



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och  
folkhälsvetenskap

## ***Bacillus anthracis***

– Naturliga utbrott, bioattacker och veterinärens roll

### *Bacillus anthracis*

– Natural epidemics, bioattacks and the veterinarian's role

*Olivia Nordfeldt*

*Uppsala*  
*2017*



## ***Bacillus anthracis***

### **– Naturliga utbrott, bioattacker och veterinärens roll**

*Bacillus anthracis*

– Natural epidemics, bioattacks and the veterinarian's role

*Olivia Nordfeldt*

**Handledare:** Susanna Sternberg-Lewerin, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:** Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

#### **Kandidatarbete i veterinärmedicin**

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grundnivå, G2E

**Kurskod:** EX0700

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Delnummer i serien:** 2017:60

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *Bacillus anthracis*, anthrax, biovapen, biologiska krigföring, bioterrorism

**Key words:** *Bacillus anthracis*, anthrax, bioweapon, biological warfare, bioterrorism

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Summary.....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	4
Litteraturoversikt .....	4
Historisk bakgrund .....	4
<i>Bacillus anthracis</i> .....	5
Antrax hos människa.....	6
Patogenes för inhalationsantrax.....	7
Antrax hos djur .....	7
Diagnos och behandling .....	8
För människor.....	8
För djur .....	9
Vid en bioattack .....	9
Detektion .....	9
Dekontaminering och sekundär aerosol.....	9
Diskussion .....	10
<i>B. anthracis</i> som ett biovapen .....	10
Bioattack eller naturligt utbrott? .....	12
Veterinärens roll .....	12
Litteraturförteckning.....	15



## SAMMANFATTNING

Biologisk krigföring är inte ett nytt begrepp, tvärtom har forskare hittat mängder av exempel på sådana attacker redan från medeltiden, och ännu längre bakåt i tiden. Framväxten av den moderna mikrobiologin på 1900-talet, startade dock ett helt nytt kapitel och det var plötsligt möjligt att uppföröka stora mängder patogener. Begreppet bioterrorism myntades och ett flertal sådana attacker utfördes. Ett av de kändaste exemplen skedde i USA, 2001, då antraxsporer skickades i brev. *Bacillus anthracis* är en grampositiv bakterie med tre huvudsakliga virulensfaktorer: en kapsel och två toxiner. Den bildar också sporer vid ogynnsamma förhållanden och dessa sporer är väldigt persistenta i miljön. Bakterien infekterar människor och djur via tre olika infektionsvägar: kutant, gastrointestinalt eller via inhalation. Naturlig smitta drabbar främst herbivorer, när de betar i kontaminerade områden, men vid ett utbrott kan även människor smittas, främst de som jobbar nära de döda djuren.

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka varför *B. anthracis* har blivit ett så använt och välkänt biovapen och vilka skillnader som finns mellan naturliga och artificiella utbrott. Fokus kommer också att ligga på veterinärens roll under en bioattack och vid förebyggande arbete.

*B. anthracis* har många av de egenskaper som ett biovapen bör ha. Sporer finns på många laboratorier runt om i världen, där de används för forskning, och lyckas man få tag på dem behöver de inte transporteras långt för att användas. Sporererna är tåliga och kan därav transporteras utan att de mister sin virulens. *B. anthracis* har också hög letalitet och morbiditet, vilket ofta är viktigt vid bioattacker, dock har bakterien en relativt hög infektionsdos. Trots att *B. anthracis* har många av de egenskaper som är viktiga för ett biovapen, krävs mikrobiologisk kunskap för att faktiskt kunna använda den.

Vid misstanke om en bioattack med antrax har mikrobiologer tillsammans med epidemiologer och veterinärer en viktig uppgift att avgöra om det faktiskt är en bioattack och inte ett naturligt utbrott. Det första som kan observeras är om djur av olika arter smittats, eftersom det vid ett naturligt utbrott konstaterats att sjukdomen ofta drabbar en art, även om andra känsliga arter befinner sig i samma område. Vidare kan mikrobiologiska undersökningar visa vilken eller vilka stammar av bakterien det rör sig om. Vid flera stammar kan misstanke om bioattack förstärkas, eftersom en naturlig smitta kommer från ett endemiskt område, ofta med en stam. Om människor smittas kan också antalet kutant respektive inhalationssmittade jämföras. Vid ett naturligt utbrott är nämligen den kutana formen överlägset vanligast. Alla dessa faktorer kan användas för att skilja på ett naturligt utbrott och en bioattack. Veterinärer har också en central roll vid bioattacker. De flesta bioagens är zoonotiska och djur som drabbas kan användas som vaktpostdjur. Övervakning och att känna igen ovanliga utbrott är också essentiellt för att snabbt kunna identifiera bioattacker och därav minska smittans storlek, antalet insjuknade och antalet dödsfall.

## SUMMARY

Biological warfare is not a new concept, on the contrary, researchers have found many examples of such attacks from the Middle Ages and even further back in time. The rise of modern microbiology, during the 20<sup>th</sup> century, started a whole new chapter, when it enabled microbiologists to propagate large quantities of pathogens. Bioterrorism also emerged and several attacks were carried out. One of the most infamous examples happened in 2001, in the United States, where letters containing anthrax spores were sent via the mail.

*Bacillus anthracis* is a gram-positive bacterium with three major virulence factors: one capsule and two toxins. It can also sporulate in unfavorable conditions and these spores are very persistent in the environment. The bacterium has three different routes of infection: cutaneous, gastrointestinal or through inhalation. Natural infection affects mostly herbivores, as they graze in contaminated areas. But in an outbreak, humans could also be infected if exposed to the dead animals.

The purpose of this study is to investigate why *B. anthracis* has become such a well-known and used bioweapon and the difference between natural and man-made outbreaks. It will also include the veterinarian's role in preventing and managing a bioattack.

*B. anthracis* possesses many of the characteristics a bioweapon should have. Spores exist in many laboratories throughout the world, where they are used for research. If someone gets a hold of them, there is no need for transport and the spores are sustainable enough to not lose their virulence if transported. *B. anthracis* also has a high lethality and morbidity, which is important in a bioweapon. However, the bacterium has a relative high infectious dose. Although *B. anthracis* possesses many of the characteristics that are important in a bioweapon, the usage requires microbiological knowledge.

