MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2010, 62: 351 - 360

Agata Bielawska-Drózd, Marcin Niemcewicz, Jerzy Gaweł, Michał Bartoszcze, Grzegorz Graniak, Justyna Joniec, Marcin Kołodziej

Identyfikacja *Francisella tularensis* techniką real - time PCR z wykorzystaniem sond hybrydyzujących zaprojektowanych dla fragmentów sekwencji genów *fopA* i *tul4*

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Puławach
Kierownik: prof. dr hab. *M. Bartoszcze*

Badano przydatność zaprojektowanych starterów FopA F/R, Tul4 F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2, Tul4 S1/S2 dla genów *fopA i tul4* do wykrywania *F. tularensis.* W badaniach, w których użyto 50 szczepów *F. tularensis* uzyskano wyniki dodatnie. Swoistość reakcji wykazano badając szczepy bakterii *non-Francisella tularensis.* Przy użyciu starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genów *fopA* dodatnie wyniki amplifikacji uzyskano ze wszystkimi badanymi szczepami *F. tularensis*. Identyczne wyniki otrzymano w reakcji real - time PCR z zastosowaniem starterów Tul4 F/R i sond hybrydyzujących Tul4 S1/S2 zaprojektowanych dla genu *tul4*. Swoiste produkty reakcji amplifikacji pojawiły się między 16 a 18 cyklem reakcji. Badania z użyciem starterów i sond hybrydyzujących zaprojektowanych dla genu *fopA* wykazały, że charakterystyczna temperatura topnienia produktów wynosiła 61°C, a dla genu *tul4* 60°C. Przy użyciu starterów Tul4 F/R i sond hybrydyzujących Tul4 S1/S2 czułość oznaczeń wynosiła 10 fg/µl, a przy użyciu starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 1 fg/µl.

Tularemia jest ostrą, bakteryjną chorobą odzwierzęcą wywołaną przez Gram-ujemną, tlenową pałeczką *F. tularensis* (1, 9, 13). *F. tularensis* została sklasyfikowana przez CDC (Atlanta) jako czynnik biologiczny kategorii A, który może być użyty w atakach bioterrorystycznych i do produkcji broni biologicznej (3, 9, 11). Progowa dawka infekcyjna dla człowieka wynosi zaledwie 10 bakterii (8, 14, 15). Rodzaj *Francisella* obejmuje trzy gatunki: *F. tularensis, F. philomiragia* i *F. noatunensis. F. tularensis* dzieli się na cztery typy, różniące się między sobą zjadliwością i geograficznym występowaniem: typ A *tularensis* (*nearctica)* – najbardziej zjadliwy, notowany w Ameryce Północnej i Europie, typ B *holarctica* (*palaearctica*) – mniej zjadliwy, obecny w Europie, Azji i Ameryce Północnej, typ *mediasiatica* – izolowany w centralnej Azji oraz typ *novicida* – występujący w Ameryce Północnej i Australii (1, 5, 13).

