

**Tlenowe, Gramujemne laseczki
przetrwalnikujące**

Bacillus sp



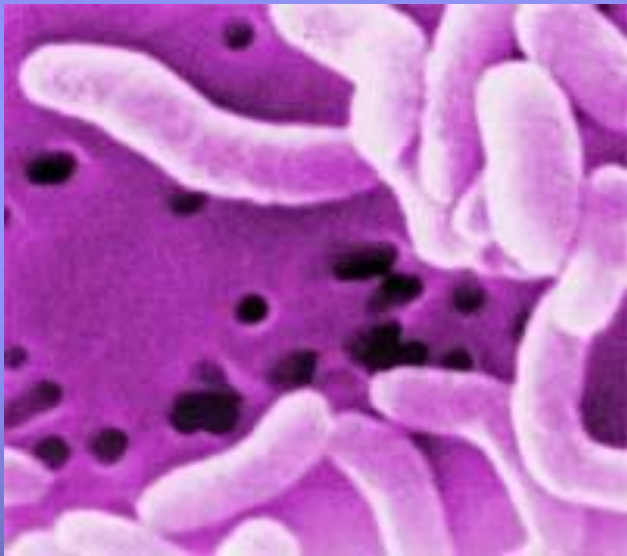
Bacillus anthracis

- Po raz pierwszy tlenową laseczkę *Bacillus anthracis* wyizolował w 1876 roku Robert Koch.
- Koch wyhodował *B. anthracis* w postaci czystej kultury, wykazał, że bakteria ta tworzy przetrwalniki i udowodnił, że wstrzyknięcie bakterii zdrowym zwierzętom powoduje węglik.
- W 1881 r Louis Pasteur zastosował czynne szczepienie owiec i bydła szczepem *B. anthracis*, który po kilkunastomiesięcznej hodowli w podwyższonej temperaturze 42-52°C utracił swoje właściwości wirulentne (atenuacja).
- Zaszczepione owce, uzyskały całkowitą odporność na zakażenie śmiertelną dawką wirulentnych bakterii węglika
- Ilja Miecznikow badając proces fagocytozy wirulentnych i atenuowanych szczepów *B. anthracis*, stwierdził, że są one fagocytowane w różnym stopniu.
- Przyczyną było wytwarzanie przez szczepy wirulentne otoczki.

Bacillus anthracis

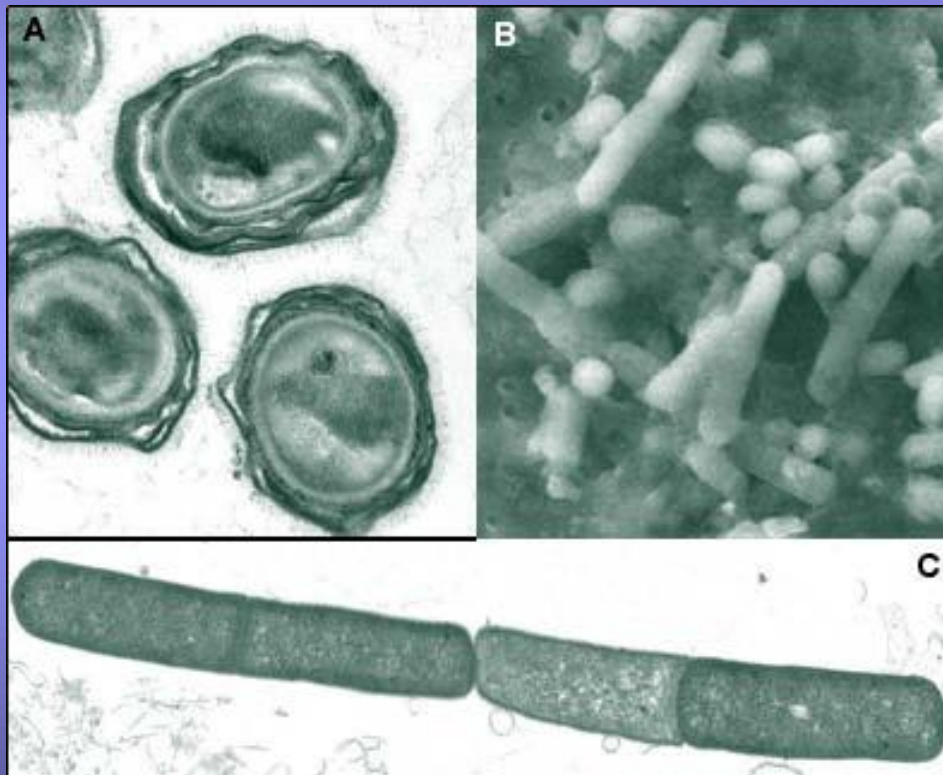
- *Bacillus anthracis* wytwarza przetrwalniki (endospory, proces tworzenia przetrwalników określa się terminem sporulacja).
- Endospory są odporne na niesprzyjające warunki środowiska i mogą przetrwać w glebie nawet kilkadziesiąt lat.
- Bakterie *B. anthracis* wytwarzają przetrwalniki wtedy, gdy znajdują się poza organizmem gospodarza np. w glebie lub w hodowli *in vitro*, pod koniec wykładniczej fazy wzrostu (zwykle po około 48 h hodowli).
- Sporulacja może zachodzić także w martwych tkankach, ale nigdy w żywym organizmie.
- Endospory zlokalizowane są po środku komórki
- Spory mają od 2 do 6u średnicy.