If there is suspicion that an outbreak is not natural, microbiologists, epidemiologists and veterinarians have an important task to determine whether this is the case. The first thing that can be observed is if different species are infected, because in a natural outbreak there is often only one species affected, even if there are other sensitive species in the same area. Microbiological studies can also show if there's more than one strain in the outbreak. If there is more than one strain it suggests a bioattack, because natural outbreaks occur in endemic areas, which often just have one strain. If humans are infected, a comparison between the number of cases with the cutaneous versus the inhalation form should be investigated. In a natural outbreak the cutaneous form is by far the most common. All these factors can be used to distinguish between a natural outbreak and a bioattack. Veterinarians also have a fundamental role in bioattacks. Most bioagents are zoonotic and infected animals can be used as sentinels. Monitoring and recognizing unusual outbreaks is also essential to quickly identify bioattacks and hence reduce the size of the outbreak and the number of infected and deceased.



## INLEDNING

Man skulle kunna tro att biologisk krigsföring är något relativt nytt och att utvecklandet av sådana vapen kräver en viss förståelse för mikrobiologi. Detta är sant i viss mån, men biologisk krigsföring finns beskriven långt innan utvecklandet av den moderna mikrobiologin. Ett av de första exemplen på biologisk krigsföring var i hettiernas krig mot Arzawan då de ska ha använt djur för att försöka infektera fienden med tulararemi eller harpest (Trevisanato, 2007). Om detta verkligen skett är dock omdiskuterat eftersom få vetenskapliga fakta finns. De enda fakta som finns dokumenterade från detta är beskrivningen av en ritual i en religiös text (Carus, 2015). Huruvida ett historiskt exempel, tidigare än 1800-talet, på biologisk krigsföring verkligen skett är svårbedömt, då inte tillräckligt med vetenskapliga data samlats in. Dessa fakta kan också ha manipulerats och därför är det svårt för forskare att idag dra slutsatser om sjukdom orsakats av en naturlig epidemi eller av biologisk krigsföring.

Vändpunkten för modern mikrobiologi kom i slutet av 1800-talet. Forskare kunde nu börja uppföröka stora mängder av specifika patogener. På 1900-talet med de två världskrigen förändrades också människans sätt att kriga och det kom att spela en stor roll för utvecklandet av biovapen och lade grunden till det hot vi idag kallar bioterrorism (Barras & Greub, 2014). Bioterrorism definieras som ett medvetet utsläpp av virus, bakterier eller andra agens för att ge sjukdom hos människor, djur eller växter. Målet kan vara att orsaka död, rädsla, kaos eller ekonomisk förlust och syftet kan vara politiskt, ideologiskt eller religiöst. Introduktionen av bioterrorism har också resulterat i en ny situation där mikrobiologer och epidemiologer måste kunna skilja på ett naturligt utbrott och en bioattack.

Genèveprotokollet från 1925 förbjuder utvecklandet och produktionen av biologiska och kemiska vapen, vars syfte är att användas i krig. Det ratificerades 1972 genom the Biological and Toxin Weapon Convention (BTWC) som förbjuder utvecklandet, produktionen och förvaringen av biologiska vapen för krigshandlingar. BTWC har dock sina brister: den namnger inte specifika agens, det finns ingen inspektion och krigföringsprogram kan lätt gömmas i annan mikrobiologisk forskning (Jansen *et al.*, 2014). Inga sanktioner finns heller omnämnda vid överträdelse (Riedel, 2004).

I denna litteraturstudie är syftet att undersöka vad som skiljer ett naturligt utbrott från en bioattack. Fokus kommer att ligga på *Bacillus anthracis*, då det är ett klassiskt exempel på ett biovapen som använts vid flertalet gånger i historien både avsiktligt och oavsiktligt. Varför har *B. anthracis* blivit så studerat och förknippat med biovapen, vad är viktigt vid en bioattack och vad har veterinären för roll i allt detta?

## MATERIAL OCH METODER

Vid litteratursökningen användes framförallt Web of Science med sökorden: ("Bacillus anthracis" OR anthrax OR "B. anthracis") AND (bioweapon OR bioterror OR bioterrorism OR "biological warfare" OR "microbiological war"). Även utökade sökningar med sökorden: (aerosol\* OR contamination OR reaerosol\*) utfördes. Källor hittades också via referenslistor från vetenskapliga artiklar. Vissa sökningar efter specifika artiklar gjordes i Pubmed.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Historisk bakgrund

Under första världskriget startade Tyskland ett biovapenprogram och genom detta försökte de exempelvis skicka antraxinfekterade hästar och nötkreatur till bl.a. USA (WHO, 2008). Frankrike ska ha svarat på dessa attacker, men i mindre skala (Carus, 2015). Japan tog under mellankrigstiden efter Tyskland och startade ett eget biovapenprogram, kallat Unit 731. Detta har blivit väldigt uppmärksammat eftersom de utförde experiment på krigsfångar från bl.a. Korea, Kina, Mongoliet, Sovjetunionen och USA och ca 10 000 människor beräknats ha dött till följd av detta (Riedel, 2004). Japan utförde också en bioattack med antraxsporer över Kina där tusentals människor dog (Barras & Greub, 2014). Efter andra världskriget gav dock USA straffimmunitet för både experimenten och utsläppen i utbyte mot den kunskap som insamlats (D'Amelio *et al.*, 2015).

En antraxepidemi utbröt i Sverdlovsk, Sovjetunionen, 1979, vilket resulterade i 66 dödsfall, de flesta till följd av inhalationsantrax (Cieslak & Eitzen, 1999). De drabbade levde eller jobbade nära den mikrobiologiska militäranläggningen i staden. Utbrottet drabbade också en mängd boskap med en radie på 50 km från smittokällan (Riedel 2004). Får rapporterades ha dött till följd av antrax på ett avstånd av ca 60 km (WHO 2008). Sovjetunionen skyllde först smittan på förtäring av kontaminerat kött från svarta marknaden, men USA menade att orsaken egentligen var ett oavsiktligt utsläpp från det närliggande militära laboratoriet (Poupard & Miller, 1992). Genom att senare utföra omfattande molekylära undersökningar på vävnadsprover från 11 individer som dött av sjukdomen kunde det konstateras att spår från multipla stammar av *B. anthracis* förekommit (Jackson *et al.*, 1998). År 1992 erkände den dåvarande presidenten, Boris Yeltsin att de på militäranläggningen forskade kring ett offensivt program för framtagandet av biologiska vapen och att utbrottet var till följd av ett oavsiktligt utsläpp av antraxsporer därifrån (Riedel, 2004).

