

Beata Osiak, Michał Bartoszcze, Jerzy Gawel

**FRANCISELLA TULARENSIS – CECHY ZARAZKA,
PATOGENEZA, DIAGNOSTYKA**

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii – Puławy
Szef Ośrodka: Michał Bartoszcze

W artykule przedstawiono aktualną klasyfikację Francisella tularensis, charakterystykę zarazka z uwzględnieniem mechanizmów zakażenia oraz metody diagnostyczne, w tym metody mikrobiologii klasycznej i biologii molekularnej.

Słowa kluczowe: Francisella tularensis, tularemia, mechanizmy zakażenia, diagnostyka, szczepienia

Key words: Francisella tularensis, tularemia, pathogenesis, diagnostics, vaccination

WSTĘP

Epidemia wśród gryzoni, jaka miała miejsce w 1911 r. w miejscowości Tulare (California, USA), doprowadziła do wyizolowania małych Gram-ujemnych bakterii, które nazwano początkowo *Bacterium tularensis*, a chorobę przez nie wywołaną tularemią (1-4). Od tego czasu donoszono o naturalnych ogniskach tularemii występujących w Ameryce Północnej, Japonii, na terenach byłego Związku Radzieckiego, w Turcji, Jugosławii, Hiszpanii, Kosowie, Bośni, Republice Czeskiej, Słowacji i Skandynawii (1,3-8). Tularemię w Polsce notowano w województwach północno-zachodnich i północno-wschodnich (woj. szczecińskie, woj. olsztyńskie i woj. białostockie). Możliwość użycia *Francisella tularensis* w atakach bioterrorystycznych wpłynęła na wzrost zainteresowania tym mikroorganizmem. Rozwija się nowe metody identyfikacyjne tego zarazka, prowadzone są intensywne badania nad profilaktyką i leczeniem tularemii oraz opracowuje się procedury postępowania na wypadek użycia *F. tularensis* w atakach terrorystycznych (1,5,9,10).

Rezerwuarem zarazka są m. in. wiewiórki ziemne, króliki, zające, myszowate, szczury piżmowe, szczury wodne i inne gryzonie (1,3,5,7). Zaobserwowano korelację między pojawieniem się epidemii tularemii u zwierząt myszowatych i zajęcy a występowaniem choroby u ludzi (1). Tam, gdzie tularemia występuje endemicznie, we krwi zwierząt wolnożyjących wykrywa się często przeciwciała dla *F. tularensis* (1). Istotną rolę w przenoszeniu choroby odgrywają stawonogi. W Europie Centralnej ważnymi nosicielami *F. tularensis* są kleszcze *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*. W Utah, Nevadzie i Kalifornii (USA)

przenosicielem choroby są kąsające muchy, a na obszarze Gór Skalistych kleszcze (1,4,5, 7,8). W byłym Związku Radzieckim, bakteria jest przenoszona przez komary i kleszcze z gatunku: *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* i *Ixodes* (1). Bobry i szczury piżmowe w Północnej Ameryce oraz lemingi i bobry żyjące w Skandynawii mogą odgrywać znaczącą rolę w utrzymaniu się bakterii w środowisku wodnym (1,4). *F. tularensis* można wyizolować z ameby, żyjącej zarówno w wodach stojących, jak i w strumieniach (1). Rolnicy, myśliwi, leśnicy i turyści przebywający na obszarach endemicznych są najbardziej narażeni na zakażenie (1,3,5).

KLASYFIKACJA I CHARAKTERYSTYKA ZARAZKA

Według najnowszej systematyki Bergey'a, do rodziny *Francisellaceae* zalicza się rodzaj *Francisella*, który obejmuje dwa gatunki *Francisella tularensis* i *Francisella philomiragia*. Pierwszy gatunek dzieli się na cztery podgatunki: *F. tularensis* subspecies *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* oraz *F. tularensis* subsp. *novicida* (7). *F. tularensis* jest małą (0,2-0,5 µm do 0,7-1,0 µm), Gram-ujemną, tlenową, nieruchliwą i nietworzącą przetrwalników ziarniakowatą bakterią (1). *F. philomiragia* ma wielkość 0,7-1,7 µm, szczepy jej są oksydazo-dodatnie, mają zdolność do hydrolizy żelatyny i szybkiego wzrostu, wykazują zjadliwość wobec ludzi z defektami immunologicznymi (7). Badania sekwencji 16S rDNA wykazały, że *F. tularensis* i *F. philomiragia* stanowią dwa odrębne gatunki (5).

