

Aleksandra A Zasada, Rafał Gierczyński, Magdalena Rzeczkowska, Kamila Formińska,  
Katarzyna Zacharczuk, Waldemar Rastawicki

## WYKRYWANIE I IDENTYFIKACJA WYSOCE PATOGENNYCH BAKTERII W RAMACH MIĘDZYNARODOWEGO PROJEKTU EQADeBa – CZĘŚĆ I: PRÓBKI ZAWIERAJĄCE ŻYWE PATOGENY

### DETECTION AND IDENTIFICATION OF HIGHLY PATHOGENIC BACTERIA WITHIN THE FRAMEWORK OF THE EQADeBa PROJECT – PART I: SAMPLES CONTAINING LIVING PATHOGENS

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny

#### STRESZCZENIE

*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* sp., *Bulkholderia mallei* i *B. pseudomallei* to drobnoustroje wysoce chorobotwórcze, które mogą stanowić potencjalne zagrożenie bioterrorystyczne. W celu wsparcia systemu wzajemnego wczesnego ostrzegania oraz opracowania procedur zapewniających szybką odpowiedź i podjęcie skutecznych działań na wypadek ataku bioterrorystycznego powstał międzynarodowy projekt “Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk” (EQADeBa). Projekt ten przyjął za cel utworzenie w Europie sieci laboratoriów, które posiadają odpowiedni stopień zabezpieczeń oraz zatrudniają specjalistów i personel przeszkolony w wykrywaniu i identyfikacji tych niebezpiecznych patogenów.

Niniejsza praca przedstawia metody zastosowane do badania próbek zawierających żywe patogeny oraz wyniki uzyskane w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH w trzecim międzynarodowym sprawdzianie zorganizowanym w ramach projektu EQADeBa, dotyczącym oceny kompetencji laboratoriów w zakresie wykrywania i identyfikacji wyżej wymienionych patogenów. W pracy omówiono także metody stosowane w innych laboratoriach i porównano uzyskane wyniki.

Wyniki sprawdzianu potwierdziły kompetencje NIZP-PZH w wykrywaniu i identyfikacji wysoce patogenych bakterii objętych projektem EQADeBa.

**Słowa kluczowe:** wysoce patogeniczne bakterie, projekt EQADeBa, dżuma, wąglik, tularemia

#### ABSTRACT

*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* sp., *Bulkholderia mallei* and *B. pseudomallei* are highly pathogenic bacteria of potential bioterrorism risk. To support the early warning and rapid response capacity to ensure an effective reaction to bioterrorist attacks the international project “Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk” (EQADeBa) has been established. The aim of the project was establishment of the network of European laboratories that possess a suitable infrastructure and experts and laboratory workers trained in detection and identification of the highly pathogenic bacteria.

This work presents methods used in investigation of samples containing living pathogens and results obtained in Department of Bacteriology NIZP-PZH in the third international test organized within the framework of the EQADeBa. The test evaluated competence of laboratories in detection and identification of pathogens mentioned above. In the work methods used in other laboratories were discussed and the results were compared.

Results of the test confirmed competence of NIZP-PZH in detection and identification of highly pathogenic bacteria covered by EQADeBa project.

**Key words:** highly pathogenic bacteria, EQADeBa project, plague, anthrax, tularemia

#### WSTĘP

W maju 2008 roku rozpoczęła się realizacja finansowanego przez Unię Europejską projektu “Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly

Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk” (EQADeBa). Celem projektu było utworzenie wśród krajów UE sieci laboratoriów, posiadających odpowiednie zaplecze techniczne i personel stale doskonalący umiejętności fachowe niezbędne do wykrywania

i identyfikacji wysoce niebezpiecznych patogenów bakteryjnych, w tym etiologicznych czynników dżumy, wągliku i tularemii. Doskonalenie umiejętności miało następować w drodze szkoleń przeprowadzonych w wiodących laboratoriach europejskich oraz w drodze wymiany informacji i doświadczeń pomiędzy laboratoriami. Zaplanowane w projekcie trzy międzynarodowe sprawdziany laboratoryjne miały określić możliwości laboratoriów obejmujące wszystkie aspekty biologicznego bezpieczeństwa oraz ocenić kompetencje i efektywność szkoleń personelu.