Ett exempel på en modern bioterrorattack utfördes av sekten Aum Shinrikyo, 1995, då de släppte ut nervgasen sarin på fem tåg i Tokyos tunnelbana. Målet var att starta ett apokalyptiskt krig där sekten skulle segra och därefter styra Japan. Totalt 12 människor dog p.g.a. attacken och över 1400 människor skadades (Jansen *et al.*, 2014). Vid polisens efterforskningar framkom att sektens egna kemister lyckats framställa sarinet och att de också hade tillgång till både

antraxsporer och botulinumtoxin (Jansen *et al.*, 2014). Sporererna hade de också försökt använda, men misslyckats i alla fall tre fallen. All information har inte blivit publicerad så omfattningen av sektens biovapenprogram är än idag inte helt kartlagd (Riedel, 2004).

Den 3 oktober 2001 i Jacksonville, fick USA:s hälsodepartement in ett bakterieisolat från en patient med meningit. *B. anthracis* misstänktes och efter konfirmerande tester, kunde det även konstateras. Detta ledde till en insamling av miljöprover där smitta skulle kunna förekomma. De platser där *B. anthracis* konstaterades pekade på ett avsiktligt utsläpp av bakterien. Tolv dagar senare öppnade en senator ett brev och ett vitt pulver spred sig i den kontorsbyggnad han befann sig i. *B. anthracis* konstaterades snabbt och ventilation och luftkonditionering stängdes av (Craft *et al.*, 2014). Genom molekylära undersökningar kunde man konstatera att det rörde sig om samma stam av *B. anthracis* (Ames-stammen) som påträffats tidigare (Hoffmaster *et al.*, 2002). Av de 22 som infekterades hade 11 inhalationsantrax och 11 den kutana formen. Efter incidenten, som fått namnet Amerithrax, har en hel del bluffar förekommit, däribland tiotusentals brev med okänt vitt pulver. Sporer av *B. anthracis* kan se ut som andra vita pulver som vetemjöl, talkpulver, bakpulver och även sporer från andra *Bacillus*-arter, både patogena och icke-patogena (D'Amelio *et al.*, 2015). Efter breven ökade också antalet förfrågningar att undersöka kontaminerade brev, miljömaterial, svabbningar etc. (Craft *et al.*, 2014).

### ***Bacillus anthracis***

*Bacillus anthracis* är en grampositiv bakterie som vanligtvis infekterar djur, men i ovanliga fall även människor (Jaton & Greub, 2014). Människor smittas framförallt via kontakt med infekterade djur eller kontaminerade animaliska produkter (Azarkar & Zare Bidaki, 2016). *B. anthracis* är aerob, icke-motil och icke-haemolytisk (Bossi *et al.*, 2004). Den bildar sporer vid ogynnsamma förhållanden som hetta, kyla, torra eller brist på näringsämnen. Essentiellt för sporuleringen är kontakt med syre (WHO, 2008). Sporererna är resistenta mot torra, värme, ultraviolett ljus, gammastrålning och flertalet desinfektionsmedel och de kan förbli livskraftiga och ha kvar förmågan att infektera djur och människor i flera decennier (Bossi *et al.*, 2004). I naturen kan sporererna gro ut till vegetativa celler igen när förhållandena åter blir gynnsamma (D'Amelio *et al.*, 2015).

*B. anthracis* har tre virulensfaktorer: en kapsel som skyddar mot fagocytos och två toxiner. Generna för dessa återfinns i två plasmider: pXO1 och pXO2 (Jackson *et al.*, 1998). I pXO1 återfinns generna för de två toxinerna och i pXO2 återfinns de tre generna för bildandet av kapseln (capA, capB och capC) (Kim *et al.*, 2015). Med kapseln kan bakterien undvika immunförsvaret eftersom den innehåller poly-D-glutamat, vilket skyddar bakterien från att fagocyteras (Jackson *et al.*, 1998) och opsoniseras (Kim *et al.*, 2015). Virulensen hos *B. anthracis* bestäms också av produktionen av tre proteiner: protektivt antigen (PA), letalfaktor och ödemfaktor. Dessa tre samverkar och bildar två exotoxiner, letalt toxin och ödemtoxin.

Båda toxinerna behöver det protektiva antigenet för att transporteras in i målceller (Bossi *et al.*, 2004). Om en av plasmiderna saknas kommer virulensen att försvagas (D'Amelio *et al.*, 2015).

*B. anthracis* naturliga cykel består av förökning i värddjur och när dessa dör sporulerar den vegetativa cellen och sporererna kontaminerar miljön för att sedan intas av nya värddjur. (WHO, 2008)

### **Antrax hos människa**

Det finns tre huvudsakliga infektionsvägar för *B. anthracis* hos människa: kutant, gastrointestinalt eller via inhalation (Bossi *et al.*, 2004). Kutantrax är den vanligaste typen vid en naturlig smitta (Broussard, 2001) och den infekterar via kontakt från infekterade djur som exempelvis nötkreatur, får och getter. Den är lätt att diagnostisera eftersom det finns få differentialdiagnoser och är lätt att koppla till de som jobbar med djur eller djurprodukter. Antibiotika fungerar bra och det leder till låg letalitet (Cieslak & Eitzen, 1999). Den gastrointestinala formen är ovanligare och fås via konsumtion av otillräckligt tillagat kött från infekterade djur (Broussard, 2001). Historiskt har människor blivit smittade med antrax via djurkontakt eller kontakt med animaliska produkter. Djuren smittas via intag av antraxsporer i jorden där de betar (Bossi *et al.*, 2004).

Ett av de nyligaste, naturliga utbrotten av antrax skedde i Zimbabwe mellan 1979-1985 där cirka 9000 fall beskrevs varav 141 dog. Letaliteten var således lägre än 2 %. De flesta infektionerna var kutana, men även fall av gastrointestinal- och inhalationsantrax förekom. (Davies, 1983)

Människor är inte lika känsliga för antrax som djur. Detta har konstaterats via människa/djurratio, där fler djur än människor drabbas vid ett utbrott. När det gäller människor som hanterat kadaver av smittade djur har det observerats att få människor smittats. I norra Europa smittas ungefär en människa kutant per tio öppnade antraxkadaver. Historiskt kan det också påvisas att innan antibiotika, vaccin eller antiserum, fanns ändå mycket antraxsporer i miljön och många djur insjuknade, men antalet människor som infekterades och utvecklade sjukdom var relativt lågt. Ett exempel på detta var i Storbritannien mellan 1900 och 1949 där endast ca 40 fall rapporterades. (WHO, 2008)