W środowisku naturalnym pałeczki tularemii występują najczęściej wśród dziko żyjących gryzoni. Patogen ten może być izolowany z odchodów zwierzęcych, gleby, błota i siana. Do zakażenia może dochodzić przez bezpośredni kontakt człowieka z chorymi zwierzętami, drogą aerozolową, przez uszkodzoną skórę, bądź też poprzez skażoną wodę i żywność. Ważną rolę w przenoszeniu tularemii odgrywają kleszcze (*Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*), roztocza, pchły, komary oraz muchy (2, 10, 14). Do zawodowej grupy ryzyka należą rolnicy, leśnicy, myśliwi oraz pracownicy laboratoriów (3, 9, 12). W warunkach naturalnych tularemia występuje na terenach leśnych i rolniczych, przy czym większość zachorowań notuje się w okresie od czerwca do września, co wiąże się z aktywnością kleszczy (9). W diagnostyce *F. tularensis* stosuje się metody serologiczne, badania hodowlane i genetyczne. Techniki serologiczne (jak np. test ELISA, odczyn aglutynacji), umożliwiają wykrycie obecnych w surowicy przeciwciał dla *F. tularensis*, ale pojawiają się one dopiero po dwóch tygodniach od zakażenia (3, 4, 14). Ze względu na trudności w hodowli *F. tularensis* na podłożach stałych oraz względnie długi okres wzrostu (3 – 6 dni) wskazane jest wykorzystanie do identyfikacji takich metod biologii molekularnej jak: PCR, PFGE, ERIC-PCR, LP rep-PCR i PCR w czasie rzeczywistym (real - time PCR). W molekularnej diagnostyce tularemii wykorzystuje się głównie fragmenty sekwencji genów: *fopA,* kodującego białko błony zewnętrznej (*outer membrane protein gene*) oraz *tul4,* kodującego lipoproteinę błony zewnętrznej (*T-cell epitope membrane gene*) (6, 8, 17). Najczęściej w literaturze dotyczącej identyfikacji *F. tularensis* metodą real –time PCR stosowane są sondy hydrolizujące (7, 16, 17). Niewiele jest natomiast prac poświęconych wykorzystaniu do identyfikacji tej bakterii sond hybrydyzujących, a zwłaszcza ukierunkowanych na fragmenty genów kodujących bialka blony zewnętrznej *fopA* i *tul4* (6). Celem pracy było sprawdzenie przydatności zaprojektowanych we własnym zakresie starterów dla genów *fopA* i *tul4* oraz sond hybrydyzujących do identyfikacji pałeczki tularemii techniką real – time PCR oraz określenie czułości metody.

MATERIAŁ I METODY

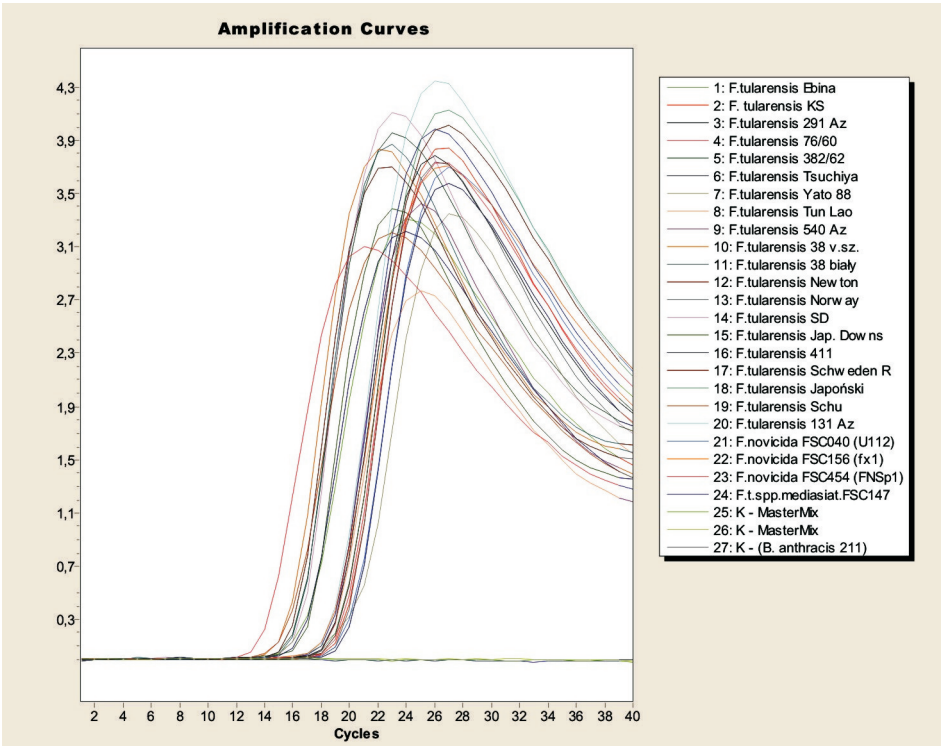
Szczepy bakterii *F. tularensis* i warunki hodowli: Szczepy bakteryjne (*F. tularensis* typ A i B) otrzymano z Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i National Veterinary Insitute (NVI), Oslo, Norwegia. DNA *F. tularensis novicida* i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* otrzymano z Departamentu CBRN Defense and Security, Swedish Defense Research Agency, Szwecja (Tabela I).