Pierwotnie, szczepy *F. tularensis* były identyfikowane i zaliczane do subsp. *tularensis* (jako typ A albo podgatunek *nearctica*) i subspecies *palaeartica* (znany jako typ B lub podgatunek *holarctica*), głównie na podstawie ich zjadliwości dla ludzi, aktywności ureidazy cytrulinowej i fermentacji glicerolu (1,3,6-9,11). Bardziej szczegółowe dane o *F. tularensis* subsp. *tularensis* i subsp. *holarctica* zawiera praca Olsuffeva i Mesheryakova (wg. 1,7). Autorzy ci uwzględniają trzy odmiany *F. tularensis* subsp. *holarctica*: I – wrażliwa na erytromycynę, II – oporna na erytromycynę i III – odmiana japońska. Nowsze badania wykazały, że *F. tularensis* subsp. *tularensis* występuje nie tylko w Północnej Ameryce, ale jest szerzej rozpowszechniony (1,3-5,7,12). *F. tularensis* subsp. *holarctica* jest wykrywany głównie w Północnej Ameryce i w Eurazji (1,3,5,7,12). Czwarty podgatunek *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* występujący w Centralnej Azji – w republikach byłego Związku Radzieckiego i jest mniej zjadliwy dla królików niż szczep *F. tularensis* subsp. *tularensis* (1,4,7,8)

Wielkość genomu Schu S4 *Francisella tularensis* wynosi 1 892 819 bp, co oznacza, że jest jednym z mniejszych genomów bakteryjnych (13). Szczep Schu S4 nie posiada plazmidu pOM1 lub pNFL10, a stosunek zasad G i C stanowi 32,9% całości zasad purynowych i pirymidynowych w genomie. Wszystkie geny tego szczepu kodują około 1289 białek, z których około 413 nie zostało do tej pory w pełni zidentyfikowanych. Genom jest bogaty w elementy IS (*insertion sequence*) – zawiera ich 74 oraz 1804 sekwencje kodujące (13). W ostatnim czasie prowadzi się intensywne badania z wykorzystaniem proteomiki do wykrycia ewentualnych różnic w ekspresji białek wspomnianych podgatunków *F. tularensis*. Dotychczas zidentyfikowano 27 białek występujących w subsp. *tularensis*, 22 białka u subsp. *mediasiatica* i 26 u szczepów *holarctica*. Odkryto ponadto 27 białek wspólnych dla podtypów *tularensis* i *mediasiatica* (TM), 19 charakterystycznych dla grupy *mediasiatica*

i *holarctica* (MH) oraz 9 białek w podtypach *tularensis* i *holarctica* (TH). Na podstawie analizy profili białkowych można różnicować poszczególne podtypy *F. tularensis*, a przez porównanie „wzorów” białkowych występujących u wysoce zjadliwego podtypu *tularensis* z mniej zjadliwymi *mediasiatica* i *holarctica*, można będzie rozpoznać białka odpowiedzialne za zjadliwość *Francisella tularensis* (14). Poznanie całego genomu *Francisella tularensis* otworzy z pewnością nowe możliwości w określeniu funkcji genów, poznania ewolucji tego drobnoustroju oraz ułatwi opracowanie nowych szczepionek, testów diagnostycznych itp.