Injektionsantrax är en nyupptäckt form, vilken har observerats hos drogmissbrukare, troligtvis som resultat av kontaminerat heroin. Eftersom det inte är en naturlig infektionsform och ger värre symtom än kutantrax, har diagnos ställts sent, behandlingen varit otillräcklig och det har bidragit till en hög letalitet. (Berger *et al.*, 2014)

### **Patogenes för inhalationsantrax**

Luftburna antraxsporer inhaleras och kan beroende på storlek stanna i de övre luftvägarna eller ta sig genom broncherna till alveolerna där de fagocyteras av alveolarmakrofager. Därefter förs de vidare till regional lymfatisk vävnad där sporerne gro ut till vegetativa celler (Bossi *et al.*, 2004). Som vegetativa celler börjar bakterien producera toxiner. Ödemtoxinet innehåller protektivt antigen (PA) och ödemfaktor (Broussard, 2001). PA aktiveras proteolytiskt i blod och vävnad och väl aktiverad binder den till en receptor på cellytan och främjar endocytos av toxinkomplexet in i cellens cytoplasma (Bower *et al.*, 2015). Ödemfaktorn innehåller calmodulin-beroende adenylatcyklas, vilket ökar de intracellulära nivåerna av cykliskt AMP, som i sin tur stör vätskehomeostasen. Letalt toxin består av PA och letalfaktor, ett zinkmetalloproteas som inaktiverar mitogen-aktiverade proteinkinaser och stimulerar makrofager att utsöndra TNF- $\alpha$  (tumor-necrosis faktor  $\alpha$ ) och IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ) (Broussard, 2001). Toxinerna ger lokal nekros och omfattande ödem (Bossi *et al.*, 2004). Nekros av den regionala lymfvävnaden resulterar i att bakterien kommer ut i cirkulationen (Cieslak & Eitzen, 1999).

Sporerna kan också ligga latenta i värden, i lungalveolerna (WHO, 2008). Det kan ta flera veckor innan de gro ut till vegetativa celler. Därför har sjukdomen ibland en mycket längre inkubationstid. Vanligtvis är inkubationstiden runt fyra dagar, men som vid Sverdlovsk observerades allt mellan 2 till 43 dagar (Bossi *et al.*, 2004). Inkubationstiden korrelerar också med dosmängden sporer (Bossi *et al.*, 2004). ID<sub>50</sub> för infektion är 8000-10 000 sporer, men kan variera mellan individer (Cieslak & Eitzen, 1999).

Hemorragisk meningit kan utvecklas från alla typer av antrax, men vid inhalationstypen utvecklar ungefär 50 % av patienterna detta tillstånd (Bossi *et al.*, 2004). Denna komplikation bör beaktas vid en bioattack av antrax (Bower *et al.*, 2015).

### **Antrax hos djur**

Antrax eller mjältbrand drabbar främst herbivorer. Hur de smittas är inte helt klarlagt, men det sker troligtvis via tre huvudsakliga infektionsvägar: genom konsumtion av sporer vid bete, inhalering av sporer från jorden eller mekaniskt via bitande flugor. Den mekaniska smittan sker när flugornas mundelar kontamineras med blod av djur som dött av antrax och de därefter biter friska djur. Direkt smitta från djur till djur anses obetydlig förutom för karnivorer. (WHO, 2008)

Inkubationstiden varierar mellan djurart och om smittan är artificiell eller naturlig. Hos nötkreatur som smittats naturligt är inkubationstiden mellan 1 till 14 dagar. Det första tecknet på smitta är att djur plötsligt dör utan tidigare symtom. Efteråt brukar djurägare dock minnas milda symtom. Symtomen under den systemiska fasen är ängslan, andningssvårigheter och

minskad aptit därefter hamnar djuret i koma för att sedan avlida. För känsliga djurarter kan förloppet vara så kort som några timmar. (WHO, 2008)

Hos de flesta arter har kadavren fullt av *B. anthracis* i blodet, vilket kan användas vid diagnos, dock minskar antalet med tiden. Ett djur som dött av antrax kan också kännas igen genom otillräcklig koagulering av blodet samt att blodet är mycket mörkt. Djuret har också ofullständig *rigor mortis* och blod kan rinna från kroppsöppningar. Många länder förbjuder öppnande eller obduktion av ett misstänkt antraxkadaver, då bakterierna i blodet sporulerar vid kontakt med syre. (WHO, 2008)

Om ett kadaver misstänks ha dött av antrax ska kroppen destrueras så snart som möjligt. Platsen ska dekontamineras och behandling av andra djur påbörjas. (WHO, 2008)

## **Diagnos och behandling**

### **För människor**

En tidig diagnos kan vara svår att ställa vid inhalationsantrax då de initiala symtomen är diffusa och lätta att förväxla med andra sjukdomar. Symtomen är mild feber, hosta, myalgi, dyspné, huvudvärk, kräkningar, svaghet, mag- och bröstsmärtor samt illamående (Bossi *et al.*, 2004). En av de mest användbara diagnosmetoderna är en selektiv mikrobiologisk odling på polymyxin-lysozyme-EDTA-thallus-acetate agar (PLET) (Kim *et al.*, 2015). Prover tas från pleuravätska eller via biopsi från pleura eller bronker (Bossi *et al.* 2004). För att kunna bevisa att det rör sig om *B. anthracis* måste bakterien isoleras och bakteriellt DNA eller antigen detekteras. Om antibiotikabehandling inletts fungerar inte odling och istället utförs PCR och serologiska tester. Varken odling eller serologiska tester är så snabba, vilket är ett problem vid inhalationsantrax som har ett snabbt sjukdomsförlopp och därav är PCR den bästa metoden (D'Amelio *et al.*, 2015). Plasmiderna pXO1 eller pXO2 används ofta som genetiska markörer för *B. anthracis*, men det har sina begränsningar eftersom vissa linjer av *B. anthracis* inte har dessa plasmider, till exempel speciella vaccinlinjer. Genom att använda plasmiderna kan *B. anthracis* också förväxlas med bakterier ur *B. cereus*-gruppen och därför bör andra markörer användas (Kim *et al.*, 2015). Detta är dock endast viktigt när det rör sig om en bioattack eftersom *B. anthracis* utan plasmider saknar virulens.