Hodowlę *F. tularensis* prowadzono na podłożu stałym Cysteine Heart Agar z dodatkiem hemoglobiny przez okres 3 – 5 dni, w temp. 37°C. Komórki *F. tularensis* zawieszano w fizjologicznym roztworze NaCl (miano ok. 10^8 - 10^9 CFU/ml) i poddawano gotowaniu przez 15 minut. Oczyszczanie materiału genetycznego przeprowadzano z użyciem zestawu Genomic Mini, opartego na membranach krzemionkowych (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z zaleceniami producenta. Materiał genetyczny do czasu przeprowadzenia analiz przechowywano w temp. -20°C.

Dla kontroli specyficzności starterów i sond molekularnych w reakcji real -time PCR użyto szczepów bakterii blisko spokrewnionych *Francisella philomiragia* CCUG 12603,

CCUG 13404, *Francisella noatunensis* NCIMB 14265 otrzymanych z National Veterinary Institute (NVI), Oslo, Norwegia, *Hemophilus influenzae, Brucella sp.* oraz bakterii niespokrewnionych z pałeczką tularemii: szczepów przejściowych *Bacillus sp. Ba813*$^{+}$ pochodzących z kolekcji Instytutu Medycyny i Biologii Molekularnej (IMBM) Uniwersytetu w Scranton, PA, USA (*B. sp. Ba813*$^{+}$ *#9 (T597-77)*. Szczepy *B. sp. Ba813*$^{+}$ *#15 (11614-2), B. sp. Ba813*$^{+}$ *#S8553/2,* szczepy *Bacillus thuringiensis T07-146*, *B. thuringiensis T7-019*, *B. thuringiensis T7-128* oraz *Bacillus cereus F1659, B. cereus* UW85 uzyskanych z Instytutu Pasteura, Francja. W badaniach użyto również *Bacillus anthracis 211* otrzymany z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Łomży, szczepionkowego szczepu *B. anthracis 34F*$_2$ („Anthraphyl", Phylaxia, Węgry), a także szczepów pochodzących z kolekcji Państwowego Zakładu Higieny *(Vibrio cholerae 13O El Tor* i *V. cholerae non O1)*.

W celu identyfikacji *F. tularensis* użyto zaprojektowanych we własnym zakresie starterów i sond hybrydyzujących, specyficznych dla genów *tul4* i *fopA*. Startery i sondy projektowano przy użyciu programów: LightCycler Probe Design Software 2.0 Version 1.0 oraz OligoAnalyzer 1.2. (Tabela II) Zaprojektowane startery i sondy zostały zsyntetyzowane przez Genomed Sp. z o.o. Reakcję real - time PCR przeprowadzono w systemie kapilarnym w aparacie Light Cycler 2.0 firmy Roche, przy objętości mieszaniny reakcyjnej 20 µl. Mieszanina reakcyjna dla dwóch kompletów sond i starterów zawierała te same proporcje



Ryc. 1. Wyniki reakcji real - time PCR z zastosowaniem starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genu *fopA*.

Tab. I. Szczepy *F. tularensis* użyte w badaniach.

Typ szczepu:	Nazwa szczepu:	Pochodzenie:
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	375, 118, 117, 81	Instytut Epidemiologii i Mikrobiologii w Pradze.
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	KS, KP2, KS2	Wyizolowane z kleszczy *Ixodes ricinus* bytujących na krowach, woj. zach – pomorskie.
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	CR	Wyizolowany z wymazu z gardła chorego, woj. zach-pomorskie.
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	ZG	Wyizolowany z mięsa zająca szaraka *Lepus europaeus,* woj. zach-pomorskie.
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	203/62, 318/62 lub T-318/62, 349/62 lub T-349/62, 127/62 biały, 382/62 lub T-382/62 76/60, 57/60	Wyizolowane z zajęcy szaraków *Lepus europaeus*. Wyizolowane ze szczurów wędrownych *Rattus norvegicus*. Instytut Epidemiologii i Mikrobiologii w Pradze
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	Tsuchiya Ebina	Wyizolowany z gruczołu pachowego robotnika leśnego z objawami oczno-gruczołowymi. Wyizolowany w Japonii od chorego z objawami oczno-gruczołowymi. Narodowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych w Hamilton, Montana, USA
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	94 lub N94 9/721 19C Tun Lao	Wyizolowany w Kraju Ałtajskim ze szczura wodnego *Arvicola terrestris*. Wyizolowany w Obwodzie Moskiewskim z nornika zwyczajnego *Microtus arvalis.* Wyizolowany w Bułgarii z piżmoszczura *Ondatra zibethica.* Wyizolowany w Chinach z susła *Citellus dauricus.* Akademia Medyczna w Moskwie
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	38 v.sz.	Wyizolowany w stanie Utah, USA z węzła limfatycznego chorego.
Francisella tularensis subsp. tularensis	38 biały	Wyizolowany w stanie Utah, USA z węzła limfatycznego chorego
Francisella tularensis subsp. *tularensis* *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*	Newton, Norway, Jap. Downs	USA
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	Schu 3, ABE	Instytut Chorób Zakaźnych Uniwersytetu w Tokio
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	SD	Pozbawiony zjadliwości szczep *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* ZG
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	Schweden R	Wyizolowany w Szwecji

