



ANALIZA FORENZIČKIH ISTRAGA BACILLUS ANTHRACIS KROZ POVIJEST: EVOLUTIVNI TRENDОВИ

Pregledni naučni rad

Primljeno/Received: 8. 2. 2024.
Prihvaćeno/Accepted: 16. 12. 2024.

Romana ŠUMAN

Sažetak

Vid biološkog ratovanja, koje koristi biološko oružje poznato je već tisućama godina, a upotreba bioloških agensa kao instrumenta ratovanja korištena je s ciljem izazivanja straha i prouzrokovanja štete kako kod ljudi, tako i kod životinja. Upotreba bakterije *Bacillus anthracis* smatrana je kao bolest ljudi koji rade u tvornicama vune, sve do 2001. godine kad je u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) upotrebljena kao bioterorističko oružje. Upravo ta godina, označila je prekretnicu u forenzičkoj struci i identifikaciji ovog oblika biološkog agensa. Stoga je svrha ovog rada analizirati slučajeve upotrebe *Bacillus anthracis* kao bioterorističkog oružja i dati osvrt na forenzičko postupanje u slučaju njegove identifikacije. Analizom slučajeva upotrebe *Bacillus anthracis* kao bioterorističkog oružja od 2001. utvrdili smo da je od ukupno 125.000 uzoraka identificirano 22 slučaja, od kojih je 11 bilo inhalacijskog oblika i 11 kožnog oblika. Uzorci su obrađeni u laboratorijima i u Centrima za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD-u. Analiza je obuhvatila dvije skupine. Prva skupina je bila stanovništvo južne Floride, New Yorka i New Jerseyja koji su bilježili 9 žrtava, od kojih je 7 s kožnim oblikom antraksa i 2 s inhalacijskim oblikom. Druga skupina je bila stanovništvo u Washingtonu, D.C., New Yorku, New Jerseyu, Pennsylvaniji, Connecticutu, Marylandu i Virginiji s 13 zabilježenih slučajeva, od kojih je 9 bio inhalacijski oblik. Analiza je utvrdila da inhalacijski oblik ima najveću stopu smrtnosti. Stoga je jako važno u forenzičkom postupku utvrditi protokole za sigurno postupanje u slučaju sumnje na upotrebu *Bacillus anthracis* kao bioterorističkog oružja.

Ključne riječi

antraks, biološko oružje, *Bacillus anthracis*, forenzički postupci

UVOD

Infekcija uzrokovana bakterijom *Bacillus anthracis*, poznata kao antraks, crni prišt ili bedrenica, potencijalno se smatra biološkim oružjem jer joj njena fulminantnost i iznimna virulencija daju sposobnom da izazove teške oblike bolesti. Zbog svoje jačine djelovanja, kao agensa, koji se može upotrijebiti u bioterorističke svrhe, sa ciljem razaračke moći, daje snagu ovom vidu ratovanja. Naime, kada pogledamo na zemlje u okruženju možemo vidjeti da pojavnost ove vrste bakterije u ovom obliku u kojem ćemo ga u radu objasniti ne postoji. Zastupljenost je veoma mala i stručnjaci iz oblasti kriminalistike, forenzike, javnoga zdravstva, policije i drugih grana koje sudjeluju prilikom napada nisu dovoljno upoznati s ispravnim postupanjem u slučaju sumnje na bioteroristički napad uzrokovan bakterijom *Bacillus anthracis*. Tema je sveremenska i njena aktualnost ne jenjava kroz stoljeća, a istraživanja koja se provode vezana za *Bacillus anthracis* u svijetu daju nam značajne implikacije kako u forenzičkoj struci tako i u kriminalističkoj. Ovaj rad pridonosi naučnom razmatranju ove teme, jer broj zastupljenih radova na ovu temu je znatno mali, neki se odnose na zdravstveni aspekt, dok forenzički aspekt istrage nije zastupljen, a pogotovo kada pogledamo na zemlje u okruženju. U radu se veliki dio usmjerava prema prikazu slučajeva bioterorističkog napada u Sjedinjenim Američkim Državama iz 2001. godine, gdje se uočava moć djelovanja pojedinca, kao i mogućnost mijenjanja oblika pojavnosti bakterije koje otežavaju pronalazak počinitelja ili grupe. Cilj je prikazati oblike, njihovu moć transporta, pojavnost, utjecaj na stanovništvo, identifikaciju, kao i mogućnosti izazivanja visokog ili niskog stupnja mortaliteta. Pojava sumnjivih sojeva bakterija u društvu dovodi do pojave zabrinutosti i straha, ali zato kada imamo naučna dostignuća i razrađene laboratorijske tehnike ovaj vid bioterorizma moguće je staviti pod kontrolu. Međutim, tijekom obrađivanja teme i pisanja rada susreli smo se s nemogućnostima u pronalasku literature, a osobito one koja će detaljnije obraditi forenzički i kriminalistički aspekt. Zato smo relevantnu literaturu preuzeli sa National Center for Biotechnology Information (PubMed), koja nam je pomogla tijekom analize ove teme. S obzirom na navedeno, rezultati koji su obrađivani u ovom članku svoje temelje pronalaze u istraživanjima koja su zabilježena u SAD-u, a sve zbog nedostupnosti u pronalazanju istog u našoj regiji.