Vid inhalationsantrax ska antibiotikabehandling startas så tidigt som möjligt, gärna innan diagnos hunnit fastställas. Detta p.g.a. att det terapeutiska fönstret för en lyckad behandling är väldigt smalt och prognosen för sjukdomen är dålig. Det kan dock vara problematiskt eftersom inhalationsantrax lätt kan förväxlas med olika former av pneumoni (Kuehnert *et al.*, 2003). Vid exponering för antrax rekommenderas en 60 dagars antibiotikakur. Förseningar av behandling leder till att toxin ackumuleras i kroppen och chansen att överleva minskar drastiskt (Head *et al.*, 2016).

## **För djur**

Vid ett utbrott hos djur ska antibiotikabehandling först sättas in, följt av vaccinering. Vaccineringen får dock inte utföras direkt efter behandlingen eftersom antibiotika avdödar levande vaccin. Därför bör man också beakta i fall djurfodret innehåller antibiotika. Väntetiden beror på vilken antibiotika som används. Stödbehandling kan också användas under infektionen, med analgetika, antiflogistika och antipyretika. Platsen ska också dekontamineras och djuren sättas i karantän, i ungefär 21 dagar efter det sista dödsfallet. I endemiska områden där misstanke om utbrott föreligger bör vaccinering av boskap ske profylaktiskt. (WHO, 2008)

I vissa länder är det förbjudet att behandla antraxinfekterade djur. Veterinärer ska istället snabbt identifiera sjukdomen och därefter avliva djuren utan blodspillan. Ibland implementeras även avlivning av hela besättningen. (WHO, 2008)

## **Vid en bioattack**

### **Detektion**

Bioagens är ofta effektiva vid låga doser och därför behöver detektionsmetoder vara tillräckligt känsliga. De måste också vara selektiva eftersom bioagens kan levereras på en mängd olika sätt, exempelvis via mat, vatten, aerosol, infekterade djur eller insekter (Duriez *et al.*, 2016). Databaser för bioterroragens finns för att snabbt kunna identifiera rätt agens vid attack (Jaton & Greub, 2014). Just *B. anthracis* är svår att identifiera eftersom dess kromosom generellt är mycket lik *Bacillus cereus*. Det som skiljer dessa åt är bl.a. plasmiderna som ger *B. anthracis* sin virulens (Read *et al.*, 2003). Det är ändå möjligt att differentiera olika linjer och sublinjer av *B. anthracis* med ett test med hög känslighet. Ett exempel är MLVA (multiple-locus VNTR analysis) som fokuserar på hypervariabla VNTR loci (variable-number tandem repeat). Det är ett välfungerande, snabbt test som endast kräver lite DNA (Keim *et al.*, 2000). MLVA spelade en viktig roll vid utredningen av Amerithrax (WHO, 2008).

### **Dekontaminering och sekundär aerosol**

Efter en attack är det inte bara människor som drabbas, utan även miljön eftersom antraxsporer kan persistera där i årtionden. Därför är en viktig del i arbetet att dekontaminera miljön. Den största risken för infektion vid en bioattack med antrax är den primära aerosolen. En sekundär aerosol är möjlig om stora mängder sporer hamnar på olika ytor (D'Amelio *et al.*, 2015). Det finns alltså en risk för sekundär aerosol i byggnader som kontaminerats med sporer och detta kan leda till infektion långt efter den initiala attacken. Detta kan ske via vind, människor som promenerar eller trafik, egentligen all typ av mekanisk rörelse (Hamilton *et al.*, 2015). Sekundär aerosol är inte så välstuderat och är beroende av en mängd olika faktorer som till exempel van der Waals och elektrostatiska krafter, adherering och ytspänning hos adsorberad vätska (Edmonds *et al.*, 2016). Det råder också delade meningar kring risken att utveckla inhalationsantrax till följd av sekundär aerosol. Ett exempel var i en belgisk ullsorteringsfabrik,

där sporer från en naturlig källa blev sekundär aerosol och gav en subklinisk infektion, istället för en fullt utvecklad sjukdom (Hamilton *et al.*, 2015). Under Amerithrax däremot smittades två individer med inhalationsantrax och utvecklade sjukdomen via sekundär aerosol från brev som kontaminerats i posten (Edmonds *et al.*, 2016). Risken för infektion vid sekundär aerosol är mindre än vid primär aerosol p.g.a. att partiklarna kommer att fästa på ytor och agglutinera och när mekanisk rörelse leder till aerosol är det inte längre lika många partiklar som är infektionsdugliga (Cieslak & Eitzen, 1999).

## DISKUSSION

### **B. anthracis som ett biovapen**

*Bacillus anthracis* har länge blivit förknippad med bioterrorism och biovapen. Varför just *B. anthracis* har blivit känd som ett biovapen och faktiskt använts ett flertal gånger beror på en mängd faktorer. Naturliga utbrott av antrax är relativt ovanliga i norra Europa (WHO, 2008) och här har sjukdomen istället förknippats med bioterrorism, framförallt efter Amerithrax. Men varför har den då använts så pass ofta att den blivit associerat med biovapen?

Ett biovapen måste vara lättillgängligt och både vid Amerithrax och utsläppen i Japan av Aum Shinrikyo har genotypning visat att det inte rörde sig om naturliga stammar utan stammar framställda på laboratorium i respektive land. I USA var det den virulenta Ames-stammen som är väldigt ovanlig i naturen (Budowle *et al.*, 2005) och i Tokyo, Sterne-stammen som används för vaccinering av djur (Takahashi *et al.*, 2004). Detta visar tydligt att säkerheten på statliga laboratorier inte är optimal och att terrorister faktiskt har fått tag på mikroorganismer som kan användas för bioterrorism.

En annan viktig aspekt för biovapen är att mikroorganismen har en låg infektionsdos och beroende på syftet bakom attacken, en hög letalitet. *B. anthracis* har relativt hög infektionsdos då ID<sub>50</sub> ligger på 8000-10000 sporer (Cieslak & Eitzen, 1999), men istället väldigt hög letalitet, framförallt vid inhalationsantrax (Kuehnert *et al.*, 2003). Mikroorganismen ska också ha potentialen att smitta många. År 1970 skrev WHO en rapport där de beskrev att om ett utsläpp av 50 kg antraxsporer utspridda över en 2 km lång linje vid en stad med 500 000 invånare skulle det leda till 95 000 dödsfall (WHO, 1970). Detta visar att *B. anthracis* både har hög morbiditet och letalitet. Rapporten kan också ha bidragit till att många fått upp ögonen för just *B. anthracis*, då rapporten beskriver vilka stora konsekvenser en attack skulle kunna ha. Det kan även ha påverkat den allmänna uppfattningen om antrax, då medvetenheten och rädslan förhöjts.