Bacillus anthracis

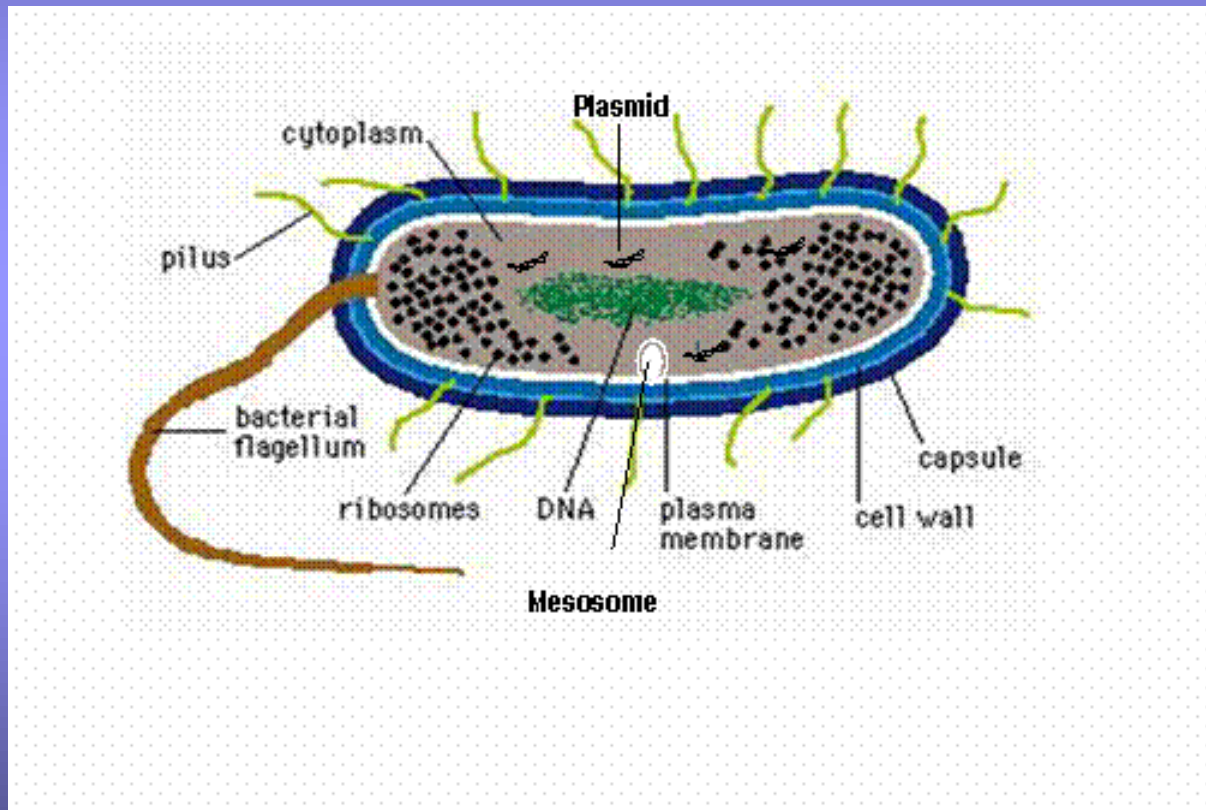


<http://www.bact.wisc.edu/bact330/lectureanthrax>

Bacillus anthracis



Bacillus anthracis



Czynniki wirulencji *B. anthracis*

- Otoczka pełni istotną rolę w pierwszym etapie patogenezы - kolonizacji, uniemożliwia fagocytozę.
- Otoczka zawiera kwas D-glutaminowy.
- Polipeptyd ten indukuje w organizmie powstawanie swoistych przeciwciał, nie chronią one jednak przed zakażeniem wąglikiem.
- Wytwarzanie otoczek następuje w organizmie żywiciela (podwyższone stężenie CO₂).
- Kolonie bakterii posiadające otoczkę różnią się na podłożu stałym morfologią od kolonii szczepów nie wytwarzających otoczki; kolonie są śluzowate i gładkie.

