

*Sylwia Budniak, Agnieszka Kędrak-Jabłońska, Monika Reksa, Anna Szczawińska, Marek Krupa

Zastosowanie metody Real-time PCR opartej na wykorzystaniu nukleolitycznych sond typu TaqMan do wykrywania markera wirulencji *Bacillus anthracis* – genu *pag* oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej *rpoB*

Application of the Real-time PCR method with TaqMan probes for the detection of *Bacillus anthracis* virulence marker – gene *pag* and specific chromosomal sequence *rpoB*

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. Krzysztof Szulowski

Streszczenie

Przedmiotem pracy było zastosowanie metody Real-time PCR opartej na wykorzystaniu nukleolitycznych sond typu TaqMan do wykrywania markera wirulencji *Bacillus anthracis* – genu *pag* oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej *rpoB*. Opracowano również reakcję multiplex Real-time PCR pozwalającą na równoczesną amplifikację i wykrywanie wymienionego genu oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej.

Badania przeprowadzono z użyciem jednego szczepu szczepionkowego i czterech szczepów terenowych laseczki wąglika. Przy ocenie swoistości testów wykorzystano izolaty różnych gatunków rodzaju *Bacillus* oraz szczepy sześciu innych gatunków drobnoustrojów. Do badań użyto zestaw do PCR QuantiTect (Qiagen) oraz startery swoiste dla genu *pag* kodującego białko PA i startery do amplifikacji fragmentu specyficznego dla sekwencji chromosomalnej.

Reakcja PCR pozwoliła na wykrycie badanych genów na podstawie obserwacji krzywej amplifikacji. Czulość i liniowość reakcji określono korzystając ze współczynnika regresji. Wykazano wysoki współczynnik regresji wynoszący 0,99 dla wszystkich reakcji.

Testy Real-time charakteryzowały się wysoką czulością i specyficznością.

Słowa kluczowe: *Bacillus anthracis*, Real-time PCR, sondy TaqMan

Summary

The aim of the study was to apply the real-time PCR with TaqMan probes for the detection of *Bacillus anthracis* virulence marker – gene *pag* and specific chromosomal sequence *rpoB*. The multiplex Real-Time PCR was also elaborated, which allows simultaneous amplification and detection of this gene and the specific chromosomal sequence.

The research was conducted on one vaccinal and four field strains of *Bacillus anthracis*. The assessment of the specificity of the tests involved isolates of other species of the genus *Bacillus* as well as strains of six other species of microorganisms. The studies were conducted with the PCR QuantiTect kit (Qiagen) and primers specific for the gene *pag* coding PA protein and primers for the amplification of the specific chromosomal sequence.

PCR enabled the detection of genes under examination by the observation of amplification curves. The sensitivity and linearity of the reactions were determined using a regression coefficient. A high regression coefficient of 0.99 was demonstrated for all the reactions.

The Real-time tests were highly sensitive and specific.

Key words: *Bacillus anthracis*, real-time PCR, TaqMan probes

WSTĘP

Bacillus anthracis jest Gram-dodatnią laseczką wytwarzającą w środowisku zewnętrznym, przy dostępie tlenu, przetrwalniki. Endospory są bardzo odporne na

niesprzyjające warunki środowiska i są w stanie przetrwać w glebie nawet kilkadziesiąt lat (1). *B. anthracis* wywołuje zakaźną chorobę zwaną wąglikiem. Szczególnie wrażliwe na zachorowanie są zwierzęta roślini-

nożerne, rzadziej występuje u wszystkożernych, mięsożernych oraz u ludzi. U człowieka, w zależności od drogi zakażenia wąglik może przebiegać w trzech postaciach: skórnej, związanej z uszkodzeniem i zakażeniem skóry, płucnej w wyniku wdychania przetrwalników wąglików oraz jelitowej wskutek spożycia zakażonej żywności lub wody (2, 3, 4, 5).

Obecnie w Europie notuje się corocznie sporadyczne przypadki wąglików. Jednak za celowością badań nad tym drobnoustrojem przemawia możliwość niekontrolowanego importu surowców i produktów pochodzenia zwierzęcego z terenów, gdzie wąglik występuje nadal enzoootycznie, jak na przykład w niektórych krajach Azji, Afryki, Ameryki Północnej, byłego Związku Radzieckiego (Kazachstan, Tadżykistan) (5, 6, 7). Wskazuje na to również wymienianie laseczki wąglików na pierwszym miejscu w wykazie czynników broni biologicznej i coraz bardziej niepokojąco sygnalizowany bioterroryzm. Głośne przypadki wykorzystania laseczek wąglików miały miejsce w 2001 roku w Stanach Zjednoczonych, gdzie bakterie zostały rozesłane w przesyłkach pocztowych adresowanych do ważnych instytucji państwowych (8).