Zadaniem projektu było bezpośrednie wsparcie systemu wzajemnego wczesnego ostrzegania oraz opracowanie procedur zapewniających szybką odpowiedź i podjęcie skutecznych działań na wypadek ataku bioterrorystycznego. W kręgu zainteresowania projektu znalazły się następujące patogeny bakteryjne: *Bacillus anthracis* wywołujący wąglik, *Yersinia pestis* powodujący dżumę, *Francisella tularensis* stanowiący czynnik etiologiczny tularemii, *Brucella* sp. powodujący brucelozę, *Bulkholderia mallei* i *B. pseudomallei* wywołujące odpowiednio nosaciznę i melioidozę oraz *Coxiella burnetti* wywołujący gorączkę Q.

Ze względu na wysoką patogenność drobnoustrojów mogących stanowić potencjalne zagrożenie bioterrorystyczne, prowadzenie badań naukowych nad tymi drobnoustrojami, jak i badanie próbek przez nie skażonych wymaga posiadania odpowiednich zabezpieczeń w postaci laboratorium o trzecim poziomie bezpieczeństwa biologicznego (BSL3) oraz odpowiednio przeszkolonego personelu. Ograniczenia te prowadzą do znaczącego zawężenia grona specjalistów zajmujących się tą tematyką na całym świecie. Jednakże potrzeba utrzymania gotowości diagnostycznej dotyczącej rzadko występujących w Europie, ale charakteryzujących się wysoką śmiertelnością zakażeń wciąż istnieje, nie tylko ze względu na zagrożenie bioterroryzmem, ale także ze względu na swobodę przemieszczania się ludności, w tym pręźnie rozwijającą się turystykę do egzotycznych rejonów świata, gdzie choroby te wciąż występują endemicznie i mogą zostać zawleczone do Europy.

Celem trzeciego sprawdzianu EQADeBa była ocena kompetencji laboratoriów w zakresie wykrywania i identyfikacji *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, *Brucella* sp., *B. mallei* i *B. pseudomallei*. Niniejsza praca przedstawia zastosowane metody i wyniki uzyskane w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH oraz ich porównanie z metodami stosowanymi w innych europejskich laboratoriach badawczych oraz uzyskanymi przez te laboratoria wynikami.

## MATERIAŁ I METODY

**Badane próbki.** Materiał badań stanowiło 15 próbek zawierających żywe bakterie w postaci: czystej kultury poszukiwanego patogenu, mieszanej hodowli zawierającej poszukiwany patogen oraz florę towarzyszącą, bądź też hodowli zawierającej tylko florę towarzyszącą (tabela I). Florę towarzyszącą mogły stanowić bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* (inne niż *B. anthracis*), *Yersinia* (inne niż *Y. pestis*), *Pseudomonas* oraz *E. coli*. Próbkki zostały przygotowane w Instytucie Roberta Kocha w Berlinie i przesłane do krajów uczestniczących w sprawdzianie w warunkach kontrolowanej temperatury 2-8°C.

**Szczepy referencyjne.** W badaniach zastosowano następujące szczepy kontrolne: *Y. pestis* NCTC 00570, *Y. pestis* 03-1506, *Y. pestis* EV76C, *B. mallei* NCTC 10245, *B. pseudomallei* ATCC 23343, *B. abortus* A-104-10, *B. melitensis* A104-13, *B. suis* A104-14, *F. tularensis* ssp. *holarctica* A104-15, *F. tularensis* ssp. *tularensis* Ft33, *F. tularensis* ssp. *novocida* Ft26, które otrzymano z Instytutu Roberta Kocha w ramach projektu EQADeBa. W badaniach posłużono się wzorcowym szczepem *B. anthracis*: BL1 z kolekcji Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH.

**Podłoża.** Badane próbki wysiewano na następujące pożywki mikrobiologiczne: Columbia agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (COS, BioMerieux) – podłoże namnażające, CIN agar (Oxoid) – podłoże wybiórczo-różnicujące dla *Yersinia*, ASHDOWN agar (Oxoid) – podłoże wybiórcze dla *B. pseudomallei*, Brucella selective agar (BRUSEL, Oxoid) – podłoże wybiórcze dla *Brucella* sp., mallei selective agar (MALSE, Oxoid) – podłoże wybiórcze dla *B. mallei*, Cystine Hart Agar (CysHA, Difco) – podłoże namnażające dla *F. tularensis*, PLET agar (Sigma-Aldrich) – podłoże wybiórcze dla *B. anthracis*. Do oceny zdolności ruchu stosowano tradycyjne podłoże na ruch wzbogacone TTC (Sigma-Aldrich) w celu łatwiejszej oceny wyniku. Posiewy na podłożach COS, ASHDOWN, MALSE, PLET inkubowano w 37°C, posiewy na podłożach BRUSEL i CysHA inkubowano w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. W celu wykrycia pałeczek dżumy posiewy na podłożach CIN oraz COS inkubowano w temperaturze pokojowej.