Otoczka

- Zdolność bakterii do wytwarzania otoczki jest zdeterminowana genetycznie i jest kodowana na plazmidzie pX02
- Do jej wytwarzania konieczna jest ekspresja trzech genów: *capB*, *capC* i *capA* kodujących enzymy związane z błoną komórkową bakterii.
- Ekspresja tych genów regulowana jest przez oddziaływanie białka kodowanego na plazmidzie pX02 z produktem genu *atxA* znajdującego się na drugim plazmidzie pX01.
- Plazmid ten determinuje syntezę toksyny-synteza otoczki jest częściowo sprzężona z wytwarzaniem toksyny

Czynniki wirulencji: egzotoksyna.

- Egzotoksyna składa się z trzech białkowych komponent, z których żadna działając pojedynczo nie wykazuje zjadliwości.
- Są to białka EF (edema factor), PA (protective antigen) i LF (lethal factor).
- Geny kodujące składniki egzotoksyny znajdują się na plazmidzie pX01.
- Białko PA wiąże się z receptorami ATR (anthrax toxin receptor) obecnymi na powierzchni komórki umożliwiając tym samym wejście czynników EF i LF do wnętrza komórki.
- Po związaniu się receptorem ATR, białko PA trawione jest przez komórkową proteazę, a powstały C-terminalny fragment PA (63 kDa) uzyskuje zdolność do polimeryzacji i tworzy heptamer.
- Wówczas następuje związanie czynnika LF lub EF i kompleks PA-EF (lub PA-LF) wprowadzony zostaje do komórki na drodze endocytozy.
- Podobnie do komórki zostaje wprowadzone białko LF.
- Czynniki LF także posiada aktywność enzymatyczną, jest cynkową proteazą.

Historyczne doświadczenia z wykorzystaniem węglika jako broni biologicznej

- Przez setki lat laseczka węglika (*Bacillus anthracis*) wywoływała zachorowania zwierząt na całym świecie, rzadko natomiast była przyczyną poważnej choroby u człowieka
- Badania nad węglikiem jako bronią biologiczną rozpoczęto ponad 80 lat temu.
- Obecnie się uważa, że przynajmniej 17 państw prowadzi badania nad zaczepną bronią biologiczną.



Broń biologiczna

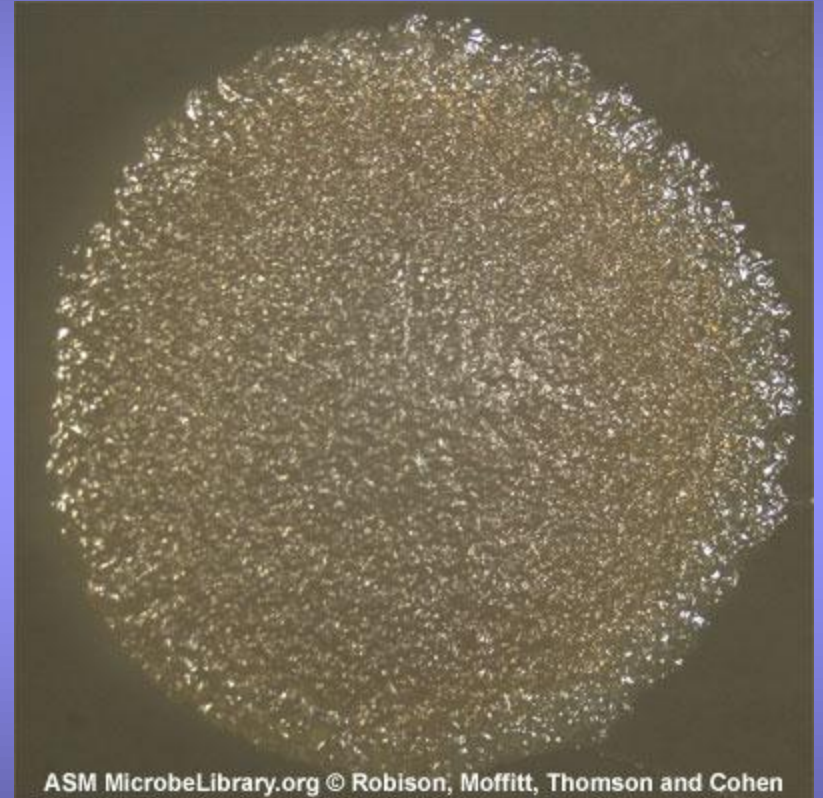
- Przypadkowe rozpylenie przetrwalników wąglika w wojskowym laboratorium mikrobiologicznym w Swierdłowsku (były ZSSR) w 1979 roku spowodowało przynajmniej 79 zachorowań na wąglika oraz 68 zgonów, co obrazuje potencjalne śmiertelne właściwości aerozolu przetrwalników tej bakterii.
- Aerosol przetrwalników jest bezwonny i niewidoczny, a przed rozproszeniem może pokonać wiele kilometrów.
- W 1970 roku eksperci Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oszacowali, że rozpylenie z samolotu 50 kg przetrwalników wąglika nad miastem zamieszkanym przez 5 milionów ludzi spowodowałoby śmierć 250 000 osób, z czego 100 000 zmarłoby przed rozpoczęciem leczenia.
- W raporcie przedstawionym przez US Congressional Office of Technology Assessment w 1993 roku obliczono, że po rozpyleniu pod wiatr 100 kg przetrwalników wąglika w okolicy Waszyngtonu śmierć poniosłoby od 130 tys. do 3 mln osób.
- Liczba ofiar byłaby więc taka sama, jak po wybuchu bomby wodorowej, lub większa.