Jedną z metod identyfikacji *B. anthracis* jest badanie hodowlane. Rutynowa diagnostyka laboratoryjna jest jednak czasochłonna. Opiera się ona na ocenie morfologii kolonii, właściwościach fizjologicznych oraz biochemicznych.

B. anthracis jest blisko spokrewniony z kilkoma gatunkami laseczek występującymi w środowisku, takimi jak *B. cereus*, *B. mycoides* i *B. thuringiensis* (9, 10). Duże podobieństwo genetyczne tych gatunków, może stwarzać problemy przy identyfikacji z użyciem konwencjonalnych metod diagnostycznych (11, 12, 13).

Coraz szersze zastosowanie w rozpoznawaniu laseczek *B. anthracis* mają metody oparte o amplifikację wybranych fragmentów DNA (14). Dzięki swoistym starterom możliwe jest wykrycie genów *B. anthracis* zlokalizowanych w DNA plazmidu pXO1 (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) oraz pXO2 (20, 22, 23). Stwierdzenie u *B. anthracis* obecności wspomnianych plazmidów świadczy o wirulencji badanego szczepu, co ma wartość diagnostyczną (10, 24, 25).

Stosowane w laboratoriach konwencjonalne testy PCR oraz Real-time PCR stanowią wartościowe narzędzie diagnostyczne (1, 26, 27). Zastosowanie Real-time PCR przynosi rozwiązanie większości problemów istniejących w klasycznej metodzie PCR. Technika ta skraca czas oczekiwania na wynik, zmniejsza ryzyko kontaminacji próbki ze względu na brak obróbki po amplifikacji oraz pozwala na zwiększenie czułości i skuteczności metody (10).

Celem prezentowanych badań było zastosowanie metody Real-time PCR, opartej na wykorzystaniu sond nukleolitycznych TaqMan, do wykrywania genu zlokalizowanego w DNA plazmidu pXO1 (gen *pag*) oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej *rpoB* szczepów *B. anthracis* (10, 28). W badaniach wykorzystano również reakcję multiplex Real-time PCR pozwalającą

na równoczesną amplifikację i wykrywanie genu *pag* oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Badania przeprowadzono przy użyciu szczepionkowego szczepu *B. anthracis* (BS4). Do oceny swoistości testów wykorzystano cztery szczepy terenowe (B.a.1/47, B.a.3/47, B.a.15/93, B.a.16/96), izolaty innych gatunków rodzaju *Bacillus*, tj. 2 szczepy *B. cereus*: *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* 1470 oraz po jednym szczepie *B. brevis* 1114, *B. subtilis* ATCC 6633 i *B. megaterium* 1534. Dodatkowo do doświadczenia włączono szczepy innych gatunków drobnoustrojów: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pasteurella multocida* M1404, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Wszystkie szczepy *B. anthracis* użyte do badań pochodziły z kolekcji drobnoustrojów Zakładu Mikrobiologii PIWet-PIB. Z kolekcji tej otrzymano również szczepy referencyjne innych gatunków bakterii. Natomiast szczep *P. multocida* M1404 pochodził z National Animal Disease Centre, Ames, Iowa, USA.

Izolacja DNA. Każdy szczep posiewano na 1 ml podłoża TSB (bioMérieux). Posiewy inkubowano 18 godz. w temp. 37°C. Hodowlę bakteryjną wirowano przez 10 min. przy 7500 obr./min. Supernatant usuwano a osad używano do izolacji DNA przy użyciu zestawu Genomic Mini (zestaw do izolacji DNA z bakterii, hodowli komórkowych i tkanek stałych) firmy A&A Biotechnology, Gdynia, Polska. Osad z każdej próbki zawieszano w 100 µl buforu Tris. Próbkę poddawano wstępnej inkubacji z dodatkiem 10 µl mutanolizyny (Sigma) – 1 mg/ml przez 10 min. w temp. 37°C. Dalej postępowano wg protokołu podanego przez producenta.

Koncentrację otrzymanego DNA określano spektrofotometrycznie przy użyciu GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, GE Healthcare – Amersham Biosciences.

Startery i sondy. W oparciu o dane z piśmiennictwa wybrano sekwencje starterów i sond do amplifikacji (10). Charakterystykę starterów i sond nukleolitycznych TaqMan do reakcji przedstawiono w tabelach 1 i 2. Zostały one zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA IBB PAN.