CZYNNIKI ZJADLIWOŚCI

Francisella tularensis jest wysoce zjadliwą bakterią; do wywołania choroby u ludzi wystarczy zaledwie 10 komórek tych bakterii (1,3,5,6,13). Ze względu na wysoką zaraźliwość i zdolność do wywoływania ciężko przebiegającej choroby, zalicza się ją do kategorii A – czynników biologicznych najwyższego ryzyka. Miano LD₅₀ *F. tularensis* subspecies *holarctica* dla królików wynosi powyżej 10⁶ CFU, przy czym ludzie rzadko umierają w wyniku zakażenia tym podtypem. LD₅₀ podtypu *tularensis* dla wszystkich wrażliwych ssaków, wliczając ludzi wynosi poniżej 10² CFU. Dwa inne podtypy: *F. tularensis* subsp. *novicida* i subsp. *mediasiatica*, mają mniejsze znaczenie kliniczne (6). Do zakażenia dochodzi w wyniku bezpośredniego kontaktu człowieka z zakażonymi zwierzętami lub ich produktami, po spożyciu zakażonej żywności i wody, drogą kropelkową oraz za pośrednictwem owadów kłujących. Opisano także przypadki zakażeń laboratoryjnych. Nie zanotowano dotychczas przypadków przenoszenia się choroby z człowieka na człowieka (1). *Francisella tularensis* jest patogenem wewnątrzkomórkowym, a głównym celem jej ataku są makrofagi, gdzie dochodzi do jej intensywnego namnażania. Organizm broni się przed zakażeniem uruchamiając wiele mechanizmów obronnych. Na początku infekcji leukocyty PLMNs (*polymorphonuclear leukocytes*) są w stanie fagocytować bakterie i niszczyć je. W tej fazie proces infekcji hamują: czynnik TNF (*tumor necrosis factor*) i gamma interferon (*IFN-γ*) (5). Prawdopodobnym źródłem TNF są keratynocyty, a *IFN-γ* komórki NK (*natural killers*). W fazie przejściowej bakteriemii patogen jest oporny na lityczne działanie dopełniacza, głównie dzięki obecności otoczki. Dochodzi wówczas do zasiedlania przez bakterie układu retikuloendotelialnego. W ciągu 48 h trwania infekcji produkowane są w organizmie głównie: TNF α , interleukina-10, interleukina-12 i *INF-γ*, a w miarę rozwoju infekcji ważną rolę w walce z zakażeniem odgrywają komórki T, o czym świadczy fakt, że myszy o obniżonym poziomie tych komórek nie są w stanie zwalczyć zakażenia. Podczas infekcji dochodzi także do ekspansji w wyniku ekspozycji na fosfoantygeny *F. tularensis* subpopulacji komórek V γ 9 V δ 2 T. Również neutrofile, wykazujące lityczne działanie wobec zainfekowanych bakteriami komórek, odgrywają ważną rolę w walce z infekcją. Jedno z loci *Bcg* (*Nramp1*) bierze udział w naturalnej oporności na zakażenie pierwotne, wpływając na aktywację makrofagów przez *IFN-γ* i LPS; zaobserwowano, że mutacje tego allele powodują wzrost wrażliwości organizmu na infekcje wywoływane przez patogeny wewnątrzkomórkowe (1,5,15).

Francisella tularensis atakuje makrofagi przy udziale cytochalazyny B, która osłabia reakcję RB (*respiratory burst*), polegającą na tworzeniu się reaktywnych form tlenu ROS (*reactive oxygen system*) wykazujących działanie bakteriobójcze (1). Makrofagi otaczają