METODOLOGIJA

S obzirom na vrlo mali uzorak dostupne literature koja se bavi isključivo forenzičkim istraživanjem bakterije *Bacillus anthracis* nastojali smo napraviti sveobuhvatnu pretragu o ovoj temi. Zbog nedostupnosti forenzičkih baza podataka odlučili smo se pretražiti američku bazu podataka National Center for Biotechnology Information (PubMed). U naprednoj tražilici stavili smo ključnu riječ "anthrax" gdje se kao rezultat prikazuje 7.138 naslova. S obzirom da je većina ovih naslova uključivala biomedicinski aspekt antraksa, suzili smo istragu dodavanjem ključne riječ "forensics", kako bi imali sustavniji pregled literature o antraksu koji je fokusiran na forenzičke znanosti. Na taj način broj radova je sužen na 111 naslova. Pregledom navedenih naslova utvrdili smo da se tek od 2001. antraks istražuje u svjetlu bioterorizma i novog pristupa u forenzičkoj mikrobiologiji. Stoga smo uzeli vremenski raspon od 22 godine što je suzilo pretraživanje te smo dodali ključni pojam "forensic microbiology of the bacillus anthracis bacterium". Kao rezultat pretrage po navedenim ključnim riječima i pojmovima dobili smo 27 naslova. Međutim, kako bi se se dobio cjeloviti pregled vezan za ovaj vid bakterije osim 27 naslova, pregledani su i ostali tekstovi koji su na neki način upotpunili gledište na ovu temu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Kroz cijelu povijest ljudske civilizacije, kako od prastarih vremena pa sve do početka 20. stoljeća vodili su se ratovi na različite načine, a pojam biološkog ratovanja i upotreba biološkog oružja poznata je već tisućama godina. Biološki agensi¹ bili su instrument ratovanja i terora, a korišteni su sve sa ciljem da izazovu strah i štete kako kod ljudi, tako i kod životinja i biljaka. S obzirom da su bez mirisa i okusa, tihi i nevidljivi koristili su se kao ultimativna oružja zbog jeftine proizvodnje i lakoće u raspršivanju (Hawley i Eitzen, 2001). Naime, pojava inhalacijskog oblika bakterije *Bacillus anthracis* među ljudima zabilježena je godine 1957. u New Hampshireu i povezivala se sa profesionalnom izloženosti u tvornici prerade kozje dlake, a 1979. godine u Sverdlovsku, Rusija, postojala je sumnja na slučajno ispuštanje aerosola iz postrojenja za biološko oružje. Upotreba ovog vida biološkog agensa smatra se ozbiljnom biološkom prijetnjom, upotrijebljena u obliku spora ima mogućnost postojanosti bez obzira na vremenske prilike, a može se pripremiti i u obliku praha što ovu bakteriju čini postojanom da se upotrijebi kao potencijalno vojno ili terorističko oružje (Jernigan et al., 2002). Naime, smatralo se da pojava inhalacijskog oblika *Bacillus anthracis* neće biti upotrijebljena u vidu terorističkog ili vojnog oružja, ali 2001. promijenila je gledište na ovaj vid biološkog agensa. Sjedinjene Američke Države se u ljeto 11. rujna 2001. godine suočavaju sa terorističkim napadom na Svjetske trgovačke centre u New Yorku. Međutim, tu nije kraj, u jesen 5. listopada iste godine, nakon 25 godina pojavljuje se prva osoba koja razvija simptome inhalacijskog oblika antraksa u SAD-u, 63 godišnjak na Floridi umire. Pojava prvog slučaja inhalacijskog oblika označila je pojavu bioterorizma, koji je u obliku pisama prožetih "Amesovim sojem" spora² *Bacillus anthracis*³ poslan na razne adrese diljem države. Smatra se da je zaključno sa 26. siječnjom 2002. godine poslano vjerojatno šest pisama sa sadržajem spora diljem zemlje (Spencer, 2003). Federalni istražni ured (FBI) otvara istragu pod nazivom "Amerithrax" (Burke et al., 2016). Istraga, koja je u početnim fazama započela kao javnozdravstvena, ubrzo je prešla u forenzičku sferu, pri čemu je forenzički aspekt postao dominantna komponenta daljnjeg istražnog procesa (Popović i Glass, 2003). Slanje te vrste pisama rezultiralo je sa 22 slučaja, od kojih je zabilježeno 11 slučajeva inhalacijskog oblika antraksa⁴ i

¹ Biološki agens je mikroorganizam koji ima sposobnost da prouzrokuje pojavu bolesti kod biljaka, životinja i ljudi (Bokan et al., 2004).

