

*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 odgrywiają stawonogi. W Europie Centralnej ważnymi nosicielami *F. tularensis* są kleszcze *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*. W Utah, Nevadzie i Kaliforni (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  $LD_{50}$  *F. tularensis* subspecies *holarctica* dla królików wynosi powyżej  $10^6$  CFU, przy czym ludzie rzadko umierają w wyniku zakażenia tym podtypem.  $LD_{50}$  podtypu *tularensis* dla wszystkich wrażliwych ssaków, wliczając ludzi wynosi poniżej  $10^2$  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- $\gamma$* ) (5). Prawdopodobnym źródłem TNF są keratynocyty, a *IFN- $\gamma$*  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  $\alpha$ , interleukina-10, interleukina-12 i *INF- $\gamma$* , 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 $\gamma$ 9 V $\delta$ 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- $\gamma$*  i LPS; zaobserwowano, że mutacje tego allele powodują wzrost wrażliwości organizmu na infekcje wywołane 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- $\gamma$  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 10<sup>2</sup>CFU/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  $\beta$ -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 brzuszną 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* subsp. *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