F. tularensis przez „obszerną asymetryczną pętlę nibynóżki”, co zachodzi przy udziale mikrofilamentów aktywnych. Wydajne wchłanianie komórek bakteryjnych przez makrofagi wymaga pełnej aktywności dopełniacza w surowicy. Niezbędna jest przy tym obecność C3 dopełniacza, receptora CR3 oraz innych receptorów (6,12). W trakcie infekcji bakteria może być fagocytowana np. przez leukocyty PMNLs i niszczona przez mechanizmy uwalniania reaktywnych form tlenu. Wykryte u *F. tularensis* białko *acpA* wykazuje aktywność kwaśnej fosfatazy, dzięki czemu zdolne jest do hamowania reakcji RB komórek bardziej efektywnie niż u innych patogenów wewnątrzkomórkowych (1,6,13). Bakterie przebywające w fagosomie makrofagów wymagają zakwaszenia środowiska, co jest niezbędne do pobierania przez nie żelaza, namnażania się i wzrostu. Niskie pH powoduje bowiem uwalnianie się żelaza z transferyny gospodarza (5). W związku z tym, że pierwiastek ten jest niezbędny do wzrostu *F. tularensis*, ograniczenie jego dostępności jest jedną z metod walki organizmu z zakażeniem. Dodatkowo, zakwaszenie fagosomu może indukować czynniki wirulencji, które przechodzą do cytoplazmy komórki. Interakcja pomiędzy bakterią a makrofagiem zależy od typu makrofagów (5). Tak np. aktywacja makrofagów otrzewnowych prowadzi do produkcji tlenu azotu – NO, inaktywującego bakterie, zaś makrofagi pęcherzykowe (płucne), aktywowane przez interferon- γ zdolne są do zabijania bakterii nawet w obecności inhibitorów wytwarzania NO (1,5,6). Na indukcję NO wpływa LPS *F. tularensis*, modulując nieswoistą odporność organizmu. W czasie rozwoju zakażenia większość bakterii uwalnia się z fagosomu i przedostaje do cytoplazmy komórki. Mechanizm tego zjawiska nie został dokładnie poznany; być może kluczową rolę w tym procesie odgrywa gamma interferon poprzez degradowanie błony fagosomu zakażonych komórek. Początkowo wewnątrzkomórkowe namnażanie się bakterii jest powolne, jednak po 12 godzinach ulega znacznemu przyspieszeniu (5,6). W wyniku namnażania się *F. tularensis* wewnątrz makrofagów, dochodzi do ich śmierci, dzięki czemu uwolnione drobnoustroje mogą atakować kolejne komórki gospodarza (1,12). Stwierdzono, że mutacje w genach *iglA*, *iglC* i *pdpD* ograniczają zdolność *F. tularensis* do przetrwania w makrofagach. Wewnątrz makrofagów bakteria może degradować błonę fagosomalną i przedostawać się do cytozolu. Przypuszcza się, że geny kodujące fosfolipazę C i fosfolipazę D mogą odgrywać pewną rolę w tym procesie (5,13).

W pełni wirulentne szczepy posiadają otoczkę chroniącą je przed czynnikiem oporności surowiczej, o czym świadczy fakt, że szczepy *F. tularensis* pozbawione otoczki były niezdolne dla myszy i wrażliwe na lizę dopełniacza. Wykazano, że LPS *F. tularensis* odgrywa dużą rolę we wzroście bakterii w makrofagach, na co wskazuje fakt, że zmutowane szczepy *F. tularensis* nie były zdolne do namnażania się w makrofagach i wykazywały zwiększoną wrażliwość na bakteriobójcze działanie surowicy. Stwierdzono również, że 23-kDa białko cytoplazmatyczne *F. tularensis* odgrywa dużą rolę w jej zdolności do wewnątrzkomórkowego namnażania się wpływając hamująco na działanie prozapalnych cytokin (1,5,6,15).

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

Do badań laboratoryjnych pobiera się zeszkrobiny z miejsc chorobowo zmienionych, płwocinę, biopaty z węzłów chłonnych, krew, a także próbki zanieczyszczonej żywności i wody (1).

Diagnostyka bakteriologiczna. W barwionych preparatach mikroskopowych widoczne są małe, Gram-ujemne bakterie, mające kształt kulistych paciorków lub form pałeczkowatych o różnej długości. Stosuje się także barwienie dwubiegunowe. Drobnostrój izolowane ze zmienionych tkanek wykazują obecność otoczki. *F. tularensis* wymaga do swego wzrostu podłoża wzbogaconego w cystynę lub cysteinę (agar z krwią z dodatkiem glukozy i cysteiny). Stosuje się także wzbogacony agar czekoladowy (agar cysteinowy wzbogacony 9% dodatkiem erytrocytów baranich (CHAB]) oraz niewybiórczy agar z ekstraktem z drożdży i węgla drzewnego. Zalecane są także inne podłoża jak np.: Cystine Heart Agar z dodatkiem hemoglobiny i Thayer-Martin Agar z odpowiednim suplementem (1, 11, 12). Wzrost bakterii widoczny jest po ok. 18 h po posianiu, a niektóre szczepy rosną od 3 do 6, a nawet do 10 dni (1, 11, 15). *F. tularensis* rośnie powoli w temp. 37°C i bardzo słabo w temp. 28°C, co wykorzystuje się przy różnicowaniu *F. tularensis* od *Yersinia pestis*, *F. philomiragia* i *F. tularensis* subsp. *novicida*, które dobrze rosną w 28°C (1). Na podłożach stałych kolonie są gładkie, nieznacznie śluzowate, o wielkości 2 do 4 mm i barwie zielonkawo-białej. Na podłożach krwawych tworzą małą strefę hemolizy (1). Dolny wzrost bakterii obserwuje się w zmodyfikowanym bulionie Mueller-Hintona z dodatkiem 0.025 % pirofosforanu żelazowego (1). Stosując test ELISA w próbkach klinicznych i w surowicy, pobranej od chorych można wykryć antygen lipopolisacharydowy (LPS) (1, 16).