Tab. I. c.d.

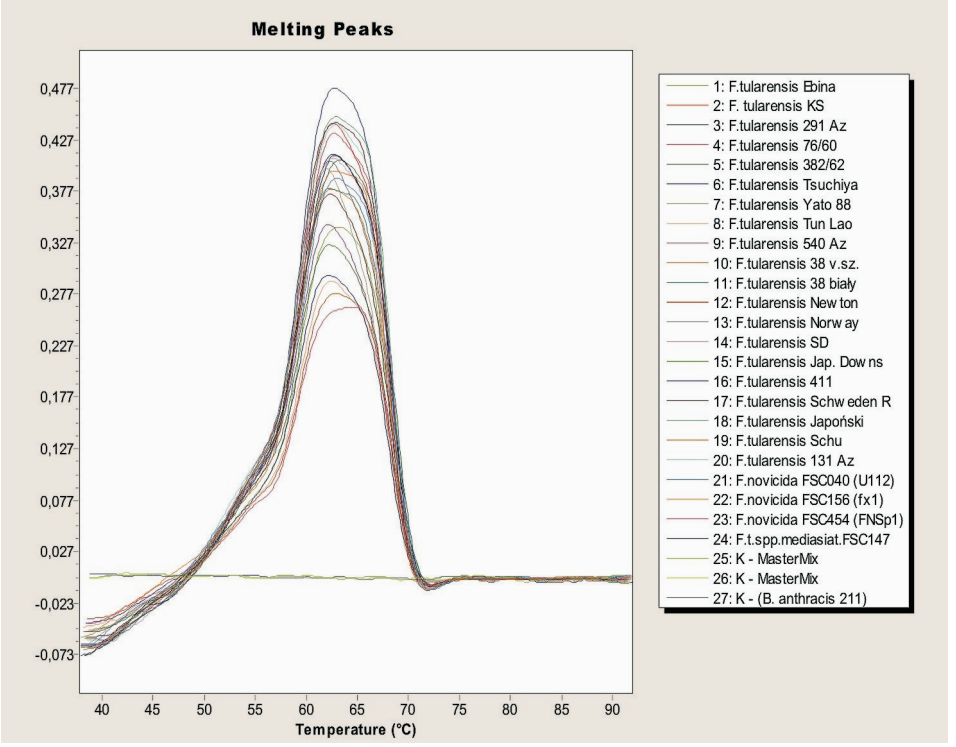
Francisella tularensis subsp. *tularensis*	Japoński	Wyizolowany w Japonii z węzła limfatycznego chorego. USA
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	ZW	Wyizolowany w woj. warmińsko-mazurskim z padłego zająca *Lepus europaeus*
Francisella tularensis subsp. *tularensis*	Schu	USA, Akademia Medyczna w Moskwie
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	ZB	Wyizolowany w woj. pomorskim z padłego zająca *Lepus europaeus*
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	MR3	Wyizolowany z norników, Polska
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	131 lub 131 Az lub N 131 26 Az lub N 26 124 Az lub N 124 329 Az lub 329 lub N 329 291Az lub 291 lub N 291 540 Az lub 540 321 Az lub N 321	Wyizolowany w Azerbejdżanie z koszatki *Dryomys nitedula* Wyizolowany z nornika zwyczajnego *Microtus arvalis*, Azerbejdżan Wyizolowane z pcheł bytujących na nornikach zwyczajnych, Azerbejdżan Wyizolowany z pcheł odłowionych w norach nornika zwyczajnego, Azerbejdżan Wyizolowany z myszoskoczka *Meriones meridianus*, Azerbejdżan, Wyizolowany w Azerbejdżanie z myszy domowej *Mus musculus*. Azerbejdżan Państwowy Instytut Kontrolny w Moskwie
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	411	Wyizolowany z węzła chłonnego chorego, College of Veterinary Medicine w Helsinkach
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	Yato 88	Laboratory of Okara General Hospital, Japonia
Francisella tularensis subsp. *holarctica*	Kodar R	Niezjadliwy, szczepionkowy, Rumunia
Francisella novicida *Francisella tularensis subsp. mediasiatica*	U112, ATCC 15482, FSC 156 (fx1), FSC454 (FNSp1) FSC 147 (543)	Department CBRN Defense and Security, Swedish Defense Research Agency, Szwecja.
Francisella philomiragia *Francisella noatunensis*	CCUG 12603, CCUG 13404 NCIMB 14265	National Veterinary Institute (NVI), Oslo, Norwegia.