Tabela 1. Charakterystyka starterów użytych do Real-time PCR.

| Startery | | Sekwencja | Wielkość produktu | Koncentracja |
|------------------|--------|-------------------------------|-------------------|--------------|
| <i>rpoB</i> gene | rpoB-S | CCACCAACAGTA-GAAAATGCC | 175 pz | 0,3 µM |
| | rpoB-R | AAATTCACCA-GTTTCTGGATCT | | |
| <i>pag</i> | PA-S | CGGATCAAG-TATATGG-GAATATAGCAA | 204 pz | 0,3 µM |
| | PA-R | CCGGTT-TAGTCGTTTCTA-ATGGAT | | |

Tabela 2. Charakterystyka sond nukleolitycznych użytych do Real-time PCR.

| Sondy TaqMan | | Sekwencja | Koncentracja |
|------------------|---------|---|--------------|
| <i>rpoB</i> gene | rpoB-TM | 5'-FAM-ACTTGTGTCTCGTT-TCTTCGATCCAAAGCG-TAMRA-3' | 0,4 μ M |
| <i>pag</i> | PA-TM | 5'-FAM-CTCGAACTGGAGTG-AAGTGTACCGCAAAT-TAMRA-3' | 0,4 μ M |
| | PA-BHQ | 5'-HEX-CTCGAACTGGAGTG-AAGTGTACCGCAAAT-BHQ-3' | 0,4 μ M |

Real-time PCR. Reakcję prowadzono w probówkach optycznych MicroAmp Optical Tube zamykanych wieczkami optycznymi Optical Caps (Applied Biosystems). W badaniach wykorzystano zestaw QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen). Zestaw ten stanowi mieszanina polimerazy HotStarTaq, buforu QuantiTect Probe PCR, dNTP, 8 mM MgCl₂ oraz barwnika referencyjnego ROX, gotowa do użycia po dwukrotnym rozcieńczeniu w wodzie.

Reakcję Real-time PCR z użyciem primerów rpo-S i rpo-R, w celu wykrycia obecności sekwencji chromosomalnej *rpoB*, wykonano w 25 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 500 ng DNA, 1,0 μ M każdego primera oraz 0,4 μ M sondy TaqMan znakowanej barwnikami fluorescencyjnymi FAM (reporter) i TAMRA (akceptor).

Amplifikację z zastosowaniem starterów PA-S i PA-R przeprowadzono w objętości 25 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 500 ng DNA, 0,3 μ M każdego primera oraz 0,4 μ M sondy TaqMan znakowanej barwnikami fluorescencyjnymi FAM (reporter) i TAMRA (akceptor) oraz HEX (reporter) i BHQ (akceptor).

Zakres czułości i liniowości reakcji oznaczono podając amplifikacji szereg 10-krotnych rozcieńczeń DNA uzyskanego ze szczepu BS4 o koncentracji wyjściowej 500 ng/reakcję.

Reakcje Real-time PCR prowadzono w aparacie Mx3005P[®] (Stratagene) z oprogramowaniem MxPro – Mx3005P v3.20. Reakcja obejmowała 45 cykli denaturacji i hybrydyzacji/wydłużania starterów (94°C/15 sek., 60°C/1 min), poprzedzonych 15 min inkubacją w 95°C. Pomiar fluorescencji prowadzony był w każdym cyklu PCR na etapie hybrydyzacji/wydłużania starterów.

WYNIKI

Spektrofotometrycznie określano koncentrację matrycowego DNA, która wynosiła około 100 ng/ μ l.

W pierwszym etapie pracy wykonywano test PCR na obecność sekwencji chromosomalnej *rpoB*. Wyniki określano poprzez wartość Ct (threshold cycle), to jest numer kolejny cyklu PCR, w którym poziom fluorescencji emitowanej z próbki przekroczył wartość tła. Rycina 1a przedstawia krzywą amplifikacji reakcji przeprowadzonej ze starterami rpoB-S i rpoB-R oraz sondą rpoB-TM. Uzyskane wartości Ct wahały się w granicach 17,55 do 37,20. Czulość reakcji Real-time PCR, wyrażoną jako ilość wykrywanego DNA na przeprowadzoną reakcję, określono na poziomie 50 fg/reakcję. Liniowość reakcji określono korzystając z współczynnika regresji. Reakcję uznawano za liniową przy $R^2 \geq 0,980$ (29). Dla amplifikacji rozcieńczeń matrycy zawierających od 500 ng do 50 fg DNA wykazano wysoki współczynnik regresji wynoszący 0,997 (ryc. 1b).