- **Naturalnie występujący wąglik rozwija się po kontakcie z chorymi zwierzętami lub skażonymi produktami zwierzęcymi.**
- **Choroba najczęściej występuje u zwierząt roślinożernych, które się zakażają spożywając przetrwalniki obecne w glebie.**
- **U ludzi zakażenie wąglikiem może przebiegać pod trzema postaciami:**
 - **wziewną,**
 - **skórną oraz**
 - **żołądkowo-jelitową.**
- **Postać wziewna rzadko stanowi wynik naturalnego zakażenia.**
- **W przeszłości najbardziej zagrożeni zachorowaniem byli pracownicy zajmujący się sortowaniem wełny w zakładach przemysłowych.**
- **Najczęstszą naturalną postacią wąglika jest postać skórna; rocznie rozpoznaje się około 2000 takich przypadków.**
- **Zwykle występuje ona po kontakcie ze zwierzętami chorymi na wąglik.**

Mikrobiologia

- Nazwa laseczki wąglika (*Bacillus anthracis*) pochodzi od greckiego słowa *anthrakis* (węgiel), ponieważ choroba wywołuje czarne zmiany skórne
- *Bacillus anthracis* jest tlenową, Gram-dodatnią, nieruchomą bakterią z rodzaju *Bacillus*, tworzącą przetrwalniki.
- Nieurzęsiona komórka wegetatywna jest duża (dł 1-8 mm, szer 1-1,5 mm), a przetrwalniki mają średnicę około 1 mm.
- Bakteria szybko rośnie na zwykłych podłożach laboratoryjnych w temperaturze 37°C, a w obrazie mikroskopowym komórki wyglądają jak połączone łądy bambusa.
- Kolonie mają charakterystyczny wygląd przypominający kręcone włosy, charakteryzują je liczne splecione wypustki, nadające kolonii wygląd mitologicznej głowy Meduzy, kolonie ze strzępiastymi brzegami, nie powodują hemolizy na agarze z dodatkiem krwi baraniej.

Bacillus anthracis



Mikrobiologia

- Przetrwalniki węglika kiełkują w środowisku bogatym w aminokwasy i glukozę.
- Takie warunki zapewniają krew i tkanki zwierząt oraz człowieka.
- Szybko mnożące się wegetatywne laseczki węglika po wyczerpaniu się lokalnych zapasów substancji odżywczych tworzą przetrwalniki, podobnie kiedy zakażone płyny ustrojowe wystawione są na działanie powietrza.
- Do uzyskania pełnej zjadliwości bakterii niezbędna jest obecność otoczki chroniącej przed fagocytozą oraz trójskładnikowej toksyny: antygeny ochronnego (*protective antigen* - PA), czynnika letalnego (*lethal factor* - LF) oraz czynnika obrzęku (*edema factor* - EF).
- Wegetatywne postaci bakterii bardzo krótko przeżywają poza żywym organizmem - po 24 godzinach od wprowadzenia do wody liczba żywych bakterii zdolnych do tworzenia kolonii (*colony forming units* - CFU) zmniejsza się do niewykrywalnych wartości.
- Natomiast przetrwalniki mogą przetrwać dziesiątki lat.

Patogeneza oraz objawy kliniczne

- **Wziewna postać wąglika**
- Warunkiem rozwoju wziewnej postaci wąglika jest dotarcie do pęcherzyków płucnych przetrwalników
- Makrofagi fagocytują przetrwalniki, z których część ulega zniszczeniu.
- Pozostałe są przenoszone naczyniami chłonnymi do węzłów chłonnych śródpiersia, gdzie kiełkują; może to nastąpić nawet po 60 dniach od zakażenia.
- Po rozpoczęciu procesu kiełkowania choroba postępuje bardzo szybko.
- Mnożące się bakterie uwalniają toksyny powodujące krwotok, obrzęk i martwicę
- Druga faza choroby rozwija się gwałtownie, z nagłym wzrostem gorączki, dusznością, zlewnymi potami i wstrząsem.

Patogeneza oraz objawy kliniczne

- **Postać skórna węglika**
- Postać skórna węglika rozwija się w obrębie ran ciętych i otarć naskórka.
- Zmiany najczęściej rozwijają się na odsłoniętych okolicach ciała, na przykład na ramionach, rękach, twarz i szyi.
- Przetrwalniki kielkują w skórze, a wydzielana podczas tego procesu toksyna prowadzi do miejscowego obrzęku tkanek
- Początkowo zmiany mają postać swędzącej plamki lub grudki, która się powiększa i tworzy okrągłe owrzodzenie.
- Następnie powstaje bezbolesny, zagłębiony czarny strup, któremu często towarzyszy rozległy obrzęk okolicznych tkanek
- W ciągu kolejnych 1-2 tygodni strup wysycha, ulega demarkacji i odpada, zwykle nie pozostawiając blizny.
- Zmianom skórnym mogą towarzyszyć: zapalenie naczyń chłonnych, bolesne powiększenie węzłów chłonnych oraz objawy ogólnoustrojowe.