² Spore *Bacillus anthracis* izuzetno su otporne na fizikalno-kemijske utjecaje iz okoliša kao što su toplina, hladnoća, isušivanje, svijetlost, pH, a zabilježena je otpornost i na mnoge dezinficijense, kao i mogućnost preživljavanja u tlu desetljećima (Jończyk-Matysiak et al., 2014; Bokan et al., 2004). Tlo s visokim razinama kalcija i pH iznad 6,1, uvelike potiči preživljavanje spora i time potiču globalnu distribuciju antraksa (Hugh-Jones i Blackburn, 2009). Ovaj tip bakterije se, zbog svojstava poput toksina kodiranih genima na plazmidima, sposobnosti sporulacije te otpornosti na većinu antibiotika, svrstava među biološke agense visokog rizika (Vučemilović, 2010). Amesov soj spora *Bacillus anthracis* prvi put je izoliran 1981. godine iz mrtve krave u Sariti, Teksasu. Tijekom istraživanja došlo se do zaključka da je ova vrsta soja rijetka u prirodi, ali je široko rasprostranjena kao laboratorijski soj (Van Ert et al., 2007).

³ *Bacillus anthracis* je uzročnik bolesti koja je posredovana toksinima i upravo njihovo nakupljanje rezultira smrtnošću. Toksin antraksa prvenstveno nije toksičan sve dok se tri netoksična proteina ne udruže u binarne ili ternarne kombinacije, pri čemu dolazi do formiranja toksičnih kompleksa koji se stvaraju na površinama stanice sisavaca. Glavni čimbenici virulencije u patogenezi antraksa su kapsula poli-D-glutaminske kiseline, letalni toksin (LT) i edemski toksin (ET) (Huang et al., 2015).

⁴ Najsmrtonosniji oblik antraksa je inhalacijski jer posjeduje fulminantnost, ima potencijal da utječe na veliki broj pojedinaca u slučajevima namjernog ispuštanja kao i teškoće u pravodobnom dijagnosti-

11 slučajeva kožnog. Tijekom analiza utvrđeno je da su se tijekom istaknutog napada formirali klasteri, pa je tako prvi klaster zahvatio stanovništvo južne Floride, New Yorka i New Jerseyja koji su bilježili 9 žrtava, od kojih je 7 s kožnim oblikom antraksa i 2 s inhalacijskim oblikom. Drugi klaster se formirao u Washingtonu, DC, New Yorku, New Jerseyu, Pennsylvaniji, Connecticutu, Marylandu i Virginiji sa 13 zabilježenih slučajeva, od kojih je 9 inhalacijski oblik (Tablica 1.). Uz 22 potvrđena slučaja zabilježene su dodatne 31 osobe koje su bile pozitivne na antraks, te su liječene profilaktičkim antibioticima (Burke et al., 2016). Naime, 35 000 ljudi do dana zahvalnosti koji su se smatrali rizičnim započeli su profilaktičku terapiju antibioticima, od kojih je 10 300 savjetovano da završe 60 - dnevnu kuru uzimanja antibiotika uskog spektra. Epidemija koja se očitovala kao relativno mala, kao ekonomski učinak odnijela je 6 milijardi dolara. Kao što smo već naveli, prvi smrtni slučaj bio je 63-godišnji urednik fotografije za nacionalne novine. Pacijent je zbog teškog respiratornog distresa primljen u bolnicu u okrugu Palm Beach. Međutim, zbog nepoznanice u to vrijeme pacijent je bio već u fulminantnoj fazi inhalacijskog antraksa. Istražujući uzrok njegovog stanja, kolega s posla prisjetio se da je krajem rujna 2001. godine 63-godišnji urednik otvorio pismo koje je sadržavalo praškastu tvar. S obzirom na navedeno, urednik baca pismo i omotnicu. S tom spoznajom, urađene su laboratorijske pretrage koje su u likvoru pacijenta potvrdile prisutnost bakterije *B. anthracis*. Bez obzira na utvrđeno, zbog uznapredovale situacije, pacijent je umro tri dana nakon prijema. Drugi slučaj javlja se kod iste redakcije kod koje je radio i prvi pacijent. Sad je u pitanju bio 73-godišnjak koji je obrađivao poštu u medijskoj kući. Prilikom rukovanja kontaminiranom omotnicom bio je izložen *Bacillus anthracis*. Zaprmljen je dan prije svog kolege, ali se njegova dijagnoza potvrđuje tek nekoliko dana nakon njegove smrti. Terapija koju je pacijent primio nakon što se utvrdio uzrok bila je uspješna i otpušten je iz bolnice (Burke et al., 2016).