Obecność badanego genu *pag* zlokalizowanego w DNA plazmidu pXO1 stwierdzono na podstawie obserwacji krzywych amplifikacji w reakcji polimerazy łańcuchowej z zastosowaniem starterów PA-S i PA-R oraz dwóch sond PA-TM i PA-BHQ. Uzyskane wartości Ct wahały się w granicach 17,98-40,76 dla sondy PA-TM. Czulość reakcji określono na poziomie 50 fg/reakcję (ryc. 2a). Współczynnik regresji ($R^2 = 0,999$) wskazuje na wysoki stopień liniowości reakcji (ryc. 2b). W przypadku zastosowania sondy PA-BHQ uzyskano porównywalne wartości Ct od 18,84 do 40,45 (ryc. 3a). Czulość reakcji określono na poziomie 50 fg/reakcję. Wykazano wysoki współczynnik regresji wynoszący 0,996 (ryc. 3b).

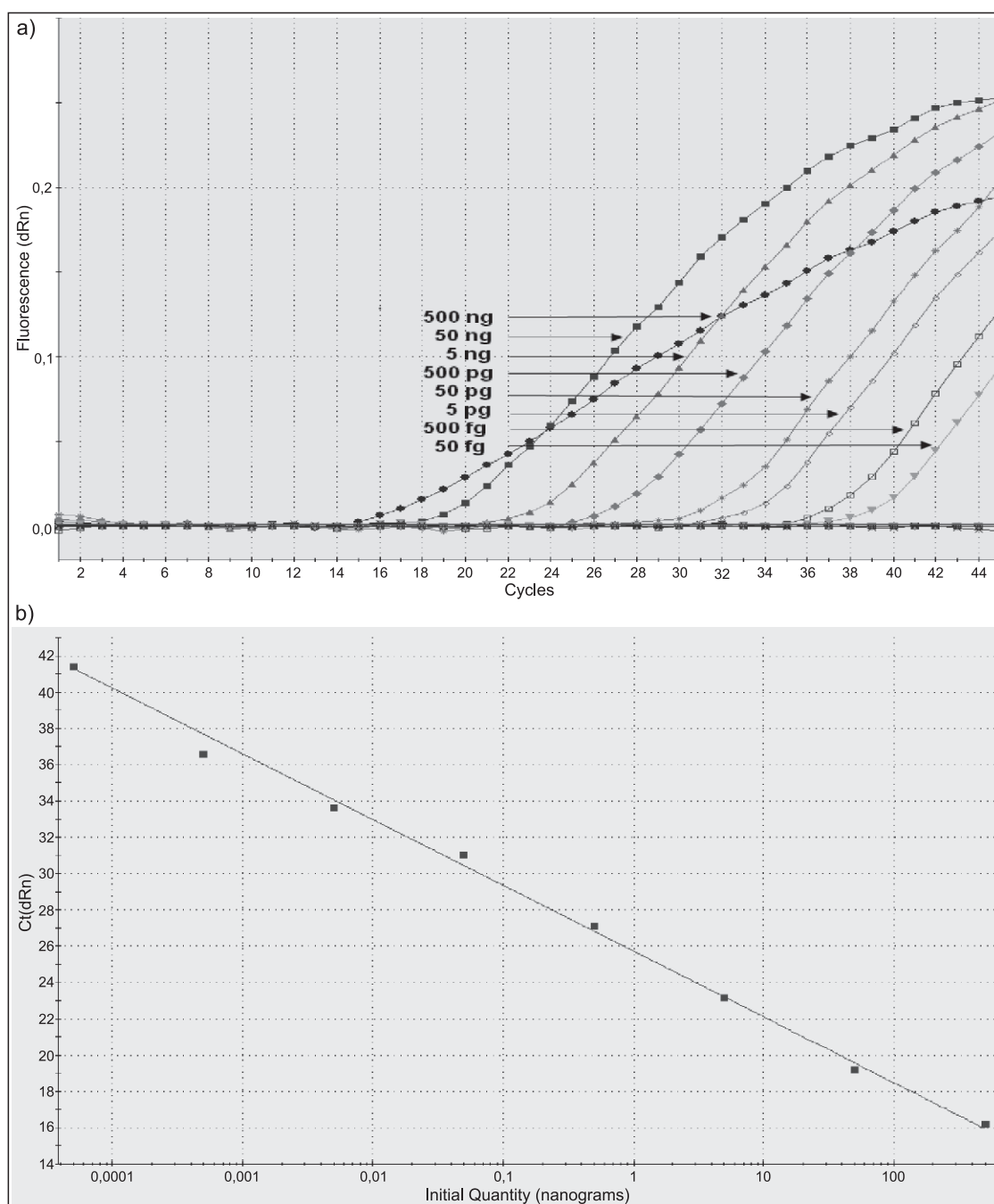
W przypadku reakcji multiplex Real-time PCR pozwalającej na równoczesną amplifikację i wykrywanie genu *pag* oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej *rpoB* uzyskano wartości Ct wynoszące 15,52-39,13 dla genu *pag* oraz od 15,58 do 39,85 dla genu *rpoB* (ryc. 4a). Wykazano, że czulość wynosiła 50 fg/reakcję. Współczynnik regresji wynosił 0,999 (ryc. 4b).