Skórna postać węglika.

A - zmiana na przedramieniu w 7. dniu choroby - widoczne pęcherzyki oraz owrzodzenie pierwotnego wykwitu plamkowego lub grudkowego.

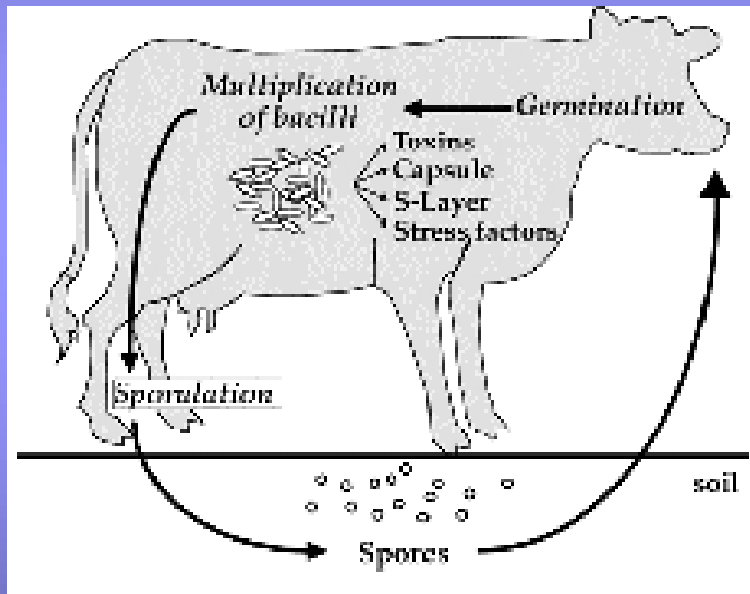
B - strup na szyi w 15. dniu choroby, charakterystyczny dla ostatniego stadium choroby, znika po kolejnych 1-2 tygodniach



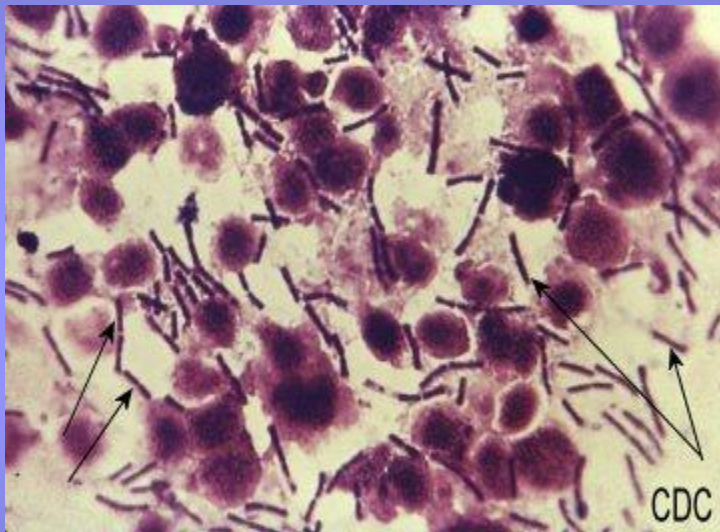
Postać żołądkowo-jelitowa wąglika

- Postać żołądkowo-jelitowa wąglika rozwija się w następstwie przedostania się oraz kiełkowania przetrwalników w przewodzie pokarmowym.
- Owrzodzenie jamy ustnej lub przelyku powoduje powiększenie okolicznych węzłów chłonnych i obrzęk, rozwija się również posocznica.
- Postać ta objawia się wymiotami oraz złym samopoczuciem; bardzo szybko pojawia się krwista biegunka, objawy ostrego brzucha oraz posocznica.
- Postać żołądkowo-jelitową wąglika spotyka się rzadko, aczkolwiek opisano epidemie w Afryce i Azji.
- Ta postać zakażenia występuje po spożyciu niedogotowanego skażonego mięsa i może się objawiać jako wąglik jamy ustnej i gardła lub postać jelitowa.
- Od 1978 roku nie zanotowano w USA żadnego zachorowania na postać wżewna wąglika, dlatego obecnie stwierdzenie nawet jednego przypadku stanowi sytuację alarmującą.