Większość przypadków tularemii diagnozuje się na podstawie obrazu klinicznego i badań serologicznych. Stosując test ELISA lub odczyn aglutynacyjny wykrywa się swoiste przeciwciała po około 2 tygodniach od wystąpienia choroby (8, 12, 16). Test lateksowy używa się często do kontroli obecności przeciwciał *F. tularensis* u pracowników narażonych na kontakt z patogenem, przy czym miano <1:40 uznaje się za dodatnie (1). Dostępne komercyjnie antygeny mogą być stosowane w badaniach na obecność przeciwciał dla *F. tularensis* w próbówkowym teście aglutynacyjnym (1). Do szybkiej diagnostyki *F. tularensis* stosuje się również immunochromatograficzny test SMART, który może być wykorzystany w warunkach polowych.

Diagnostyka genetyczna. Stosuje się w tym celu metodę PCR, wykorzystując m.in. primery flankujące gen *tul4* kodujący lipoproteid błony zewnętrznej (*T-cell epitope membrane gene*) – (amplikon o wielkości 250 bp) (1, 8, 11). Technikę nested-PCR wykorzystuje się przy wykrywaniu sekwencji w genie *fopA*, kodującym białko błony zewnętrznej (*outer membrane protein gene*) o wielkości 17-kDa (1, 17), używając dwu par primerów: zewnętrzne – wielkość produktu – 900 bp i wewnętrzne amplifikujące fragment o wielkości – 409 bp. Technika PCR jest wysoce specyficzna, a według Grunowa i wsp. (1) czułość jej wynosi 10²CFU/ml, podczas gdy metody nested-PCR – 1 CFU/ml (1). Próbkami środowiskowymi mogą hamować reakcję PCR, w związku z czym opracowano m.in. specjalne filtry do kolekcji próbek środowiskowych oraz metody szybkiej izolacji matrycowego DNA (1). Stosując metodę PCR-ELISA i sondę TaqMan 5', przy wykrywaniu *F. tularensis* uzyskano czułość 100 CFU/ml (1, 18). W typowaniu molekularnym szczepów *F. tularensis* stosuje się m.in.: LR-REP-PCR (long range repetitive extragenic palindromic PCR) i ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intragenic consensus). Metody LR-REP-PCR i ERIC-PCR pozwoliły na różnicowanie *F. tularensis* na poziomie podgatunku (1, 8, 19). Techniką VNTR (variable-number tandem repeats) odróżniano *F. tularensis* subsp. *holarctica* od innych podgatunków *F. tularensis* (8). Do szybkiego typowania szczepów *F. tularensis* stosowany

jest ERIC-PCR, wykorzystujący parę starterów, za pomocą której następuje amplifikacja DNA między oddalonymi od siebie, powtarzającymi się sekwencjami genów *F. tularensis*, dzięki czemu możliwe jest dokonanie podziału szczepów *F. tularensis* na grupy (19,20). Analiza makrorestrykcyjna w zmiennym polu elektrycznym pozwala na weryfikację wyników uzyskanych metodą ERIC-PCR. Jest ona szeroko rozpowszechniona w badaniach nad bakteriami Gram-dodatnimi jak i Gram-ujemnymi, a przez wielu autorów uznana za „złoty środek” w różnicowaniu genetycznym bakterii (21). AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) polega na selektywnej amplifikacji fragmentów DNA otrzymanych w wyniku trawienia restrykcyjnego, co pozwala na różnicowanie wewnątrzgatunkowe tych bakterii (21). W identyfikacji *F. tularensis* zastosowano również metodę mikromacierzy DNA, która daje ponadto możliwość uzyskania dużej liczby informacji na temat ekspresji genów, mutacji, polimorfizmu, stopnia pokrewieństwa itp. (22).