**Środowisko laboratoryjne i stosowane zabezpieczenia personelu.** Wszystkie manipulacje z żywymi drobnoustrojami prowadzono w laboratorium trzeciej klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL 3) NIZP-PZH spełniającym wymogi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dla laboratoriów klasy „biosafety level 3” (1) oraz warunki wymagane dla trzeciego stopnia hermetyzacji zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 29 listopada 2002 r. w sprawie listy organizmów patogennych oraz ich klasyfikacji, a także

środków niezbędnych dla poszczególnych stopni hermetyczności (Dz. U. Nr 212, poz. 1798). Stosowano środki ochrony osobistej przedstawione w tabeli II.

**Izolacja DNA.** DNA izolowano z materiału pobranego bezpośrednio z podłoża transportowego oraz z kolonii wyrosłych na poszczególnych podłożach. Do izolacji DNA, w przypadku wszystkich badanych próbek, zastosowano zestaw komercyjny DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) oraz własną metodę opisaną wcześniej (2).

**Identyfikacja metodami molekularnymi.** Do identyfikacji poszukiwanych drobnoustrojów w próbkach stosowano standardową metodę PCR i real-time PCR. Technika real-time PCR została zastosowana do identyfikacji *B. mallei* i *B. pseudomallei* (3, 4) oraz *Y. pestis* – w oparciu o markery plazmidowe (procedura udostępniona dzięki uprzejmości dr H. Tomaso przed opublikowaniem (5)). Standardową metodę PCR zastosowano do identyfikacji *Y. pestis* – w oparciu o marker chromosomalny (6), *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. abortus* (7), *F. tularensis* ssp. *tularensis*, *F. tularensis* ssp. *holarctica*, *F. tularensis* ssp. *novocida* (8, 9, 10), *B. anthracis* (11). W tabeli III przedstawiono sekwencję starterów zastosowanych w badaniach. Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej real-time PCR użyto Rotor-Gene Probe PCR Kit firmy Qiagen. Reakcje oraz

odczyt wyników real-time PCR prowadzono w aparacie Rotor-Gene 6000 z zastosowaniem oprogramowania dostarczonego przez producenta urządzenia (Qiagen). Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej standardowego PCR stosowano Hot StarTaq Master Mix Kit firmy Qiagen. Reakcje prowadzono w termocyklerze Mastercycler 5333, Eppendorf, Niemcy.

## WYNIKI

Pierwszych pięć próbek (tabela I) zostało posianych na podłoża wybiórcze CIN, AHSDOWN, BRUSEL, MALSE, PLET oraz na podłoża namnażające COS i CysHA. Jednakże ze względu na niewystarczające właściwości wybiórcze użytych pożywek i konieczność jak najszybszego uzyskania ostatecznego wyniku badania, a także w celu uniknięcia konieczności przesiewania wysoce chorobotwórczych bakterii, w dalszych badaniach zastosowano jedynie podłoża namnażające, a identyfikację wyhodowanych drobnoustrojów prowadzono wyłącznie technikami biologii molekularnej.

Obydwie zastosowane metody izolacji DNA pozwoliły uzyskać preparaty genomowego DNA badanych drobnoustrojów. Nie stwierdzono obecności czynników hamujących PCR w próbkach wyizolowanego DNA.