W celu wykazania specyficzności reakcji Real-time PCR poddano badaniu tą metodą materiał genetyczny uzyskany ze szczepu *B. anthracis* BS4, 4 szczepów terenowych *B. anthracis*, szczepów różnych gatunków rodzaju *Bacillus* oraz DNA innych gatunków drobnoustrojów: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pasteurella multocida* M 1404, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Wymienione gatunki mogą powodować stany chorobowe, w tym procesy o charakterze posocznicowym. W tabeli 3 przedstawiono zestawienie wyników specyficzności reakcji PCR.

Ocena specyficzności testu pozwalająca na stwierdzenie obecności sekwencji chromosomalnej *rpoB* wykazała, że w teście PCR uzyskano produkty specyficzne dla *B. anthracis*. Również w przypadku zastosowania zestawów starterów swoistych dla genu *pag* z zastosowaniem sondy PA-TM i PA-BHQ oraz w przypadku reakcji multiplex wykazano dużą specyficzność reakcji. Uzyskano produkty specyficzne dla *B. anthracis*. U izolatów różnych gatunków rodzaju *Bacillus* oraz szczepów sześciu innych drobnoustrojów nie stwierdzono obecności produktów reakcji PCR.

OMÓWIENIE

Metoda Real-time PCR umożliwia jednoczesne powielanie i wykrywanie charakterystycznych sekwencji DNA. Produkty wykrywane są fluorescencyjnie z zastosowaniem substancji, które emitują światło o określonej długości po związaniu z dwuniciowym DNA, jak SYBR Green I. Technika wykorzystująca barwniki interkalujące jest prosta i mało kosztowna, jednak po-



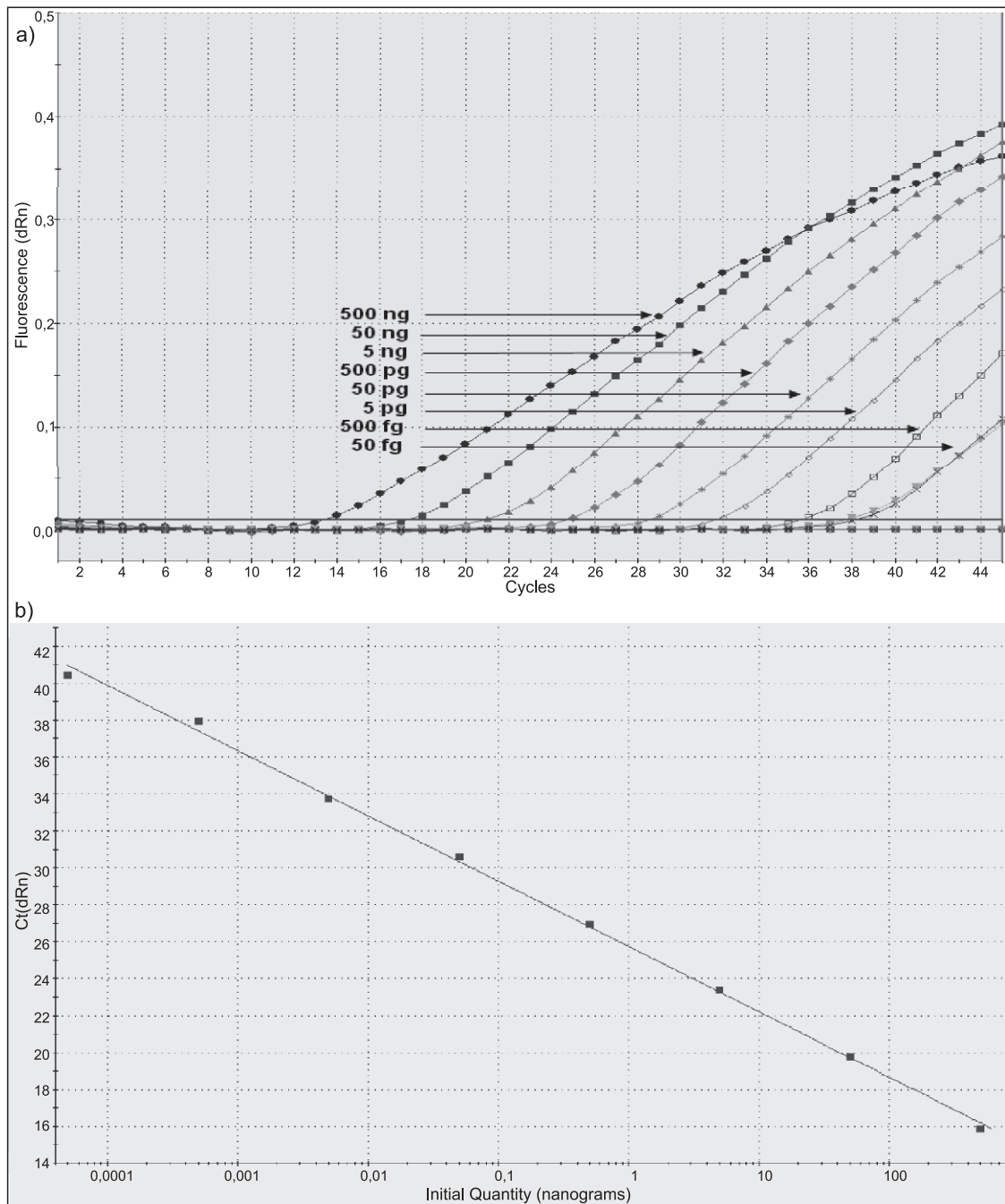
Ryc. 1. Reakcja Real-time PCR z zastosowaniem starterów rpoB-S i rpoB-R oraz sondy rpo-TM.