WRAŻLIWOŚĆ NA ANTYBIOTYKI

F. tularensis wykazuje wrażliwość na: aminoglikozydy: streptomycynę, gentamycynę, kanamycynę, tobramycynę; quinolony: cyprofloksacynę, lewofloksacynę, grepafloksacynę, jak również tetracykliny. Antybiotykiem z wyboru jest streptomycyna, a alternatywnie stosowana jest gentamycyna (1,7,11). W przypadku masowych zachorowań można podawać cyprofloksacynę i doksycyklinę (1). Stosowanie cyprofloksacyny dało również dobre rezultaty w leczeniu tularemii u dzieci oraz w przypadku nawrotu choroby po leczeniu gentamycyną (1). W ciężkich przypadkach choroby można zastosować rifamycynę w kombinacji z aminoglikozydami lub quinolonami. Wykazano oporność szczepów *F. tularensis* na antybiotyki β -laktamowe i częściową oporność na makrolidy – erytromycynę (1,7,11). Niektóre szczepy *F. tularensis* (typ A) odporne na streptomycynę, były przyczyną zakażeń laboratoryjnych (9).

SZCZEPIENIA OCHRONNE

Pierwsze badania nad szczepionką przeciwko tularemii przeprowadzono z użyciem zabitych komórek *F. tularensis*, uzyskując jednak niski poziom odporności zarówno u człowieka, jak i u zwierząt. Prace nad żywą atenuowaną szczepionką rozpoczęto w byłym Związku Radzieckim przed wybuchem II Wojny Światowej. Przebadano wiele szczepów *F. tularensis*, z których szczepy o numerach 15 i 155 posłużyły do wyprodukowania żywej szczepionki, którą zastosowano na skalę masową. Wspomniane szczepy zostały przekazane do Instytutu Chorób Zakaźnych Armii USA, gdzie w następstwie dalszych eksperymentów wyizolowano szczep LVS (*Live Vaccine Strain*), z którego otrzymano szczepionkę atenuowaną przeciwko tularemii (2,9,10). W badaniach klinicznych podawano ją doustnie, drogą aerogenną oraz metodą skaryfikacji, która okazała się najlepsza. Przeprowadzone badania nad szczepionką LVS wykazały, że nie daje ona całkowitej ochrony przed brzusznią postacią tularemii, a w przypadku postaci wrzodziejąco-gruczołowej tylko nieznacznie wpływała na łagodniejszy przebieg choroby. Nie była ona również skuteczna przeciwko wziewnej formie tularemii. Stosuje się ją tylko w sytuacjach kryzysowych, głównie dla personelu wysokiego ryzyka (2,9,10). Niedawno odkryto zmutowany, atenuowany szczep Schu S4 (mniej zjadliwy dla myszy) i dający lepszą ochronę przed zakażeniem

wziwnym *F. tularensis subsp. tularensis* (9). Obecnie znaczna część badaczy skupia się na badaniach antygenów, które byłyby przydatne do opracowania szczepionki podjednostkowej. Jedynym, jak dotąd, antygenem wykazującym zdolność indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciwko *F. tularensis* jest LPS. Ochrona organizmu przed wysoce zjadliwymi szczepami *F. tularensis* wymaga nie tylko odpowiedzi humoralnej organizmu, ale także i komórkowej (2,9). Pewne nadzieje wiąże się z białkami Hsps (*heat shock proteins*), jednak myszy szczepione Hsps60, izolowanym z *F. tularensis* wykazywały niski poziom odporności na zakażenie *F. tularensis subsp. holarctica* (szczepy-LVS i HN63). Zidentyfikowano także szereg białek, indukujących proliferację komórek T jak np. 17 kDa polipeptyd i białko FopA, ale jak dotąd nie spełniły one pokładanych w nich nadziei. Podejmuje się również badania nad opracowaniem szczepionki opartej o DNA (2). Obecnie brak jest na rynku licencjonowanych szczepionek przeciwko tularemii. Jedyną dostępną szczepionką jest żywa, atenuowana szczepionka LVS, która nie jest jednak powszechnie dostępna, a jej stosowanie ogranicza się do osób z grupy wysokiego ryzyka (1-3,5,9,10).