Tablica 1. Broj potvrđenih slučajeva i oblici pojavnosti bakterije *Bacillus anthracis* u gradovima SAD-a.

Klasteri	Broj potvrđenih slučajeva	Oblici pojavnosti		Gradovi	Godina	Referenca
		Inhalacijski	Kožni			
1	9	2	7	Južna Florida, New York i New Jersey.	2001.	(Burke et al., 2016).
2	13	9	4	Washington, D.C., New York, New Jersey, Pennsylvania, Connecticut, Maryland i Virginia.	2001.	(Burke et al., 2016).
Ukupan broj	22	11	11		2001.	(Burke et al., 2016).
Smrtni slučajevi	5	5	0			(Burke et al., 2016).

ciranju (Schneemann i Manchester, 2009). Svoj razvoj bilježi nakon inhalacijske ekspozicije sporama antraksa manjim od 5 µm i alveolarnim taloženjem, a karakteriziran je razdobljem inkubacije od 1 do 6 dana koje je popraćeno simptomima sličnoj gripi kao što su umor, opća slabost, povišena tjelesna temperatura, bolno i otežano disanje uz pojavu kašlja, koje zatim prelazi u respiratorni distres uz pojavu cijanoze, visoke temperature i dispnee (Bokan et al., 2004; Sweeney et al., 2011).

Prvim zabilježenim slučajem u novijoj povijesti, bioterorizam koji primjenjuje biološke agense ponovo se pojavio. Tijekom napada analizirano je i obrađeno preko 125.000 uzoraka u laboratorijima uključujući i one u Centrima za kontrolu i prevenciju bolesti. Usporedbom same istrage kada se pogleda sa javnozdravstvenog stajališta primarni cilj ide prema identificiranju uzročnika i izvora, a sve sa ciljem provedbe pravovremene i odgovarajuće kontrole, kao i postavljanja preventivnih mjera (Popović i Glass, 2003). Naime, istraživanje koje su proveli Daniel i suradnici 2002. godine, dalo nam je detaljniji uvid u razmjere bioterorizma (Tablica 2).

Tablica 2: Prikaz slučajeva inhalacijskog i kožnog oblika antraksa u SAD-u 2001 (Jernigan et al., 2002).

	Inhalacijski slučajevi	Kožni slučajevi	Ukupan broj slučajeva
Zastupljenost muškog spola	7	5	12
Zaposlenici medijske kuće	1	5	6
Rukovatelji poštom	8	4	12
Drugi slučajevi	2	2	4
Broj smrtnih slučajeva	5		5
Prosječna dob	56	35	46

Imajući u vidu njegovu snagu i moć da dovede do pojave epidemije ili čak pandemije s visokim stupnjem mortaliteta, označilo je vrijeme istraživanja koja će nam dati detaljniji uvid u tadašnje napade i nove metode identifikacije istog. Analizirajući dobivene rezultate uočili smo da je pojavnost oblika antraksa identificirana kod stanovnika sedam država duž istočne obale Sjedinjenih Američkih Država. Naime, slučajevi su bili identificirani na Floridi, dva slučaja; Maryland, tri slučaja; Connecticut, jedan slučaj; Virginia, dva; New Jersey, pet; Pensilvanija, jedan; i New York City, osam u koji je uključen i jedan slučaj pacijenta koji je živio u New Jerseyju, a bio je izložen u New Yorku. Međutim, analizirajući podatke dolazimo do spoznaje da je prosječna dob bolesnika 46 godina. Omjer prosječne dobi istih s inhalacijskim oblikom antraksa naspram onih s kožnim bio je 56:35. Kada pogledamo zastupljenost muškog spola koji je bio izložen, tada dolazimo do podataka da je od 12 pacijenata, 7 (sedam) imalo inhalacijski, a 5 (pet) kožni oblik infekcije. Iz navedenih rezultata vidljivo je da je smrtnost inhalacijskog oblika 23%, odnosno pet pacijenata, dok kožni oblik antraksa nije imao zabilježen niti jedan smrtni slučaj. Međutim, kada se pogleda omjer slučajeva smrtnosti od inhalacijskog antraksa je 45%, a prosječna izloženost ovom obliku bakterije *Bacillus anthracis* i pojave prvih simptoma bila je 4,5 dana (Jernigan et al., 2002). Naime, kada se pogleda identifikacija tada je vidljivo da je kod 11 slučajeva oblika inhalacijskog antraksa njih 8 bilo potvrđeno iz kliničkih uzoraka i to 1 iz cerebrospinalne tekućine i 7 iz krvi, dok su se ostala tri druga slučaja morala dokazati laboratorijskim testovima uključujući PCR ili IHC koji su uključivali krv ili pleuralnu tekućinu, pleuralnu biopsiju i pomoću ELISA koja je uključivala porast između faze rekonvalescencije u serumu anti-PA IgG i akutne faze. Slučajevi kožnog oblika antraksa, među kojima su dva potvrđena izolacijom iz kliničkih uzoraka, među