***** Autorzy dziękują Pani prof. Renacie Głośnickiej z Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za udostępnienie do badań szczepów *F. tularensis.*

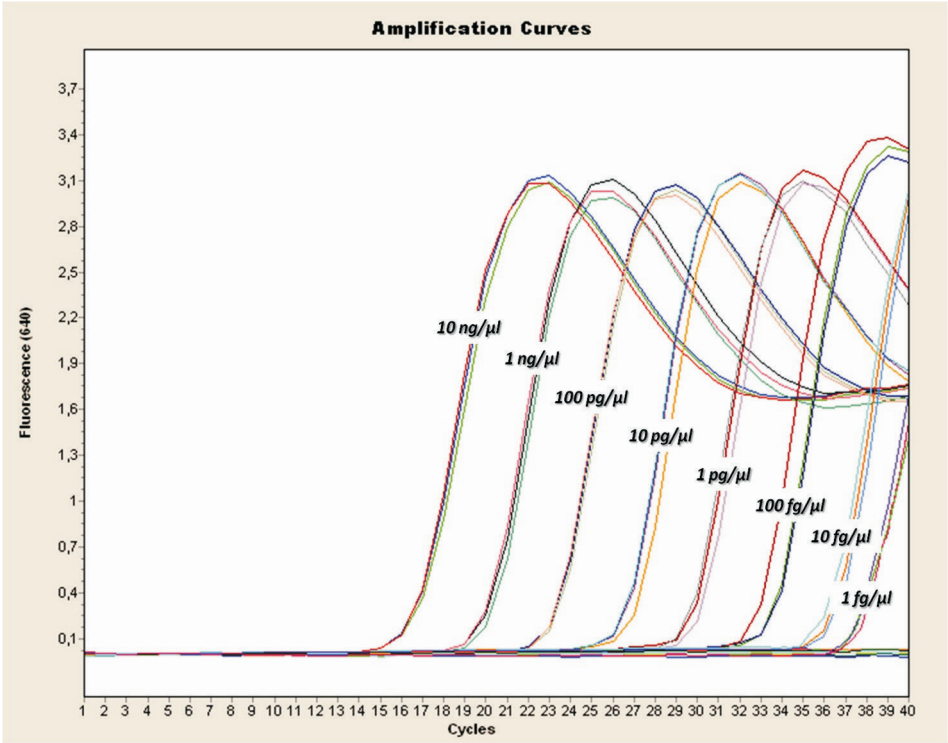
*Autorzy dziękują Panu Kerstin Svensson z Department CBRN Defense and Security, Swedish Defense Research Agency, Szwecja za udostępnienie materiału genetycznego pochodzącego ze szczepów *F. tularensis subsp. mediasiatica* i *F. novicida* oraz Panu dr Duncan Colquhoun z National Veterinary Institute (NVI), Oslo, Norwegia za udostępnienie do badań szczepów *F. philomiragia* i *F. noatunensis*.