a) Krzywe wzrostu fluorescencji w poddanych amplifikacji próbkach rozcieńczeń dziesiętnych DNA ze szczepu BS4.

b) Krzywa standardowa skonstruowana na podstawie porównania wartości Ct i ilości DNA w poszczególnych próbkach.

datna na błędy ze względu na to, że barwnik SYBR Green I wiąże się również z nieswoistymi produktami reakcji PCR. Problem specyficzności fluorescencyjnej detekcji amplikonu został rozwiązany dzięki zastosowaniu sond znakowanych. Sondy nukleolityczne TaqMan są oligonukleotydami, które na końcu 5' mają fluorescencyjny znacznik (reporter), a na końcu 3' wygaszacz (quencher). Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez Taq polimerazę, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powodu-

je fluorescencję, której natężenie mierzone jest w każdym cyklu reakcji (27, 30, 31). Tak więc reakcja z sondami typu TaqMan, jest bardziej swoista niż wariant detekcji z niespecyficznym fluorochromem SYBR Green I. Wykorzystanie znakowanych fluorescencyjnie sond wpłynęło na zwiększenie czułości i specyficzności metody (27, 32). W przeprowadzonych wcześniej pracach własnych przy użyciu barwnika SYBR Green I czułość reakcji określono na poziomie 500 fg/reakcję z zastosowaniem starterów rpoB-S i rpoB-R, a 5 pg/reakcję w przypadku



Ryc. 2. Reakcja Real-time PCR z zastosowaniem starterów PA-S i PA-R oraz sondy PA-TM.