kojima je 1 bio iz rane i 1 iz krvi, dok je pet slučajeva potvrđeno laboratorijskim testovima PCR⁵ ili IHC, ELISA u kojoj se pratilo povećanje serumskih anti-PA IgG. Međutim, ostala četiri slučaja klasificirani su kao sumljivi jer su imali samo jedan potporni laboratorijski test na infekciju (Jernigan et al., 2002). Istragom Federalnog istražnog ureda došlo se do zaključaka da su ipak postojale razlike u kontaminaciji praha između rujanskih i listopadskih pošiljki. Smatraju da pošiljke koje su kasnije slane sadržavaju prah sa manjim česticama kako bi izazvale štetu visokih razmjera. Stoga je upravo 2001. godina bila značajna za područje mikrobne forenzike koja nakon napada sa pismima antraksa bilježi rast velikom brzinom (National Research Council, 2011), a poseban se osvrt usmjerava na detekciju i identifikaciju *Bacillus anthracis* kako u okolišnim tako i u kliničkim uzorcima (Zasada, 2020). Naime, u tom periodu mnogo truda je uloženo kako bi se razvile brze metode za identifikaciju i detekciju mikroorganizma, a prvenstveno na brze testove koji se lako izvode kako bi se olakšalo osobama koje su prva linija obrane, poput policije, vojske, vatrogasaca i medicinskog osoblja hitne pomoći. Međutim, razvojem sofisticiranih metoda molekularne biologije i mikrobiologije rezultiralo je brzim porastom znanstvenih publikacija koja su uključivale nove metode koje će biti korištene za identifikaciju i otkrivanje *Bacillus anthracis*. Razvojem tih metoda otkrilo se da ipak za otkrivanje i identifikaciju ove vrste mikroorganizma dolazi do razvoja nespecifičnih reakcija. U identifikaciji bakterija, konvencionalne mikrobiološke metode obuhvaćaju nekoliko ključnih pristupa, uključujući bojenje kapsule, rast na selektivnim podlogama, te ispitivanje osjetljivosti na penicilin, uz druge relevantne analize. Međutim, prilikom identifikacije bakterije *Bacillus anthracis* potrebno je posvetiti posebnu pažnju ovim metodama. Iako je primjena konvencionalnih mikrobioloških pristupa zlatni standard za identifikaciju bakterija, rezultati vezani uz ovaj mikroorganizam mogu biti obmanjujući, stoga je od suštinskog značaja provesti dodatne analize i interpretacije kako bi se izbjegle greške u dijagnostici. Razlog tomu su mnoge fenotipske i genetske sličnosti koje ovaj mikroorganizam vežu sa vrstom *Bacillus cereus*, kao i drugim vrstama blisko povezanim ovom rodu. Široko rasprostranjeni rodovi *Bacillus*⁶ u okolišu i sličnosti u genomima predstavlja veliki izazov za znanstvenike u njihovoj identifikaciji. Da se radi o velikim sličnostima to vidimo iz istraživanja, gdje su istraživači *Bacillus anthracis* smatrali da je patogena varijanta *Bacillus cereus*. Upravo ovu tezu prvi put su iznijeli 1946. godine Smith i suradnici, a rasprava na znanstvenom nivou o ovoj temi traje već dugi niz desetljeća (Zasada, 2020). Naime, velika se razlika uočava kod kliničkog uzorka i uzorka iz okoliša koji sadrži *Bacillus anthracis*. Pristupi identifikacije zasnivati će se ovisno o vrsti uzorka koji se ispituje, pa tako svježi klinički uzorci sadržavaju vegetativne oblike, dok veliku pozornost trebamo imati kod uzoraka iz okoliša jer sadržavaju spore, koje su infektivni oblici bakterije (Wang et al., 2009) i posjeduju otpornost na nepovoljne uvjete iz okoliša. Stoga postoji velika mogućnost za razvijanje stečene laboratorijske infekcije jer spore mogu biti i dalje prisutne u ekstrahiranim uzorcima DNK (Dauphin et al., 2009), pa čak ni filtracija uzoraka neće pružiti 100% sigurnost da su se iz uzorka uklonile održive spore (Dauphin i Bowen, 2009). Međutim, forenzička istraga ide u smjeru i ima prvenstveno za cilj da poveže izvor uzročnika s

⁵ PCR metoda je polimerazna lančana reakcija i često korištena metoda, koja generira višestruke kopije ciljanog segmenta DNK tj. deoksiribonukleinske kiseline, ocrtanog sa parom početnica ili oligonukleotida. Zbog svoje svestranosti pronalazi primjenu u različitim znanstvenim istraživanjima kao što je forenzika, poljoprivreda, dijagnostička medicina (Karunanathie et al., 2022).