Bacillus anthracis-wąglik



Bacillus anthracis



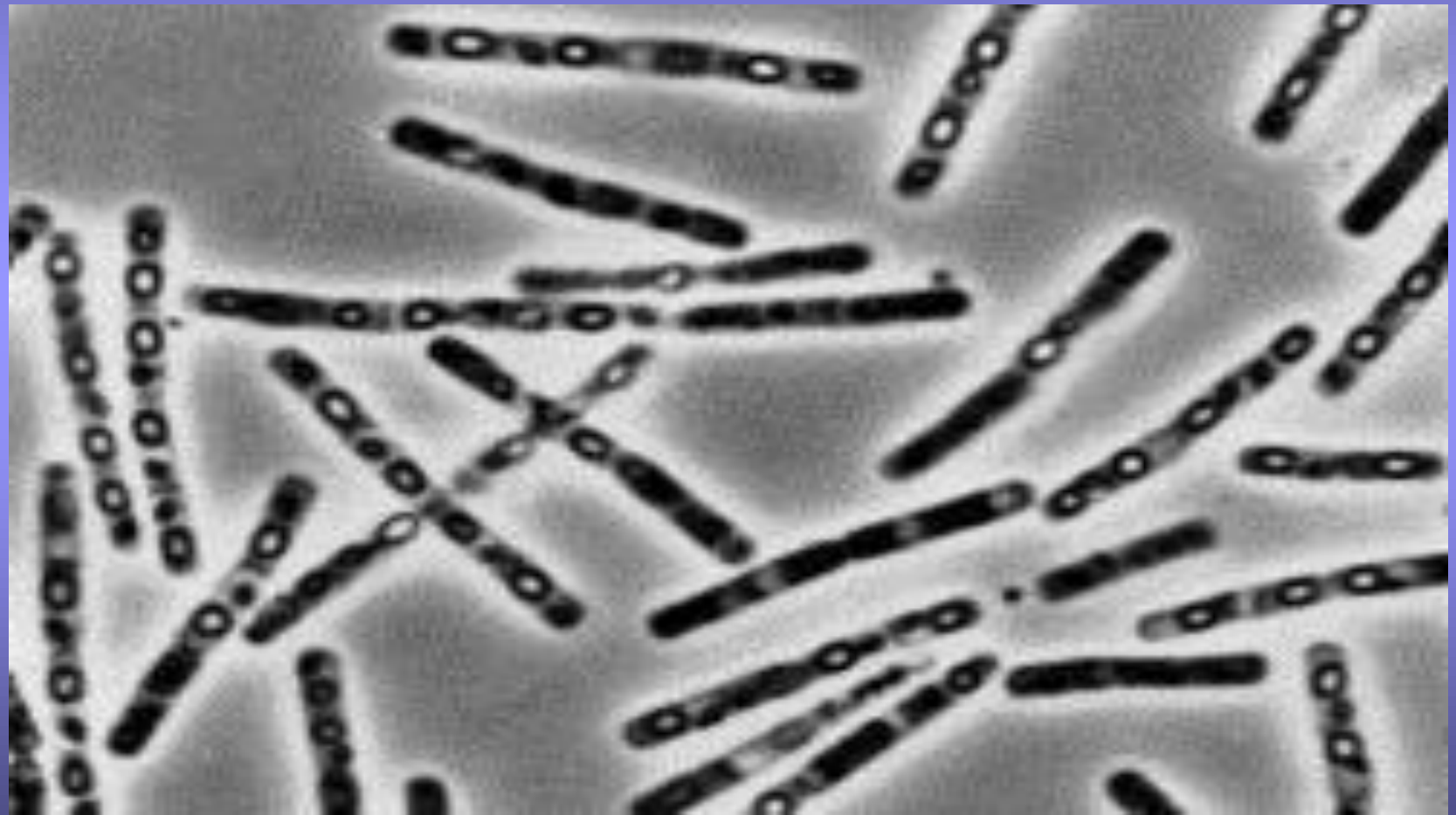
Inne *Bacillus* sp

- *Bacillus*; laseczki tlenowe, przetrwalnikujące.
- Mają właściwości gnilne.
- Należą tu ważne dla leśnictwa gatunki z rodzaju *Bacillus*, np. szeroko rozpowszechnione i atakujące gąsienice motyli *Bacillus cereus* oraz *B. thuringiensis*.
Bardzo rozpowszechnionym gatunkiem jest *B. subtilis* (laseczka sienna), wywołująca śluzowacenie pieczywa.
- Niektóre są chorobotwórcze.
- Rodzaj *Paenibacillus*-chorobotwórcze dla owadów

Bacillus thuringiensis

- Laseczka turyngska (*Bacillus thuringiensis*).
- Poznano szereg serotypów tej bakterii i stwierdzono, że *Bacillus thuringiensis var.israelensis serotyp H14* jest szczególnie chorobotwórczy dla larw komarów i meszek
- Laseczkę turyngską wykorzystano do produkcji środków owadobójczych
- W Polsce zarejestrowany jest preparat o nazwie SIMULIN o działaniu żołądkowym na larwy krwio pijnych muchówek.
- Substancją czynną preparatu jest mieszanina przetrwalników i kryształów białkowych (białkowa toksyna, białko Cry)
- Kryształy białkowe gdy dostaną się do jelita larw komarów, rozpadają się w środowisku zasadowym przewodu pokarmowego i tworząc silną truciznę, która niszczy ściankę jelita, umożliwiając krwi kontakt z jego zawartością.
- Do krwi larw dostają się zarodniki, kielkują w laseczki i szybko się namnażają.
- W wyniku tych zmian dochodzi do ostrego zakażenia krwi, kończącej się śmiercią larw komarów.
- Białka "Cry" odpowiadają za specyficzne działanie w stosunku do owadów z rzędów: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*.