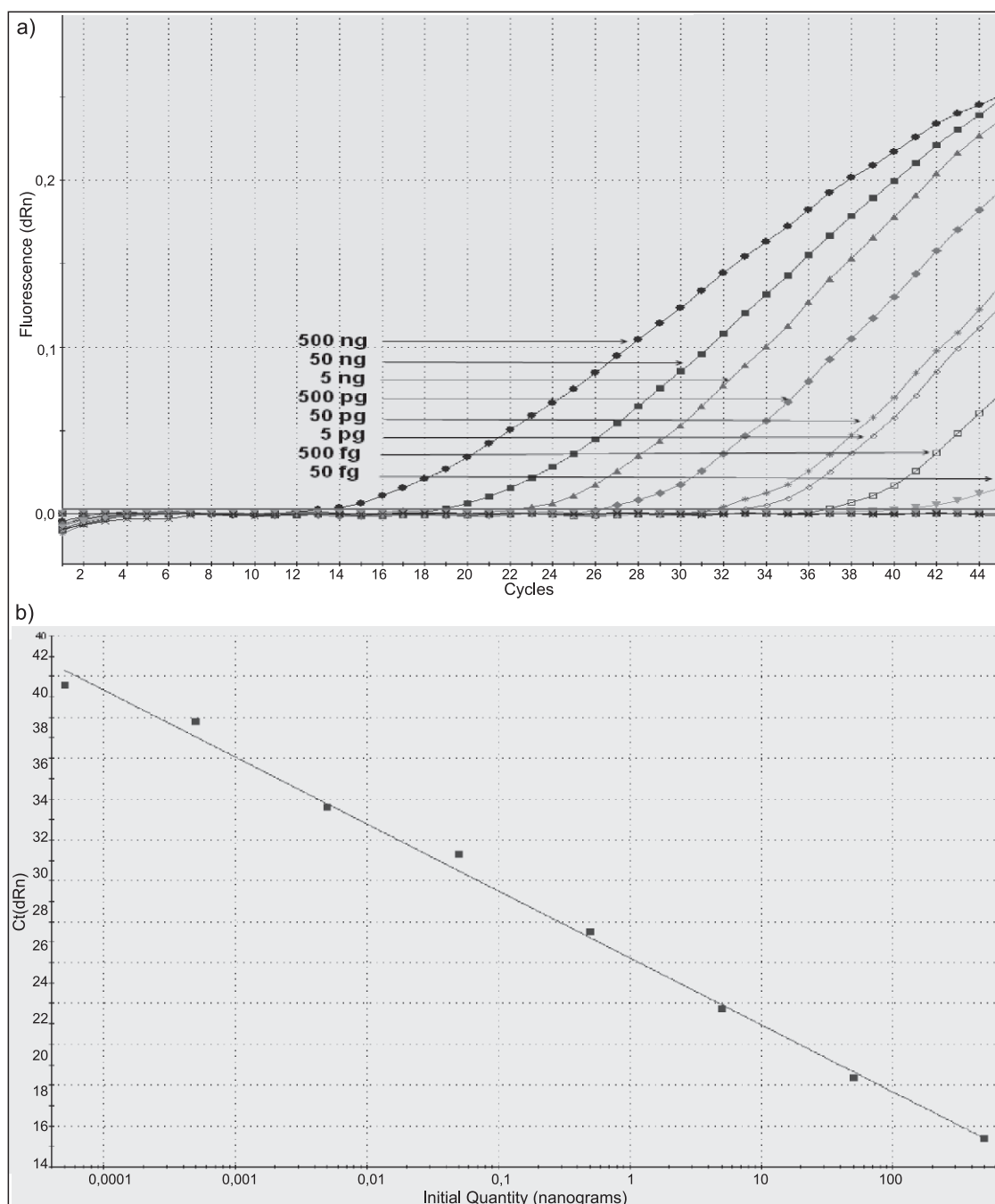
a) Krzywe wzrostu fluorescencji w poddanych amplifikacji próbkach rozcieńczeń dziesiętnych DNA ze szczepu BS4.

b) Krzywa standardowa skonstruowana na podstawie porównania wartości Ct i ilości DNA w poszczególnych próbkach.

starterów PA-S i PA-R (33). W przeprowadzonych badaniach zastosowanie sond zwiększyło czułość reakcji do 50 fg w przypadku wykrywania genu *pag* oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej. Uzyskane wyniki są zbliżone do czułości określonej przez Bode i wsp. (9) w reakcji Real-time PCR z wykorzystaniem specyficznej sekwencji chromosomalnej oraz Hurtle i wsp. (34), którzy zastosowali gen *gyrA* jako potencjalny marker chromosomalny. W kolejnym etapie badań stwierdzono, że w przypadku reakcji multiplex, która umożliwiła amplifikację

więcej niż jednego fragmentu DNA w jednej reakcji, czułość metody była porównywalna jak w przypadku amplifikacji pojedynczego genu.

Tak jak w badaniach przeprowadzonych przez Ellerbrokiwsp. (10), w pracy własnej w przypadku zastosowania starterów swoistych dla genu *pag* oraz sondy PA-TM i PA-BHQ wykazano 100% specyficzność reakcji. W przeprowadzonych badaniach również w przypadku sekwencji chromosomalnej *rpoB* stwierdzono dużą specyficzność reakcji. U badanych szczepów



Ryc. 3. Reakcja Real-time PCR z zastosowaniem starterów PA-S i PA-R oraz sondy PA-BHQ.

a) Krzywe wzrostu fluorescencji w poddanych amplifikacji próbkach rozcieńczeń dziesiętnych DNA ze szczepu BS4.

b) Krzywa standardowa skonstruowana na podstawie porównania wartości Ct i ilości DNA w poszczególnych próbkach.