⁶ *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* i *Bacillus weihenstephanensis* (Zasada, 2020).

određenom skupinom ili pojedincom (Popović i Glass, 2003). Shodno tome, mikrobna forenzika u samim počecima svog razvoja oslanjala se na sheme genotipizacije mikroba koje su se temeljile samo na malom dijelu sekvence genoma. Nakon istaknutog napada sekvenciranje cijelog genoma visoke rezolucije kao i komparativa genomika promijenili su pristup u identifikaciji ključnih genetskih značajki soja bakterije *Bacillus anthracis* koja su bila sadržana u pismima "Ames slova". Istraživanjem na temelju fenotipskih karakteristika i sposobnosti sporulacije⁷ indentificirali su niz morfoloških varijanti i to sustavnom mikrobiološkom analizom spornoga materijala iz slova pisama, gdje se došlo do zaključka da genotipovi koji su izolirani iz slova pisama su identificirani samo u morfotipovima *Bacillus anthracis*, što nam u konačnici pokazuje da te varijante nisu prevladavale u okolišu (Rasko et al., 2011). Međutim, prilikom ove vrste istraživanja treba uzeti u obzir da su ispitivani samo izolati iz okoliša, dok je populacija bila isključena, tako da postoji mogućnost da su pronađene mutacije možda i bile prisutne. Prije pokretanja navedenog projekta kojeg su proveli David i suradnici točnost i pouzdanost sekvenciranja cijelog genoma kao jedne od forenzičkih mikrobnih tehnika nije se cjenila (Rasko et al., 2011). Upravo ova studija dala je istrazi "Amerithrax" skup validiranih genetskih markera koji su pronašli svoju ulogu i bili korišteni u razvoju visokoučinkovitih kvantitativnih PCR testova, a sve sa ciljem da se identificiraju potencijalni izvori spora koji su korišteni u poštanskim pošiljkama tijekom napada 2001. godine (Rasko et al., 2011). Stoga, jedno od istraživanja, kao što su proveli Daniel i suradnici, dalo nam je uvid da bolesti koje su povezane s bioterorizmom u nekim slučajevima mogu dovesti do zablude kod početnih slučajeva jer teroristi mogu mjenjati kako izvore tako i načine izloženosti. S obzirom na navedno, potrebno je dalje ulagati napore u istraživanja, kao i u razumijevanje različitih formulacija prašaka bakterije *Bacillus anthracis* i njihovih uloga i karakteristika bolesti prilikom izloženosti osoba (Jernigan et al., 2002). Međutim, zbog važnosti ovog biološkog agensa potrebno je pratiti situacije i održavati pripravnost u mogućim slučajevima bioloških napada. Naime, tijekom istraživanja osvrnuli smo se i na stanje u našoj regiji vezano za pojavnost ovog oblika biološkog agensa, gdje dolazimo do spoznaja da nije zabilježen niti jedan slučaj napada, kao što je vidljivo u prikazanim rezultatima.

ZAKLJUČAK

Istražujući i analizirajući navedenu temu dolazimo do zaključka da posjeduje svevremensku notu postojanosti kroz stoljeća. Međutim, nikada dovoljno istražena zbog vrlo male pojavnosti, shvaćana kao bolest ljudi koji rade u tvornicama vune, ali u svojoj bazi daje temelje da postane razarač i vodeća bakterija koja može uvesti svijet u novi epidemijski val sa visokim stupnjem mortaliteta. Svoju pojavnost bilježi u forenzici, kriminalistici, kemiji, javnom zdravstvu i drugim granama, dajući naznaku postojanosti.

Ovim pregledom istraživanja želi se ukazati da ovaj vid bakterije se ni u kojem slučaju ne smije podcijeniti, jer posjeduje jaku razaračku moć, gdje nedovoljno razvijene tehnike identifikacije i nedovoljna edukacija zdravstvenog osoblja u prepoznavanju prvih znakova bolesti može imati preveliku cijenu za čitavo čovječanstvo.