Bacillus thuringiensis



Bacillus thuringiensis.Przetrwalniki i białko Cry

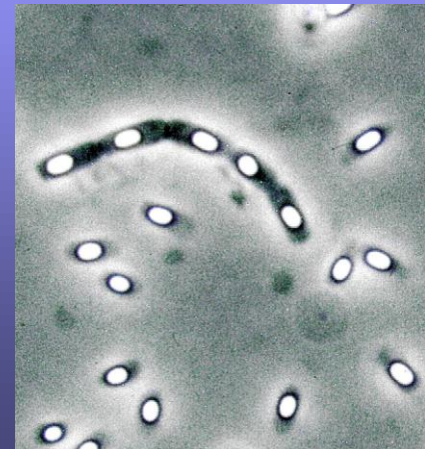


Bacillus thuringiensis. Zakazony owad

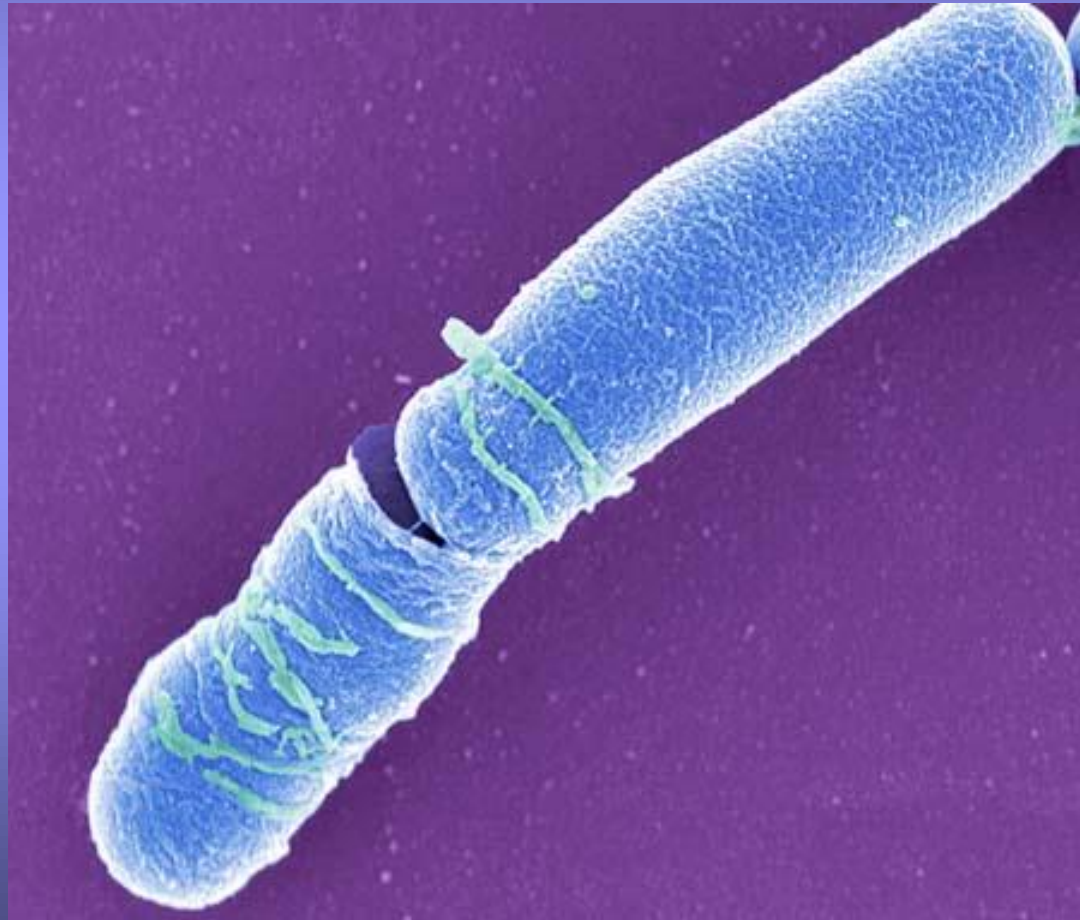


B.cereus

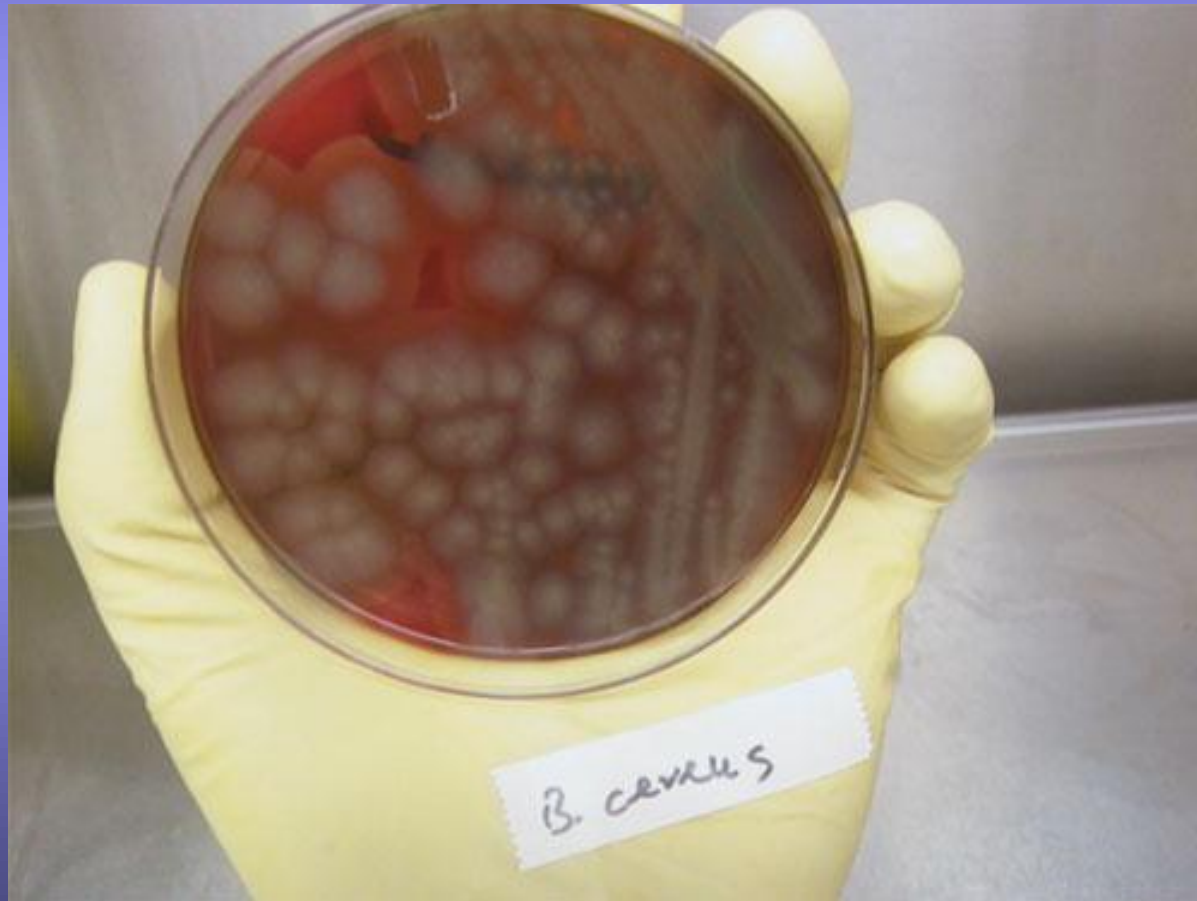
- *B.cereus* - ruchliwa, laseczka tlenowa, Gram(+), przetrwalnikująca (przetrwalniki ciepłooporne)
- Występuje w ziemi, na roślinach, w zbiornikach wodnych, wodzie wodociągowej, kurzu
- źródłem zakażenia są: potrawy mączne (skrobia sprzyja rozwojowi *B.cereus*), budynie, zupy, warzywa, przyprawy, wyroby garmażeryjne, kielbasy, mięsa.
- 10^7 - żywych komórek/g produktu powoduje zatrucie; u dzieci wystarcza 10^5



B.cereus



Bacillus cereus



Bacillus subtilis

- ***B. subtilis* (laseczka sienna)**, wywołująca śluzowacenie pieczywa
- Bakterie *Bacillus subtilis* mogłyby przetrwać wędrówkę międzyplanetarną w odłamku meteorytowym.
- Wytrzymały sześć lat w próżni kosmicznej, podróżując w satelicie LDEF.
- Gdyby pojazd kursował na trasie Ziemia - Mars, przebyłyby tę drogę kilkanaście razy.
- W Ames Research Center należącym do NASA zderzano granitowy panel pokryty tymi bakteriami z aluminiową kulą rozpędzoną do 5,4 km/s.
- Analizy szczątków wykazały, że większość mikroorganizmów przeżyła mimo przeciążeń 150 tys. razy przekraczających przyspieszenie ziemskie!

B.subtilis, pojedyncze kolonie



B.subtilis

