osad, czego nie obserwuje się w hodowli *Bacillus cereus* (30). W diagnostyce *Bacillus anthracis* wykorzystuje się także test fagowy (18, 28), który odznacza się dużą swoistością (33) dzięki czemu jest stosowany w praktyce do przesiewu dużej liczby próbek podejrzanych o obecność w nich *Bacillus anthracis* (11, 18). Według Turnbulla (32), 3% izolowanych szczepów *Bacillus anthracis* wykazuje oporność na lityczne działanie faga gamma. W badaniach własnych, w hodowlach pochodzących z próbek SS3, ZL2 i ZZ5 już po 12-godzinnej inkubacji w 37°C zaobserwowano wyraźne łysinki, będące efektem litycznego działania faga, identyczne do obserwowanych w badaniach z użyciem szczepu *Bacillus anthracis* 34F₂. Niektórzy autorzy wskazują na możliwość występowania szczepów wrażliwych na jego działanie, lecz należących do innych niż *Bacillus anthracis* gatunków, oraz obecność szczepów *Bacillus anthracis* opornych na tego faga (11). W świetle powyższych danych test ten należy stosować w połączeniu z innymi metodami (11, 33).

Badania biochemiczne przeprowadzone w oparciu o komercyjny zestaw API 50 CHB pozwalają na określenie profilu biochemicznego testowanych szczepów bakterii, pomocnego w ich identyfikowaniu i typowaniu (15). W badaniach testem API zaobserwowano, że szczepy ZL2 i ZZ5 posiadały zdolność fermentacji węglowodanów o profilu charakterystycznym dla *Bacillus anthracis*, z wyjątkiem fruktozy i skrobi (próbka ZZ5), oraz samej skrobi w przypadku próbki ZL2. Szczep wyizolowany z próbki SS3 różnił się brakiem zdolności metabolizowania skrobi przy fermentacji arabinozy, inozytolu i mannitolu. Według Logana i wsp. (15), dla *Bacillus anthracis* charakterystyczny jest rozkład 10 węglowodanów. Do wyników badań biochemicznych należy podchodzić jednak ostrożnie, gdyż nawet niewielkie zmiany w genomie bakteryjnym mogą prowadzić do zaburzeń w produkcji i zmian niektórych enzymów uczestniczących w rozkładzie określonych węglowodanów.

Obecność przetrwalników *Bacillus anthracis* w próbkach SS3, ZL2 i ZZ5 potwierdzono testem immunochromatograficznym uznanym za metodę swoistą i czułą, na co ma wpływ jakość zastosowanych przeciwciał (20). Stosunkowo niski procent reakcji fałszywie dodatnich stwierdzono przy badaniu próbek tą techniką podczas ataków bioterrorystycznych w USA. W badaniach wykazano, że szczepy z sekwencją chromosomalną Ba813 i brakiem plazmidu *pXO1*, nie produkowały białka PA, co jest zgodne z ustaleniami innych autorów (13, 14). Szczepy, u których wykryto obecność plazmidu *pXO1*, produkowały wspomniany antygen.

Podsumowanie

Wykrycie w dwóch badanych miejscach obecności szczepów *Bacillus anthracis* wskazuje na konieczność monitorowania grzebowisk zwierząt dla skutecznej ochrony ludzi, zwierząt oraz środowiska. Miazga zębowa może być stosowana do izolacji przetrwalników *Bacillus anthracis*. Istnieje konieczność dokonania krytycznej oceny stosowanych starterów w aspekcie ich wykorzystania do badań na obecność *Bacillus anthracis* w próbkach środowiskowych.