För att en mikroorganism faktiskt ska kunna användas måste den också kunna uppföras i stora mängder, framförallt om den har en högre infektionsdos. Detta för att uppnå en hög morbiditet och för att kunna spridas över större områden. Eftersom *B. anthracis* är möjlig att odla i nästan obegränsad mängd i laboratorium (WHO, 1970), är den ett möjligt alternativ vid



en stor aktion av bioterrorism. Vid uppförningen måste mikroorganism också vara fortsatt livskraftig och virulent. *B. anthracis* sporer är kända för att kunna överleva och vara fortsatt virulenta i miljön i årtionden (Broussard, 2001) och eftersom de inte påverkas nämnvärt av miljön, lämpar de sig bra för biovapen.

Med tanke på infektionsdosen, är *B. anthracis* inte det mest potenta biovapnet, men eftersom den är relativt lättillgänglig (vilket visas både i USA och Tokyo), är lätt att odla, har hög morbiditet och letalitet överkommer det problemet med den något högre infektionsdosen. *B. anthracis* är också ett välkänt agens för biovapen och således ett bra alternativ om målet är att inte rädsla och skapa kaos. Den kan också persistera i miljön och åter bli aerosol och därav orsaka sjukdom långt efter den initiala attacken. På många sätt uppfyller just *B. anthracis* de kriterier som ett biovapen ämnat för bioterrorism eller biologisk krigföring bör ha och det är troligtvis därför som det också är ett av de mest kända för allmänheten.

Om nu *B. anthracis* ska utnyttjas som ett biovapen kan inte naturligt förekommande sporer användas. Naturlig infektion av *B. anthracis* ger sällan inhalationsformen (Azarkar & Zare Bidaki, 2016) som ofta eftersträvas vid en bioattack p.g.a. letaliteten. För att kunna ge inhalationsformen måste sporerna ge en infektion i nedre luftvägarna och detta är beroende av att sporerna är av en viss storlek, 2-6  $\mu\text{m}$  (Cieslak & Eitzen, 1999). De får alltså inte vara större eller agglutinera så att de överskrider 6  $\mu\text{m}$ . De får inte heller fästa vid ytor, utan måste vara luftburna för att kunna inhaleras. När partiklarna är större än 6  $\mu\text{m}$  agglutinerar de också lättare (Cieslak & Eitzen, 1999). För att förhindra agglutination och adherering kan en så kallad fluidizer användas på torra partiklar (Edmonds *et al.*, 2016). Den förhindrar exempelvis statisk elektricitet som får partiklarna att klumpa ihop sig. Alla dessa ovan nämnda faktorer kan försvåra processen att utföra ett bioterroristiskt dåd och förklarar också varför en naturlig smitta av inhalationsformen är så ovanlig.

Aum Shinrikyos utsläpp av antraxsporer i Tokyo är ett bra exempel på hur essentiell mikrobiologisk kunskap är och vad som sker om detta saknas vid användandet av mikroorganismer. Sekten hade nämligen tillgång till antraxsporer, men laborationsresultat visade att de tillhörde vaccinstammen Sterne som för det första saknar virulensfaktorn, pXO<sub>2</sub>, och kan därför inte bilda kapsel (Keim *et al.*, 2001) och för det andra är icke-patogen. Utöver detta var viskositeten större än optimalt och partiklarna klumpade ihop sig och blev således större än 6  $\mu\text{m}$  (Takahashi *et al.*, 2004). Aum Shinrikyos antraxsporer kunde alltså inte bli luftburna, inhaleras eller nå de nedre luftvägarna och även om de lyckats med alla dessa tre, var stammen inte patogen och skulle därför inte ha orsakat sjukdom. Det krävs följaktligen mer än bara tillgång till sporer för att kunna orsaka ett terroredåd med mikroorganismer.

## Bioattack eller naturligt utbrott?

Vid en bioattack är det viktigt att rätt agens identifieras snabbt. Man måste även kunna identifiera och detektera agens som inte vanligtvis stöts på naturligt. *B. anthracis* kan vara svår att diagnostisera eftersom den sällan drabbar människor (Jaton & Greub, 2014). Eftersom tidig detektion och identifiering av agens är viktig har mikrobiologer en nyckelroll vid en bioattack. De har också till uppgift tillsammans med epidemiologer och veterinärer, att avgöra om det verkligen rör sig om en attack och inte ett naturligt utbrott. Detta baseras på mönster och frekvens av symtom. För att klara dessa uppgifter måste mikrobiologerna vara insatta i karaktärsdrag hos potentiella agens, samt ha tillgång till den teknologi som behövs för att på ett effektivt sätt kunna detektera och identifiera agens (Broussard, 2001).

För att kunna skilja på ett naturligt utbrott och ett överlagrt dåd krävs en mikrobiell undersökning. Detta är dock tidskrävande och bara vissa laboratorier har den utrustning som krävs. Det finns också risk för falskt negativa svar, att agens kan vara svåra att odla och att vissa molekylära metoder kan kräva att man vet vilket agens man letar efter (D'Amelio *et al.*, 2015). För att avgöra om det rör sig om ett naturligt utbrott eller en bioattack av just *B. anthracis* kan antalet smittade med kutan- respektive inhalationsform jämföras, eftersom inhalationsformen är mycket ovanlig vid naturlig förekomst (Azarkar & Zare Bidaki, 2016). Vid ett naturligt antraxutbrott är den kutana formen absolut vanligast och står för >95 % av alla fall hos människor (WHO, 2008). Vid epidemin i Zimbabwe var den kutana formen vanligast, vilket talade för en naturlig smitta (Davies, 2001), till skillnad från epidemin i Sverdlovsk där många smittades med inhalationsformen. En jämförelse mellan de olika formerna kan således ge en tydlig indikation om det handlar om en naturlig uppkomst eller inte.

Ett annat sätt att avgöra om utbrottet är naturligt är att undersöka om det rör sig om en bakteriestam eller flera. Flera olika stammar tyder nämligen på en bioattack, eftersom vid ett naturligt utbrott har smittan kommit från jorden och ett endemiskt område har oftast en stam. Ett exempel där flera stammar konstaterats är i Sverdlovsk (Jackson *et al.*, 1998).

En annan indikator på ett artificiellt utbrott kan vara att djur av olika arter insjuknar. Vid naturliga utbrott av antrax har det observerats att oftast ett djurslag påverkas, även om andra känsliga arter befinner sig i närheten. Forskare tror att detta kan bero på att arterna har olika ekologiska nischer eller att bitandeflugor har specifika arter som mål (WHO, 2008). Om detta inte är fallet och flera olika djurarter drabbas kan en bioattack misstänkas.