Tab. II. Startery i sondy zaprojektowane w celu identyfikacji *F. tularensis*.

Nazwy starterów/ sond	Sekwencje starterów/sond	Wielkości produktów
FopA F	5'-GGTTTAGGTGAAGGTGTTGT-3'	*fopA*/ 132 pz
FopA R	5'-CAAACTTAAGACCACCACC-3'	
FopA S1	5'-TGGTGCTGGTTGGGCAAATC-(FL)-3'	
FopA S2	5'-(Red 640)-GCAGGTCAAGCAACAGGTGCTT-3'	
Tul4 F	5'-CTGTATCTAAGCCAACTGCA-3'	*tul4*/ 240 pz
Tul4 R	5'-CACTTACCGCTACAGAAGTT-3'	
Tul4 S1	5'-CCCACAAGGAAGTGTAAGATTAC-(FL)-3'	
Tul4 S2	5'-(Red 640)-GCAGGCTCCAGAAGGTTCTAAGTGC-3'	



Ryc. 2. Analiza krzywej topnienia produktów reakcji real - time PCR z zastosowaniem starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genu *fopA*.



Ryc. 3. Badanie czułości reakcji real - time PCR z zastosowaniem starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genu *fopA*.

składników. Reakcja przebiegała w tych samych warunkach termicznych. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: FastStart DNA Master HybProbe (Roche) – 1 x stęż., $MgCl_2$ – 2 mM, startery – 0,5 µM, sondy hybrydyzujące – 0,15 µM oraz matrycowe DNA o stężeniu 10 - 20 ng/µl w ilości 1,5 µl. Reakcję przeprowadzono wg wcześniej zoptymalizowanego profilu termicznego: 10 min w temp. 95°C (denaturacja wstępna), 10 s w temp. 95°C, 15 s w temp. 60°C, 10 s w temp. 72°C (40 cykli amplifikacji). Analizę temperatury topnienia produktów przeprowadzono w warunkach: 0 sec w temp. 95°C, 30 sec w temp. 38°C, 0 sec w temp. 92°C.

Czułość reakcji real - time PCR określono badając szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń DNA pochodzących z *F. tularensis* (10 ng/µl - 100 ag/µl), w trzech powtórzeniach dla poszczególnych rozcieńczeń DNA.

WYNIKI

Wykrywanie *F. tularensis* metodą real - time PCR. Przy użyciu starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genów *fopA* dodatnie wyniki amplifikacji wykazano ze wszystkimi badanymi szczepami *F. tularensis*. (Ryc. 1)

Podobne dane uzyskano także w reakcji real - time PCR z zastosowaniem starterów Tul4 F/R i sond hybrydyzujących Tul4 S1/S2 zaprojektowanych dla genu *tul4*. Swoiste produkty reakcji amplifikacji pojawiły się między 16 a 18 cyklem reakcji. Badania z użyciem starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genu *fopA* wykazały, że charakterystyczna temperatura topnienia produktów wynosiła 61°C. Przy analizie krzywych topnienia z zastosowaniem starterów Tul4 F/R i sond hybrydyzujących Tul4 S1/S2 temperatura topnienia wyniosła 60°C. Wszystkie badane szczepy *F. tularensis* wykazały identyczną temperaturę topnienia amplifikowanych produktów. (Ryc. 2)

Przy zastosowaniu starterów Tul4 F/R i sond hybrydyzujących Tul4 S1/S2 zaprojektowanych dla genu *tul4* czułość oznaczeń wynosiła 10 fg/µl, a przy użyciu starterów FopA F/R i sond hybrydyzujących FopA S1/S2 zaprojektowanych dla genu *fopA* - 1 fg/µl. (Ryc. 3)