Tabela I. Wyniki identyfikacji wysoce niebezpiecznych patogenów bakteryjnych w próbkach zawierających żywe patogeny, otrzymanych w ramach międzynarodowego sprawdzianu

Table I. Results of identification highly pathogenic bacteria in samples containing living pathogens, received within framework of the international test

Oznaczenie próbki	Patogen wykryty przez laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH	Informacje przekazane przez organizatorów po zakończeniu sprawdzianu			
		Patogen obecny w próbce	Flora towarzysząca	Wyniki we wszystkich 20 laboratoriach biorących udział w sprawdzianie	
				Poprawne	Błędne lub niepełne*
01**	-	-	<i>B. thaliandensis</i>	19	1
02**	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>	-	17	3
03**	-	-	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	19	1
04**	-	-	<i>B. thuringiensis</i>	19	1
05**	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i>	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i>	-	15	5
06	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. pseudomallei</i>	-	17	3
07	-	-	<i>Y. intermedia</i>	20	0
08	-	-	<i>Y. frederiksenii</i> , <i>E. coli</i>	20	0
09	-	<i>B. melitensis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	18	2
10	<i>B. anthracis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>E. coli</i>	18	2
11	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	<i>B. subtilis</i>	15	5
12	-	-	<i>F. philomiragia</i> , <i>Y. frederiksenii</i>	20	0
13	-	-	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	19	1
14	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>B. multivorans</i>	16	4
15	-	<i>B. mallei</i>	<i>S. equi</i>	17	3

\* identyfikacja tylko do rodzaju

\*\* próbki, dla których mierzono czas od rozpoczęcia badania do uzyskania ostatecznego wyniku.

Poszukiwane patogeny wykryto i poprawnie zidentyfikowano w 6 badanych próbkach, przy czym bakterie z gatunku *F. tularensis* zidentyfikowano z dokładnością do podgatunku. Wyniki identyfikacji zestawiono w tabeli I. Wykryto następujące patogeny: *Y. pestis*, *F. tularensis* ssp. *tularensis*, *F. tularensis* ssp. *holarctica*, *B. anthracis*, *B. abortus*, *B. pseudomallei*. Fałszywie ujemne wyniki uzyskano jedynie w przypadku badania dwóch próbek zawierających *B. melitensis* i *B. mallei*. We wszystkich próbkach, które zawierały jedynie florę towarzyszącą, nie wykryto wysoce chorobotwórczych bakterii objętych zakresem sprawdzianu.

W tabeli I zestawiono również wyniki uzyskane przez pozostałe laboratoria biorące udział w trzecim sprawdzianie EQADeBa. Tylko w przypadku trzech próbek wszystkie 20 laboratoriów wykryło i w pełni zidentyfikowało obecny w próbce patogen. Najwięcej kłopotów przysporzyły próbki oznaczone numerami 05 i 11. W przypadku każdej z nich aż 5 laboratoriów (25%) podało wynik błędny lub niepełny. Powodem tego mogą być problemy z identyfikacją podgatunku *F. tularensis* wynikające z bardzo wysokiego genetycznego podobieństwa obecnie wyróżnianych podgatunków tego drobnoustroju.

W badaniach diagnostycznych identyfikacja podgatunku *F. tularensis* jest niezmiernie istotna ze względu na duże różnice w chorobotwórczości tych drobnoustrojów dla człowieka (12). *F. tularensis* sp. *tularensis* charakteryzuje niska dawka infekcyjna, 10-50 komórek bakteryjnych, oraz śmiertelność 5-30%, podczas gdy *F. tularensis* ssp. *holarctica* wywołuje zwykle łagodne zakażenia, a przypadki śmiertelne zdarzają się niezwykle rzadko (9). Pozostałe podgatunki, *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* i *F. tularensis* ssp. *novicida*, charakteryzują się jeszcze niższą zdolnością do wywoływania zachorowań u ludzi (13).

Również wykrycie *Y. pestis* w próbce nr 14 nastąpiło sporych trudności i nie udało się czterem laboratoriom (20%). W próbce numer 09 *B. melitensis* nie została wykryta oprócz naszego laboratorium także jeszcze przez dwa inne laboratoria (15%), a *B. mallei* w próbce nr 15 oprócz naszego laboratorium nie została wykryta także przez trzy inne laboratoria (20%).

Tabela II. Stosowane jednorazowe środki ochrony osobistej  
Table II. Disposable personal protective equipment in use

Partie ciała	Środki ochrony osobistej
Korpus	fartuch chirurgiczny – rękawy z mankietami - wiązany z tyłu, fartuch foliowy przedni
Ręce	Dwie pary rękawiczek (lateksowe i nitylowe), nieprzemakalne narekawniki
Nogi	nieprzemakalne długie ochraniacze na nogi, nieprzemakalne krótkie ochraniacze na obuwiu medyczne
Głowa	Czepek, maska z filtrem HEPA typu EEP3 chroniąca drogi oddechowe, gogle

Powodem tego mogła być zbyt niska czułość stosowanych metod oraz dodatkowo fakt, że *Brucella* sp. jest drobnoustrojem wolnorosnącym i w hodowli mieszanej może zostać zdominowany przez florę towarzyszącą, co utrudnia wykrycie tego patogenu.