## Veterinärens roll

Djurövervakning kan användas för att öka kunskapen om zoonoser, detektera bioattacker och vid insamling av diagnostiska och tekniska bevis om en attack föreligger. Kliniska symtom kan också förekomma tidigare hos djur än människor om exempelvis inkubationstiden är kortare,

exponeringen sker tidigare eller om infektionsdosen är lägre (Cottrell & Morgan, 2003). Genom detta kan djur användas som vaktposter/sentinels för en bioattack och om detta leder till en tidig detektion är mycket vunnet. Här har veterinärer en viktig roll.

Vid just sporulerande mikroorganismer som *B. anthracis* kan sporadisk sjukdom hos djur visa att risk för exponering fortfarande existerar. Detta kan användas för kontrollprogram framförallt efter en attack. Herbivorer är känsligare för antrax än människor och om människor inte jobbar med boskap är risk för smitta ytterst liten. Ett utbrott hos herbivorer visar att jorden är kontaminerad, men de är inte direkt vaktposter för smitta hos människor, framförallt inte om smittan är naturlig. Man kan då tro att hundar lämpar sig bättre som vaktpostdjur eftersom de har kontakt med människor och vistas i samma typ av miljö. Dock är antrax ovanligt hos hundar eftersom de är relativt resistent och som vaktpostdjur blir de därför inte särskilt tillförlitliga (McGee *et al.*, 1994). Det visar dock att veterinärer bör ha koll på att djurarter som vanligen inte anses känsliga för smitta av antrax, faktiskt kan infekteras (Blackburn *et al.*, 2014) och att dessa djur kan användas som vaktposter. De kan ge en indikation om att ett utbrott kan vara en bioattack, framförallt om det handlar om flera olika arter.

Sedan 2001 har USA tagit fram många protokoll för att kunna förebygga och motverka en ny attack med just *B. anthracis*. De har behandlingsstrategier med lager av vaccin, antibiotika och antitoxiner och även förberedda planer ifall attacken blir så stor att resurserna tar slut (Bower *et al.*, 2015). De har också utvecklat ett extensivt program för detektion och svar vid en bioattack. Vid en sådan har veterinärer en viktig roll eftersom bioterrorism kan vara riktad mot djur eller ge symtom hos djur eftersom de flesta biovapen är zoonotiska. Även livsmedel kan vara ett mål (McKinney *et al.*, 2005) och då har också veterinärer en roll att spela. Framförallt är det viktigt att veterinärer vet vilka symtom att hålla utkik efter, hur prover ska samlas in och transporteras på ett säkert sätt och att varna rätt myndighet. Många mikroorganismer som klassats som potentiella biovapen är just zoonoser, vilket leder till att integrering mellan human- och veterinärmedicin är essentiell. Det är också viktigt att veterinärer kan ställa snabba diagnoser på ovanliga eller suspekta hälsoproblem hos djur (Khan *et al.*, 2000).

Det är även av stor vikt att allmänheten inte uppfattar en naturlig epidemi som en bioattack. Vid en bioattack spelar det psykologiska, ekonomiska och politiska också in och således måste en sådan anklagelse bara användas när det finns tillräckliga bevis (Cottrell & Morgan, 2003). Det är onödigt att orsaka panik och rädsla vid ett naturligt utbrott eftersom det i princip endast riskerar att drabba människor som jobbar med utbrottet. Det naturliga utbrottet är kontrollerbart och kan aldrig bidra till den massiva exponeringen hos människor som en akt av bioterrorism gör (WHO, 2008). Den rädslan som faktiskt finns för antrax blir påtaglig i och med implementeringen av avlivning av hela besättningar som utförs i vissa länder (WHO, 2008), dock ej i Sverige. Detta är ytterst onödigt eftersom antrax inte är en kronisk sjukdom och djur-till-djur-smitta är mycket ovanligt. Djur som behandlas överlever allt som oftast och att avliva

friska djur påverkar också samarbetet mellan veterinär och djurägare negativt. Det kan leda till att färre djurägare rapporterar utbrott och det i sin tur påverkar kontrollprogram och övervakning.

Veterinärer har en central roll vid bioterrorism och bioattacker, framförallt om dessa genomförs med någon form av mikroorganism som drabbar djur. Veterinärer bevakar, behandlar och rapporterar vid utbrott. De måste också kunna känna igen de tecken som skiljer en naturlig uppkomst från en artificiell. Integrering mellan veterinär- och humansidan är viktig framförallt vid övervakning och rapportering, då tidig detektion är essentiell för att kunna minska spridning, antalet insjuknande och antalet dödsfall. Inom veterinärmedicin har bioterrorism med framförallt *B. anthracis* försvårat processen vid naturliga utbrott. Det är många protokoll som ska följas och mycket rädsla från media och allmänheten ger en skev bild om hur farlig naturlig antrax egentligen är, trots att forskning visar att naturlig antrax inte på långa vägar liknar den som sprids vid bioattacker. Risken att bli smittad av inhalationsantrax vid ett naturligt utbrott är mycket liten och den kutana formen som är desto vanligare är relativt lättbehandlad. Med tanke på den utveckling som vi idag ser med fler och fler terrordåd, kan det tänkas att även bioterrorism kommer att öka och då är det viktigt att kunskapen finns, framförallt hos veterinärer för att kunna detektera samt förebygga.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Azarkar, Z & Zare Bidaki, M. (2016). A case report of inhalation anthrax acquired naturally. *BMC Research Notes*. doi: 10.1186/s13104-016-1955-0. 2017-03-08
- Barras, V & Greub, G. (2014). History of biological warfare and bioterrorism. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), ss. 497-502.
- Berger, T., Kassirer, M & Aran, A. A. (2014). Injectional anthrax – New presentation of an old disease. *Eurosurveillance*, 19(32) ss. 2-12.
- Blackburn, J. K., Skrypnik, A., Bagamian, K. H., Nikolich, M. P., Bezymennyi, M & Skrypnik, V. (2014). Anthrax in a Backyard Domestic Dog in Ukraine: A Case Report. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 14(8) ss. 615-617.
- Bossi, P., Tegnell, A., Baka, A., van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., Maidhof, H & Gouvras, G. (2004). Bichat guidelines for the clinical management of anthrax and bioterrorism-related anthrax. *Eurosurveillance*, 9(12)
- Bower, W. A., Hendricks, K., Pillai, S., Guarnizo, J & Meaney-Delman, D. (2015) Clinical Framework and Medical Countermeasure Use During an Anthrax Mass-Casualty Incident. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64(04) ss. 1-22.
- Broussard, L.A. (2001). Biological Agents: Weapons of Warfare and Bioterrorism. *Molecular Diagnosis*, 6(4) ss. 324-333.
- Budowle, B., Murch, R & Chakraborty, R. (2005). Microbial forensics: the next forensic challenge. *International Journal of Legal Medicine*, 119(6) ss. 317-330.
- Carus, W. S. (2015). The History of Biological Weapons Use: What We Know and What We Don't. *Health Security*, 13(4) ss. 219-255.
- Cieslak, T. J & Eitzen, E. M. Jr. (1999). Clinical and Epidemiologic Principles of Anthrax. *Emerging Infectious Diseases*, 5(4) ss. 552-555.
- Cottrell, T. S & Morgan E. R (2003) Animal surveillance in NBC defensive operations. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 149(3) ss. 225–230.
- Craft, D.W., Lee, P.A & Rowlinson, M-C. (2014). Bioterrorism: a Laboratory Who Does It? *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7) ss. 2290-2298.
- D'Amelio, E & R., Gentile, B & Lista, F. (2015). Historical evolution of human anthrax from occupational disease to potentially global threat as bioweapon. *Environment International*, 85 ss. 133-146.
- Davies, J. C. (1983). A major epidemic of anthrax on Zimbabwe. *Central African Journal of Medicine*, 29(1) ss. 8-12.
- Duriez, E., Armengaud, J., Fenaille, F & Ezan, E. (2016). Mass spectrometry for the detection of bioterrorism agents: from environment to clinical applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(3) ss. 183-199.