OMÓWIENIE

Badania nad szybką identyfikacją pałeczki tularemii przy zastosowaniu sond molekularnych podejmowało wielu autorów (4, 6, 15, 16, 17). *Emanuel* i wsp.(4) wykorzystali sondy hydrolizujące (TaqMan) do wykrywania i różnicowania gatunków oraz podgatunków z rodzaju *Francisella* (4, 17). Innym rodzajem sond stosowanych do diagnostyki molekularnej *F. tularensis* są sondy hybrydyzujące (6, 7, 15), oparte na wykorzystaniu zjawiska FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer. Zastosowanie sond hybrydyzujących pozwala na wyznaczenie krzywej topnienia amplifikowanego produktu i określenie jego temperatury topnienia (6, 7, 15). Analiza temperatury topnienia powstałych produktów amplifikacji potwierdza swoistość reakcji real - time PCR. Badania z zastosowaniem sond hybrydyzujących do diagnostyki tularemii podejmowali nieliczni autorzy. Między innymi badacze japońscy w pracach nad identyfikacją *F. tularensis* użyli sond hybrydyzujących zaprojektowanych dla konserwatywnych sekwencji genu *fopA*. Specyficzny sygnał fluorescencji dla 1 pg DNA obserwowano w 28 - 30 cyklu reakcji real - time PCR, a specyficzna dla powstałych produktów amplifikacji temperatura topnienia (Tm) wynosiła 68°C (6). Ponieważ we wspomnianej pracy autorzy oparli się jedynie na identyfikacji sekwencji genu *fop,* we własnych badaniach przeprowadzono analizę przydatności do tego celu sond hybrydyzujących zaprojektowanych zarówno dla wysoce konserwatywnych sekwencji genu *fopA* jak i *tul4*.

W badaniach własnych swoiste produkty amplifikacji wykryto u wszystkich z badanych szczepów *F. tularensis*. Sygnał fluorescencyjny stawał się dostrzegalny między 16 a 18 cyklem reakcji, przy wyjściowej koncentracji matrycowego DNA 10 ng/µl. Dla amplikonu genu *fopA* temperatura topnienia (Tm) wynosiła około 61°C, co wykazano u wszystkich przebadanych szczepów *F. tularensis*, a dla amplikonu genu *tul4* około 60°C. Jednakowe wartości temperatury topnienia dla danego amplikonu potwierdzają swoistość reakcji real - time PCR dla szczepów gatunku *F. tularensis* (6). W badaniach własnych wykazano wysoką swoistość reakcji dla *F. tularensis*, o czym świadczyły negatywne wyniki uzyskane w przypadku bakterii nie należących do gatunku *F. tularensis* (non - *Francisella*), jak i gatunków spokrewnionych (*Francisella philomiragia, Francisella noatunensis*, *Hemophilus influenzae, Brucella sp.*). Brak reakcji krzyżowych z bakteriami „środowiskowymi" jest istotny, gdyż w praktyce próbki do badań na obecność *F. tularensis* będą zanieczyszczone

wieloma innymi mikroorganizmami. Metoda real - time PCR, poza szybkością w otrzymywaniu wyników ma także inne zalety, gdyż pozwala ona na wykrycie stanu VBNC (viable but non – culturable) *F. tularensis*, czego nie stwierdza się metodami hodowlanymi. Także u osób leczonych antybiotykami metoda hodowlana może dać wyniki negatywne na obecność *F. tularensis*.

W naszych badaniach czułość metody przy zastosowaniu sond hybrydyzujących zaprojektowanych dla genu *tul4* określono na poziomie 10 fg DNA na reakcję, a dla sekwencji genu *fopA* próg wykrywalności wynosił 1 fg genomowego DNA. *Fujita i wsp*. (6) wykorzystując sondy hybrydyzujące komplementarne do sekwencji genu *fopA* osiągnęli czułość reakcji na poziomie 20 fg, a *Tomaso* i wsp. (15) poszukując swoistego dla *F. tularensis* subsp. *tularensis* genu *pdpD,* wykazali czułość na poziomie 25 fg na reakcję. W świetle powyższych badań wyniki własne dotyczące czułości metody można uznać za zadowalające. Zastosowane w niniejszej pracy sondy hybrydyzujące pozwalają na szybkie wykrycie *F. tularensis*, zarówno typu A, jak i B, co jest istotne, gdyż przedstawiają one największe zagrożenie dla zdrowia człowieka. Obecność *F. philomiragia* uznawanej za czynnik o niskiej zjadliwości, przedstawiającej jedynie niebezpieczeństwo dla ludzi z obniżoną odpornością może być także wyeliminowana dzięki powyższej metodzie. Przeprowadzone badania wykazały pełną przydatność opracowanych starterów i sond hybrydyzujących do szybkiej identyfikacji *F. tularensis* metodą real – time PCR. Zastosowana metoda już w fazie wstępnej pozwoli na szybkie wprowadzenie odpowiednich działań profilaktyczno- leczniczych na wypadek użycia tego zarazka jako broni biologicznej lub w ataku terrorystycznym.