Czas potrzebny na uzyskanie ostatecznego wyniku dla 5 próbek, których diagnostyka była monitorowana pod względem czasu, wahał się w różnych laboratoriach od 3,5 godziny do 120 godzin.

## DYSKUSJA

Jednym z głównych założeń projektu EQADeBa było doskonalenie metod wykrywania i identyfikacji wysoce chorobotwórczych patogenów bakteryjnych. Przeprowadzony przegląd dostępnego piśmiennictwa pokazał, że jest to jak dotychczas jedyny projekt, który podjął to niezwykle ważne zagadnienie. Narzędziem doskonalenia były m.in. organizowane co roku międzynarodowe sprawdziany, możliwość udziału w szkoleniach oraz wymiana doświadczeń podczas organizowanych spotkań. Możliwości przeprowadzenia badań w NIZP-PZH oraz umiejętności i doświadczenie personelu rozwijało się w miarę trwania projektu. W poprzednich sprawdzianach, które odbyły się w marcu i listopadzie 2009 r. byliśmy w stanie przyjąć do badań tylko inaktywowane próbki zawierające zabite drobnoustroje oraz wykonać testy jedynie w kierunku obecności *B. anthracis*, *Y. pestis* i *F. tularensis* (14). Przed trzecim sprawdzianem autorzy niniejszej pracy odbyli odpowiednie szkolenia dotyczące pracy z wysoce patogennymi drobnoustrojami. Wprowadzono też metody diagnostyczne umożliwiające identyfikację patogenów należących do rodzajów *Brucella* i *Bulkholderia* oraz identyfikację podgatunków *F. tularensis*. Jednocześnie w NIZP-PZH uruchomiono laboratorium BSL3, dzięki czemu po raz pierwszy możliwe było przyjęcie próbek zawierających żywe, wysoce chorobotwórcze drobnoustroje oraz przebadanie ich w kierunku obecności wszystkich patogenów bakteryjnych będących w kręgu zainteresowań projektu.

W trzecim sprawdzianie obejmującym próbki zawierające żywe drobnoustroje wzięły udział laboratoria z 20 krajów. Panel stosowanych przez różne laboratoria testów do wykrywania i identyfikacji wysoce chorobotwórczych bakterii był szeroki i obejmował zarówno techniki klasyczne, jak barwienie metodą Grama, jak też techniki biologii molekularnej (standardowy PCR i real-time PCR). Ponadto, niektóre laboratoria w trakcie badań posiłkowały się również nowatorskimi metodami identyfikacji bakterii, jak np. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDITOF) (15, 16). Należy jednak podkreślić, że ostateczna identyfikacja poszukiwanych drobnoustrojów we wszystkich