⁷ Sporulacija je proces pretvaranja vegetativnih stanica u spore. Upravo ovaj proces omogućava bakterijama da opstanu u nepovoljnim okolišnim uvjetima tijekom dužeg vremenskog razdoblja (Purohit et al., 2010).

Ipak mali je broj zemalja koje se bave ovom vrstom tematike. Osobito ako pogledamo zemlje u okruženju i radove, možemo izvesti zaključak da je istraživački dio i praćenje bakterije *Bacillus anthracis* površno i vezano je samo za pojave kod životinja. Međutim, napad koji se dogodio 2001. godine označio je prekretnicu u forenzičkoj mikrobiologiji i pridonio je razvoju novih tehnika identifikacije. Iz ovog rada vidljivo je da upotreba bioloških agensa ima predispoziciju postati vodeće oružje pojedinaca ili grupa, prouzrokujući epidemije ili čak pandemije visokih razmjera sa mogućnosti povećanog ili smanjenog stupnja mortaliteta. Veliki oprez treba usmjeriti prema inhalacijskom obliku jer iz navedenih podataka i drugih istraživanja vidljivo da je smrtnost velika u odnosu na druge oblike pojavnosti.

Međutim, nakon svih spoznaja i rezultata do kojih smo došli tijekom istraživanja ovog vida bakterije, dolazimo do zaključka da u našoj regiji nije bilo zabilježenih slučajeva napada, što je i vidljivo u poglavlju rezultati i diskusije, gdje se akcenat dao na istraživanje koje je provedeno u SAD-u tijekom bioterorističkog napada 2001. godine. Stoga, *Bacillus anthracis*, bakterija ostaje tema koja je višedisciplinarna i koja traži da se istraživanja intenziviraju u ostalim državama svijeta kako bi se dobio cjelovitiji i detaljniji pogled na ovaj vid biološkog agensa.

REFERENCES

- Bokan, S., Čižmek, A., Ilijaš, B., Jukić, I., Orehovec, Z., & Radalj, Ž. (2004). Oružja za masovno uništavanje: nuklearno-kemijsko-biološko i toksinsko oružje. Pučko otvoreno učilište Zagreb.
- Burke, L. K., Brown, C. P., & Johnson, T. M. (2016). Historical Data Analysis of Hospital Discharges Related to the Amerithrax Attack in Florida. *Perspect Health Inf Manag*, 13(Fall), 1c. PMID: 27843420; PMCID: PMC5075231.
- Dauphin, L. A., Moser, B. D., & Bowen, M. D. (2009). Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 76(1), 30-7. doi: 10.1016/j.mimet.2008.09.004. Epub 2008 Sep 13. PMID: 18824041.
- Dauphin, L. A., & Bowen, M. D. (2009). A simple method for the rapid removal of *Bacillus anthracis* spores from DNA preparations. *Journal of Microbiological Methods*, 76(2), 212-214. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.009. Epub 2008 Oct 28. PMID: 18996156.
- Hawley, R. J., & Eitzen, E. M., Jr. (2001). Biological weapons a primer for microbiologists. *Annual Review of Microbiology*, 55, 235-253. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.235. PMID: 11544355.
- Huang, E., Pillai, S. K., Bower, W. A., Hendricks, K. A., Guarnizo, J. T., Hoyle, J. D., Gorman, S. E., Boyer, A. E., Quinn, C. P., & Meaney-Delman, D. (2015). Antitoxin Treatment of Inhalation Anthrax: A Systematic Review. *Health Secur*, 13(6), 365-77. <https://doi.org/10.1089/hs.2015.0032>. PMID: 26690378; PMCID: PMC4710135.
- Hugh-Jones, M., & Blackburn, J. (2009). The ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(6), 356-367. doi: 10.1016/j.mam.2009.08.003. PMID: 19720074.