Piśmiennictwo

- Beyer W., Glöckner P. Otto J., Böhm R.: A nested PCR method for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples collected from former tannery sites. *Microbiol. Res.* 1995, 150, 179-186.
- Brumlik M. J., Bielawska-Drózd A., Żakowska D., Liang X., Spalletta R. A., Patra G., DelVecchio V. G.: Genetic diversity among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains using repetitive element polymorphism – PCR. *Pol. J. Microbiol.* 2004, 53, 215-225.
- Brumlik M. J., Szymajda U., Żakowska D., Liang X., Redkar R. J., Patra G., DelVecchio V. G.: Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 3021-3028.
- Cheun H. I., Makino S. I., Watarai M., Shirahata T., Uchida I., Takeshi K.: A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 91, 421-426.
- Dragon D. C., Rennie R. P.: Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 33, 100-105.
- Droncourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O.: Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95, 12637-12640.
- Droncourt M. T. P., Cuccui J., White W., Lynnerup N., Titball R. W., Cooper A., Prentice M. B.: Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavation of putative plague victims. *Microbiology* 2004, 150, 341-354.
- Helgason E., Caugant D. A., Olsen I., Kolsto A.-B.: Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1615-1622.
- Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A., Johansen H., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A. B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2627-2630.
- Hoffmaster A. R., Ravel J., Rasko D. A., Chapman G. D., Chute M. D., Marston C. K., De B. K., Sacchi C. T., Fitzgerald C., Mayer L. W., Maiden M. C. J., Priest F. G., Barker M., Jiang L., Cer R. Z., Rilstone J., Peterson S. N., Weyant R. S., Galloway D. R., Read T. D., Popovic T., Fraser C. M.: Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101, 8449-8454.
- Hugh-Jones M. E., de Vos V.: Anthrax and wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2002, 21, 359-383.
- Knisely R. F.: Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bact.* 1966, 92(3), 784-786.
- Leppä S. H.: The anthrax toxin complex, [w:] Alouf J., Freer J. H. (wyd.): Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Academic Press London, New York 1991, s. 277-302.
- Leppä S. H., Robbins J. B., Schneerson R., Schiloch J.: Development of an improved vaccine for anthrax. *J. Clin. Invest.* 2002, 110, 141-144.
- Logan N. A., Carman J. A., Melling J., Berkeley R. C.: Identification of *Bacillus anthracis* by API tests. *J. Med. Microbiol.* 1985, 20, 75-85.
- Mierzejewski J., Bartoszcze M.: Konsekwencje doświadczeń nad wykorzystaniem *Bacillus anthracis* jako broni biologicznej. *Post. Mikrob.* 1995, 34, 385-401.
- Mierzejewski J., Bartoszcze M.: Odkażenie gleby po wojennych doświadczeniach bakteriologicznych na wyspie Gruinard. *Prz. Epid.* 1991, 45, 197-205.
- Nelson D., Schuch R., Fischetti V. A.: A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 2002, 418, 884-889.
- Ness G. B., Van: Ecology of anthrax. Anthrax undergoes a propagation phase in soil before it infects livestock. *Science* 1971, 172, 1303-1306.
- New Horizons Diagnostics Corp. 9110 Red Branch Road, Columbia, Maryland 21045 USA. *Bacillus anthracis* (spore) lateral flow screening assay. Recorder Number 89-109002.
- Patra G. P., Niemcewicz M., Żakowska D., DelVecchio V. G.: Use of pulsed field gel electrophoresis to investigate the whole genome organization in *Bacillus cereus* group of bacteria. 4th Internat. 1 Conf. Anthrax, Annapolis, Maryland, USA 2001, Abstract Book No. 22.
- Patra G., Sylwestre P., Ramišse V., Therasse J., Guesdon J.-L.: Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 15, 223-231.
- Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M.: Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3412-3414.
- Pepper I. L., Gentry T. J.: Incidence of *Bacillus anthracis* in soil. *Soil Sci.* 2002, 167, 627-635.
- Qi Y., Patra G., Liang X., Williams L. E., Rose S., Redkar R. J., DelVecchio V. G.: Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 3720-3727.
- Ramišse V., Patra G., Garrigue H., Guesdon J. L., Mock M.: Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 145, 9-16.
- Ramišse V., Patra G., Vaissaire J., Mock M.: The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 224-228.
- Redmond C., Henderson I., Turnbull P. C. B., Bowen J.: Phage from different strains of *Bacillus anthracis*. *Salisbury Med. Bull. Special Suppl.* 1996, 87, 60-63.
- Rensing C., Newby D. T., Pepper I. L.: The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation. *Soil Biology&Biochem.* 2002, 34, 285-296.
- Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G.: Section 13. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, [w:] Holt J. G. (red.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams&Wilkins, Baltimore 1986, s. 1104-1130.
- Ticknor L. O., Kolsto A.-B., Hill K. K., Keim P., Laker M. T., Tonks M., Jackson P. J.: Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 4863-4873.
- Turnbull P. C. B.: Definitive identification of *Bacillus anthracis* – a review. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 237-240.
- Turnbull P. C. B., Böhm R., Cosivi O., Doganay M., Hugh-Jones M. E., de Vos V.: Wąglik u ludzi i zwierząt, zapobieganie oraz zwalczanie – przewodnik, 1998. Centrum Mikrobiologii Stosowanej i Badań, Salisbury, Wiltshire, Anglia. WHO, wydanie polskie, Puławy 2000.

Adres autora: dr Agata Bielawska-Drózd, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy;
e-mail: abielawska@yahoo.com