Tabela III. Startery i sondy molekularne użyte w prezentowanych badaniach

Table III. Primers and molecular probes used in presented studies

Nazwa startera/sondy	Sekwencja nukleotydomowa (5'→3')	Wielkość produktu	Gen	Wykrywany patogen	Pozycja piśmiennictwa
Standardowy PCR					
YPS723F	CATCAGAGTTAAAGATAATAATTTCCG	300 pz	YPO0392	<i>Y. pestis</i>	(6)
YPS723R	AATCTGTTGTTATAGGAATCTTAATTC				
TUL4-435	GCTGTATCATCATTTAATAAAGCTGCTG	428 pz	<i>tul4</i>	<i>F. tularensis</i>	(8)
TUL4-863	TTGGGAAGCTTGATCATGGCACT				
FtC1	TCCGGTTGGATAGGTGTGGATT	300/ 330 pz	Nieokreślony	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> (300 pz) <i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i> (330 pz) <i>F. tularensis</i> ssp. <i>mediaasiatica</i> (330 pz) <i>F. tularensis</i> ssp. <i>novicida</i> (330 pz)	
FtC4	GCGCGGATAATTTAAATTTCTCATA				
FtpdpD2F	TGGGTTATTCAATGGCTCAG	136/ 285 pz	<i>pdpD</i>	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i> (136 pz) <i>F. tularensis</i> ssp. <i>novicida</i> (285 pz)	(9)
FtpdpD2R	TCTTGCACAGCTCCAAGAGT				
S5	GCCCATTTGAGGGGGATAACC	1200 pz	16S rRNA	<i>F. tularensis</i>	(10)
S6	GGAATAAGAGTACCTTTTGTGAGT				
PA-1F	CCAGACCGTGACAATGATG	508 pz	<i>pagA</i>	<i>B. anthracis</i>	(11)
PA-1R	CAAGTCTTTCCCTGCTA				
CAPB-F	CTGACCAATCTAAGCCTGC	221 pz	<i>capB</i>		
CAPB-R	TCGTTTCTCCAATCGCAAT				
IS6501	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	498 pz 731 pz 285 pz 976 pz	IS711	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. suis</i> <i>B. ovis</i>	(7)
BA	GACGAACGGAATTTTCCAATCCC				
BM	AAATCGCGTCTTGCTGGTCTGA				
BS	GCGCGGTTTTCTGAAGGTTGAGG				
BO	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG				
Real-time PCR					
Bfor	TCGTCGGGCAGCACCGGC	-	<i>fliC</i>	<i>B. mallei</i> <i>B. pseudomallei</i>	(3)
Brev	CAACCATCGCCGTGGCGTT				
Btaq	FAM-TTGCCGAAGTCGACAGCGCCAGCGT-TAMRA				
fliP-f	CCCATTGGCCCTATCGAAG	-	<i>fliP</i>	<i>B. mallei</i>	(4)
fliP-r	GCCCGACGAGCACCTGATT				
fliP	FAM-CAGGTCAACGAGCTTACGCGGATC-TAMRA				
YP16 F	GAATTTGGCAGAGATGCTAAAG		-		
YP16 B	GGCAGTCTCCCTGAGT				
YP16 TM	FAM-ACTGTGAGACAGGTGCATGGCTG-TAMRA				
YPpla S	GTAATAGGTTATAACCAGCGCTT	-	<i>pla</i>		
YPpla R	AGACTTTGGCATTAGGTGTG				
YPpla TM	FAM-ATGCCATATATTGGACTTGCAGGCCAGT-TAMRA				
YPcaf S	TACGGTTACGGTTACAGCAT	-	<i>caf1</i>		
YPcaf A	GGTGATCCCATGTAATAACA				
YPcaf1 TM	FAM-ACCTGCTGCAAGTTACCGCCTTGG-TAMRA				
YopT U	GATCAGGAGGCCATGCACAA	-	<i>yopT</i>		
YopT B	ACATTTGGCCTGAGAGATGTA				
YopT TM	FAM-ACGACGGAATCAGAAGGGCTGGATC-TAMRA				
YPtox U	AGGACCTAATATGGAGCATGAC	-	<i>ymt</i>		
YPtox R	CTAACAAAGCCTCAATAATCCA				
YPtox TM	FAM-TCCAAGCACTCACGAGATCTTGCTAA-TAMRA				

laboratoriach była zawsze przeprowadzana przy użyciu technik biologii molekularnej. Każde z laboratoriów stosowało PCR lub real-time PCR. Ponadto, sześć laboratoriów (30%) posłużyło się metodą MALIDITOF, pięć laboratoriów (25%) wykonywało sekwencjonowanie DNA w celu identyfikacji drobnoustroju oraz pięć labo-

ratoriów (25%) zastosowało testy immunoenzymatyczne. Znaczna część laboratoriów korzystała w procesie wykrywania i identyfikacji z komercyjnie dostępnych testów, jak np. gotowe zestawy do wykrywania DNA poszukiwanych patogenów metodą real-time PCR firm Roche, AppliedBiosystems, TIBMOlBiol, czy

testy immunologiczne firm Tetracore, New Horizons Diagnostics, Dräger. Dwa laboratoria (10%), pomimo przyjęcia próbek zawierających żywe patogeny, nie przeprowadziły hodowli.