- Jernigan, D. B., Raghunathan, P. L., Bell, B. P., Brechner, R., Bresnitz, E. A., Butler, J. C., Cetron, M., Cohen, M., Doyle, T., Fischer, M., Greene, C., Griffith, K. S., Guarner, J., Hadler, J. L., Hayslett, J. A., Meyer, R., Petersen, L. R., Phillips, M., Pinner, R., Popovic, T., Quinn, C. P., Reefhuis, J., Reissman, D., Rosenstein, N., Schuchat, A., Shieh, W. J., Siegal, L., Swerdlow, D. L., Tenover, F. C., Traeger, M., Ward, J. W., Weisfuse, I., Wiersma, S., Yeskey, K., Zaki, S., Ashford, D. A., Perkins, B. A., Ostroff, S., Hughes, J., Fleming, D., Koplan, J. P., Gerberding, J. L. (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerging Infectious Diseases*, 8(10), 1019-1028. doi: 10.3201/eid0810.020353. PMID: 12396909; PMCID: PMC2730292.
- Jończyk-Matysiak, E., Kłak, M., Weber-Dąbrowska, B., Borysowski, J., & Górski, A. (2014). Possible use of bacteriophages active against *Bacillus anthracis* and other *B. cereus* group members in the face of a bioterrorism threat. *Biomed Res Int*, 2014, 735413. <https://doi.org/10.1155/2014/735413>
- Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. (2022). PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, 197, 130-143. doi: 10.1016/j.biochi.2022.02.009. PMID: 35231536.
- National Research Council. (2011). Review of the scientific approaches used during the FBI's investigation of the 2001 anthrax letters. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61(2), 247-255.
- Popović, T., & Glass, M. (2003). Laboratory aspects of bioterrorism-related anthrax--from identification to molecular subtyping to microbial forensics. *Croat Med J*, 44(3), 336-41. PMID: 12808729.
- Purohit, M., Sassi-Gaha, S., & Rest, R. F. (2010). Rapid sporulation of *Bacillus anthracis* in a high iron, glucose-free medium. *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), 282-287.
- Rasko, D.A., Worsham, P.L., Abshire, T.G., Stanley, S., Bannan, J.D., Wilson, M.R., Langham, R.J., Decker, R.S., Jiang, L., Read, T.D., Phillippy, A.M., Salzberg, S.L., Pop, M., Ert, M.N., Ert, M.N., Kenefic, L.J., Kenefic, L.J., Kenefic, L.J., Keim, P.S., Keim, P.S., Fraser-Liggett, C., & Ravel, J. (2011). *Bacillus anthracis* comparative genome analysis in support of the Amerithrax investigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 5027 - 5032.
- Schneemann, A., & Manchester, M. (2009). Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol*, 4(1), 35-43. <https://doi.org/10.2217/17460913.4.1.35>. PMID: 19207098; PMCID: PMC2710805.
- Spencer, R. C. (2003). *Bacillus anthracis*. *Journal of Clinical Pathology*, 56(3), 182-187. doi: 10.1136/jcp.56.3.182. PMID: 12610093; PMCID: PMC1769905.
- Sweeney, D. A., Hicks, C. W., Cui, X., Li, Y., & Eichacker, P. Q. (2011). Anthrax infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(12), 1333-1341. Dan. PMID: 21852539; PMCID: PMC3361358.
- Van Ert, M. N., Easterday, W. R., Huynh, L. Y., Okinaka, R. T., Hugh-Jones, M. E., Ravel, J., Zanecki, S. R., Pearson, T., Simonson, T. S., U'Ren, J. M., Kachur, S. M., Leadem-Dougherty, R. R., Rhoton, S. D., Zinser, G., Farlow, J., Coker, P. R., Smith, K. L., Wang, B., Kenefic, L. J., Fraser-Liggett, C. M., Wagner, D. M., & Keim, P. (2007). Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*, 2(5), e461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>.

ANALYSIS OF FORENSIC INVESTIGATIONS OF BACILLUS ANTHRACIS
THROUGHOUT HISTORY: EVOLUTIONARY TRENDS

Review Scientific Paper

Abstract

The phenomenon of biological warfare, employing biological weapons, has been known for thousands of years, and the use of biological agents as tools of warfare has been aimed at instilling fear and causing harm among both humans and animals. The bacterium *Bacillus anthracis* was historically associated with wool sorter's disease until 2001, when it was used as a bioterrorist weapon in the United States of America (USA). That particular year marked a turning point in the field of forensic science and the identification of this type of biological agent. Therefore, the purpose of this paper is to analyze cases of *Bacillus anthracis* being used as a bioterrorist weapon and to provide an overview of the forensic procedures in its identification.

By analyzing cases of *Bacillus anthracis* used as a bioterrorist weapon since 2001, we identified 22 cases out of a total of 125,000 samples, comprising 11 cases of inhalational anthrax and 11 of cutaneous anthrax. Samples were processed in laboratories and by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in the USA. The analysis covered two groups: the first group included populations from southern Florida, New York, and New Jersey, recording 9 victims, of whom 7 had cutaneous anthrax and 2 had inhalational anthrax. The second group comprised populations from Washington, DC, New York, New Jersey, Pennsylvania, Connecticut, Maryland, and Virginia, with 13 reported cases, including 9 cases of inhalational anthrax. The analysis revealed that inhalational anthrax has the highest mortality rate. Therefore, establishing protocols for safe handling in suspected cases of *Bacillus anthracis* as a bioterrorist weapon is crucial in forensic procedures.

Keywords: Anthrax, biological weapon, *Bacillus anthracis*, forensic procedures

Podaci o autoru

Romana Šuman, mag. pharm., LJU LJEKARNE PELAIĆ, e-mail: romana_pelaic@hotmail.com