A. Bielawska – Drózd, M. Niemcewicz, J. Gaweł, M. Bartoszcze, G. Graniak, J. Joniec, M. Kołodziej

Real time PCR hybridization for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis*

SUMMARY

Tularemia is highly infectious and fatal zoonotic disease caused by Gram negative bacteria *Francisella tularensis*. The necessity to undergo medical treatment in early phase of illness in humans and possibility of making use of bacterial aerosol by terrorists in an attack create an urgent need to implement a rapid and effective method which enables to identify the agent. In our study two primers FopA F/R and hybridization probes FopA S1/S2 designed from *fopA* gene sequence, were tested for their potential applicability to identify *F. tularensis*. In this research 50 strains of *F. tularensis* were used and the test gave positive results. Reaction specificity was confirmed by using of *non - Francisella tularensis* bacterial species. The results obtained in the real-time PCR reaction with primers Tul4 F/R and hybridization probes Tul4 S1/S2, designed from *tul4* gene, were comparable to the results from previous experiment with fopA - primers set. Investigation of fopA and tul4 primers and hybridization probes properties revealed characteristic Tm (melting temperature) value of the products - 61ºC and 60ºC, respectively. Detection sensitivity was remarkably higher when fopA primers set was used 1 fg/µl, and for tul4 primers set, minimal detectable concentration is 10 fg/µl.

PIŚMIENNICTWO

1. *Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA*. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. Infect and Immun 2005; 73: 5892-902.
2. *Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA* i inni. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2001; 285: 2763-73.
3. *Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW.* Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 631-46.
4. *Emanuel PA, Bell R, Dang JL* i inni. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. J Clin Microbiol 2003; 41: 689-93.
5. *Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A*. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. J Syst Bacteriol 1994; 44: 38-46.
6. *Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A*. Development of a Real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis 2006; 59: 46-51.
7. *Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J* i inni. Detection of *Francisiella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. Am J Med Hyg 2000; 62: 310-8.
8. *Huntley JF, Conley PG, Hagman KE, Norgard MV*. Characterization of *Francisella tularensis* outer mambrane proteins. J Bacteriol 2007; 189: 561-74.
9. *Mierzyńska D, Hermanowska-Szpakowicz T*. Tularemia jako potencjalna broń bioterrorystów. Medycyna Pracy 2002; 53: 279-81.
10. *Oyston PCF, Sjöstedt A, Titball RW*. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nature Rev Microbiol 2004; 2: 967-78.
11. *Rastawicki W., Jagielski M.* Tularemia. Post. Mikrobiol., 2005, 44: 265-73.
12. *Saslav S, Eigelsbach HT, Wilson* HE i inni. Tularemia vaccine study I. Intracutaneous challenge. Arch Int Med 1961; 107: 689-701.
13. *Sjöstedt A*. Family XVII *Francisellaceae,* genus I *Francisella.* In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Editor. D.J. Brenner, Springer – Verlag, New York 2005.13
14. *Tarnvik A, Berglund L.* Tularemia. Eur Respir J, 2003; 21: 361-73.
15. *Tomaso H, Scholz HC, Neubauer HA* i inni. Real-time PCR hybridization for the rapid and specific identification of *Francisiella tularensis subspecies tularensis*. Mol Cell Probes 2003; 21: 12-67.
16. *Wicki R., Sauter C., Mettler A., Natsch A.* Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, Members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne Encephalitis virus in ticks. Eur J Clin Mikrobiol Infect Dis 2000; 19: 427–32.
17. *Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Peterson J M*. Development of a multitarget real-time Taq-Man PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol 2003; 41: 5492-9.

Otrzymano: 31 V 2010 r.

Adres Autora: 24-100 Puławy, ul. Lubelska 2,
Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych WIHE