Pomimo stosowania różnych technik oraz metod wykrywania i identyfikacji w próbkach wysoce niebezpiecznych patogenów bakteryjnych ostateczne wyniki uzyskane przez różne laboratoria były podobne, co pokazuje, że nawet przy ograniczonym dostępie do wysoce nowoczesnych technik biologii molekularnej poprawna identyfikacja patogenów stanowiących przedmiot badań jest możliwa, ale wydłużeniu ulega czas potrzebny do ukończenia badań. Stosowanie zaawansowanej technologicznie aparatury pozwala na szybkie uzyskanie wyniku, co może być kluczowe dla życia ludzkiego, zwłaszcza przy narażeniu człowieka na kontakt z etiologicznymi czynnikami dżumy, wągłika i tularemii. Co więcej, szybka identyfikacja czynnika etiologicznego ma również wpływ na podjęcie natychmiastowego właściwego leczenia osób zakażonych, jak też na ograniczenie kosztów wynikających z działań podejmowanych przez odpowiednie służby w celu ograniczenia narażenia ludzi na czynniki ryzyka. Dlatego, z punktu widzenia troski o zdrowie publiczne, a także ze względów ekonomicznych, uzasadnione jest tworzenie i finansowanie aktywności krajowych laboratoriów referencyjnych, dysponujących kompetentnym personelem i nowoczesnymi metodami szybkiego wykrywania niebezpiecznych patogenów.

## PODSUMOWANIE

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny jako jedyny w Polsce instytut uczestniczył w międzynarodowych sprawdzianach w wykrywaniu i identyfikacji wysoce patogennych bakterii organizowanych w ramach projektu EQADeBa. Wyniki sprawdzianu potwierdziły kompetencje jednostki w zakresie wykrywania i identyfikacji etiologicznych czynników dżumy, wągłika, tularemii, brucelozy, nosacizny i melioidozy, które stanowią szczególne zagrożenie dla społeczeństwa, zwłaszcza w sytuacji ich celowego użycia jako broni biologicznej.

Wyniki sprawdzianu pokazały, że konieczne jest zastosowanie bardziej czułych metod wykrywania drobnoustrojów z rodzaju *Brucella* sp. i *Bulkholderia* sp. Niezbędne jest też zwiększenie dostępności do nowoczesnych urządzeń i metod biologii molekularnej, które pozwolą na znaczne skrócenie czasu potrzebnego do uzyskania wyniku badania.

## PIŚMIENNICTWO

1. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd ed., Genewa 2004.
2. Gierczyński R, Kałużewski S, Rakin A, i in. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland – the molecular echoes of the past outbreaks. FEMS Microbiol Lett 2004; 239: 235-240
3. Tomaso H, Scholz HC, Al Dahouk S, i in. Development of 5' nuclease real-time assays for rapid identification of the *Bulkholderia mallei/pseudomallei* complex. Diagn Mol Pathol 2004; 13: 247-253.
4. Tomaso H, Scholz HC, Al Dahouk S, i in. Development of a 5' nuclease real-time assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Bulkholderia mallei* in clinical samples. Clin Chem 2006; 52: 307-310.
5. Riehm JM, Rahalison L, Scholz HC, i in. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. Mol Cell Probes 2011; 25: 8-12.
6. Zhou D, Han Y, Dai E, i in. Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis*. Microbiol Immunol 2004; 48: 263-269.
7. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2660-2666.
8. Johansson A, Ibrahim A, Gorangsson I, i in. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 4180-4185.
9. Tomaso H, Scholz HC, Naubauer H, i in. Real-time PCR using hybridization probes for rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. Mol Cell Probes 2007; 21: 12-16.
10. Barns SM, Grow CC, Okinaka RT, i in. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 5494-5500.
11. Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM, i in. PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 1224-1229.
12. Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. Microb Mol Biol Rev 2009; 73: 684-711.
13. Versage JL, Severin DDM., Chu MC, i in. Development of multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol 2003; 41: 5492-5499.
14. Jacob D, Sauer U, Grunow R. European Wide External Quality Assurance Exercises for Detection of High Threat Bacteria. Oral presentation and abstract. Biological Weapons Convention, Meeting of Experts, Geneva, Switzerland, 24-28 August 2009.
15. Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ioni-

zation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. BMC Microbiol 2010; 10: 285.

16. Lasch P, Beyer W, Nattermann H, Stämmler M, Siegbrecht E, Grunow R, Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. Appl Environ Microbiol 2009; 75: 7229-7242.

Otrzymano: 30.05.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 15.06.2011 r.

**Adres do korespondencji:**

Dr Aleksandra A. Zasada  
Zakład Bakteriologii Narodowy Instytut  
Zdrowia Publicznego  
Państwowy Zakład Higieny  
ul. Chocimska 24  
00-791 Warszawa  
Tel. 22 5421269  
e-mail: azasada@pzh.gov.pl