- Edmonds, J., Lindquist, A., Sabol, J., Martinez, K., Shadomy, S., Cymet, T & Emanuel, P. (2016). Multigeneration Cross-Contamination of Mail with *Bacillus anthracis* Spores. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0152225. 2017-03-08
- Hamilton, M. A., Hong, T., Casman, E & Gurian, P. L. (2015). Risk-Based Decision Making for Reevacuation of Contaminated Areas Following a Wide-Area Anthrax Release. *Risk Analysis* 35(7) ss. 1348-1363.
- Head, B. M., Alfa, M., Sitar, D. D., Rubinstein, E & Meyers A. F. A. (2016). In vitro evaluation of the effect of linezolid and levofloxacin on *Bacillus anthracis* toxin production, spore formation and cell growth. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2) ss. 417-420
- Hoffmaster, A. R., Fitzgerald, C. C., Ribot, E., Mayer, L. W & Popovic, T. (2002). Molecular Subtyping of *Bacillus anthracis* and 2001 Bioterrorism-Associated Anthrax Outbreak, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 8(10) ss. 1111-1116.
- Jackson, P. J., Hugh-Jones, M. E., Adair, D. M., Green, G., Hill, K. K., Kuske, C. R., Grinberg, L. M., Abramova, F. A & Keim, P. (1998). PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: The presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3) ss. 1224-1229
- Jansen, H. J., Breeveld, F. J, Stijnis, C & Grobusch, M. P. (2014). Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6) ss. 488-496.
- Jaton, K & Greub, G. (2014). Clinical microbiologists facing an anthrax alert. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6) ss. 503-506.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J & Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 182(10) ss. 2928-2936.
- Keim, P., Smith, K. L., Keys, C., Takahashi, H., Kurata, T & Kaufmann, A. (2001). Molecular Investigation of the Aum Shinrikyo Anthrax Release in Kameido, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12) ss. 4566-4567.
- Khan, A. S., Levitt, A. M & Sage, M. J. (2000). Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49(4) ss. 1-14.
- Kim, J., Gedi, V., Lee, S. C., Cho, J. H., Moon, J. Y & Yoon, M. Y. (2015). Advances in Anthrax Detection: Overview of Bioprobes and Biosensors. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176(4) ss. 957-977
- Kuehnert, M. J., Doyle, T. J., Hill, H. A., Bridges, C. B., Jerinigan, J. A., Dull, P. M., Reissman, D. B., Ashford, D. A & Jerinigan, D. B. (2003). Clinical Features the Discriminate Inhalational Anthrax from Other Acute Respiratory Illnesses. *Clinical Infectious Diseases*, 36(3) ss. 328-336.
- Read, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N., Baillie, L. W., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Tettelin, H., Fouts, D.E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Holtzapple, E. K., Okstad, O. A., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J. F., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Brinkac, L. M., Gwinn, M., DeBoy, R. T.,

- Madpu, R., Daughterty, S. C., Durkin, A. S., Haft, D. H., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Pop, M., Khouri, H. M., Radune, D., Benton, J. L., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I. R., Weidman, J. F., Berry, K. J., Plaut, R. D., Wolf, A. M., Watkins, K. L., Nierman, W. C., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J. E., White, O., Salzberg, S. L., Thomason, B., Friedlander, A. M., Koehler, T. M., Hanna, P. C., Kolstø, A. B & Fraser, C. M. (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 423(6935) ss. 81-86.
- McGee, E. D., Fritz, D. L., Ezzell, J. W., Newcomb, H. L., Brown, R. J & Jaax, N. K. (1994). Anthrax in dog. *Veterinary Pathology*, 31(4) ss. 471-473
- McKinney, W. P., Wesley, G. C., Sprang, M. V & Troutman, A. (2005). Educating Health Professionals to Respond to Bioterrorism. *Public Health Reports*, 120(1) ss. 42-47.
- Poupard, J. A & Miller, L. A. (1992). History of biological warfare: catapults to capsomeres. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 666(1) ss. 9-20.
- Riedel, S. (2004). Biological warfare and bioterrorism: a historical review. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 17(4) ss. 400-406.
- Takahashi, H., Keim, P., Kaufmann, A. F., Keys, C., Smith, K. L., Taniguchi, K., Inouye, S & Kurata, T. (2004). *Bacillus anthracis* Bioterrorism Incident, Kameido, Tokyo, 1993. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1) ss. 117-120.
- Trevisanato, S. I. (2007). The 'Hittite plague', an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare. *Medical Hypotheses*, 69(6), ss 1371-1374.
- World Health Organization (1970). *Health aspects of chemical and biological weapons: report of a WHO group of consultants*. 1<sup>st</sup> ed. Genève.
- World Health Organization (2008) *Anthrax in Humans and Animals*. 4<sup>th</sup> ed. Genève.