B Osiak, M Bartoszcze, J Gawel

FRANCISELLA TULARENSIS – FEATURE OF PATHOGEN, PATHOGENESIS,
DIAGNOSTICS

SUMMARY

Francisella tularensis belongs to the *Francisellaceae* family. There are four known subspecies of *Francisella tularensis*: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*. Fully virulent strains possess a capsule, which protects *F. tularensis* from bactericidal action of serum. The main virulence factors of *F. tularensis* are 23-kDa cytoplasmatic protein and LPS. *F. tularensis* mechanism of pathogenicity is very unique. *F. tularensis* affect macrophages using a cytochalasin B intensive pathway. Bacteria live within macrophage in a phagosome. Acidification of the phagosome and acquisition of iron is essential for growth of *F. tularensis*. An acid pH promotes the release of iron from host-cell transferrin. An acid phosphatase function protein, AcpA, has been identified in *F. tularensis*. AcpA is capable of inhibiting the respiratory burst.

A laboratory diagnostics of tularemia is based on classical microbiology and molecular biology techniques: PCR, nested-PCR, PCR-ELISA, Real-Time - PCR, ALFP, ERIC-PCR, PFGE, LR-REP-PCR and microarray techniques.

PIŚMIENNICTWO

1. Ellis J, Oyston PCF, Green M, i in. Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002;15(4):631-646.
2. Oyston PCF, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. Antonie van Leeuwenhoek 2005;87(4):277-281.
3. Tarnvik A, Berglund L. Tularaemia. Eur Respir J 2003;21:361-373.
4. Farlow J, Wanger DM, Dukerich M, i in. *Francisella tularensis* in the United States. Emerg Infect Dis 2005;11(12):1835-1841.
5. Oyston PCF, Sjostedt A, Titball RW. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nature Rev Microbiol 2004;2:967-978.
6. Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. Cur Opin Microbiol 2003;6(1):66-71.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by Brenner DJ. Berlin Springer 2005.

8. Johansson A, Forsman M, Sjostedt A. The development of tools diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. Acta Path Microbiol Immunolog Scand 2004;112:898-907.
9. Conlan JW. Vaccines against *Francisella tularensis* – past, present and future. Expert Rev Vac 2004;3(3):89-96.
10. Isherwood KE, Titball RW, Davies DH, i in. Vaccination strategies for *Francisella tularensis*. Adv Drug Del Rev 2005;57:1403-1414.
11. Ikaheimo I, Syrjala H, Karhukorpi J, i in. *In vitro* antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. J Antimicrobial Chem 2000;46:287-290.
12. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. Infect and Immun 2005;73(9):5892-5902.
13. Larsson P, Oyston PCF, Chain P, i in. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. Nat Gen 2003; 37(2):153-159.
14. Hubalek M, Hernychova L, Brychta M, i in. Comparative proteome analysis of cellular proteins extracted from highly virulent *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and less virulent *F. tularensis* ssp. *holarctica* and *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica*. Proteomics 2004;4(10):3048-3060.
15. Lindgren H, Golovliov I, Baranov V, i in. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. J Med. Microbiol. 2004;53:953-958.
16. Porsch-Ozcurumez M, Kischel N, Priebe H, i in. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11(6):1008-1015.
17. Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1996;54(4):364-366.
18. Versage JI, Severin DDM., Chu MC, i in. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol 2003;41(12):5492-5499.
19. Puente-Redondo VA, Garcia del Blanco N, Gutierrez-Martin CB, i in. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J Clin Microbiol 2000;38(3):1016-1022.
20. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991;19(24):6823-6831.
21. Garcia Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, i in. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 2002;40(8):2964-2972.
22. Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, i in. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subspp. *tularensis*. J Clin Microbiol 2003;41(7):2924-2931.

Otrzymano: 2.06.2006 r.

Adres autorów:

Beata Osiak
Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy
tel. (081) 883-98-09, fax (081) 886-28-22
e-mail: beata.osiak@wp.pl