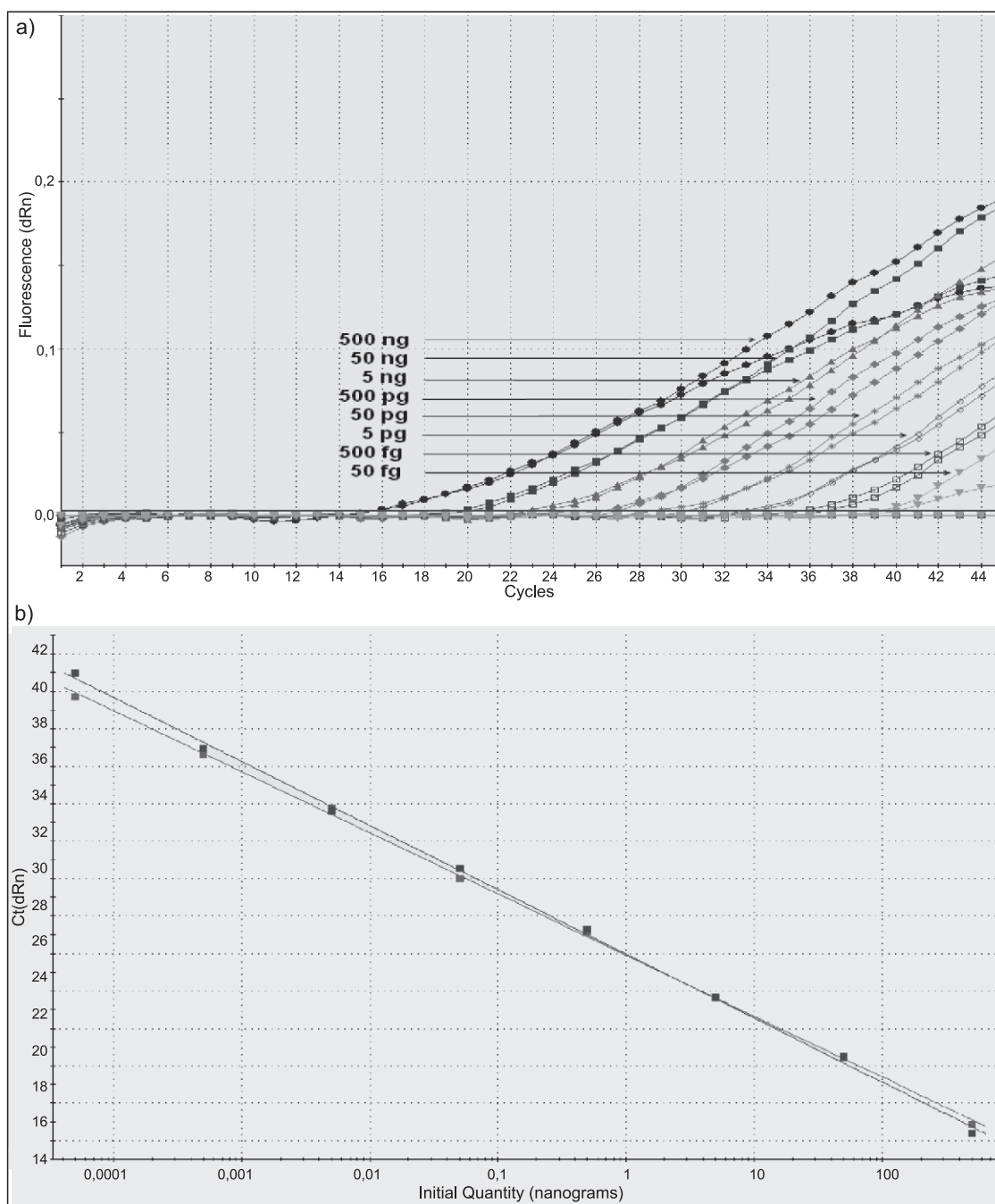
B. cereus nie wykazano obecności sekwencji chromosomalnej *rpoB*, którą stwierdzono w uprzednio przeprowadzonych badaniach własnych z zastosowaniem barwnika SYBR Green I (32). W przeprowadzonej reakcji multiplex u izolatów różnych gatunków rodzaju *Bacillus* oraz szczepów sześciu innych drobnoustrojów także nie stwierdzono obecności produktów reakcji PCR.

Przedstawiona metoda Real-time PCR pozwala na ocenę ilości produktu w trakcie trwania reakcji PCR, skraca czas identyfikacji oraz ogranicza

do minimum ryzyko zanieczyszczenia próbek (29, 35). Wykorzystanie sond typu TaqMan wiąże się z większymi kosztami, lecz nie wymaga dodatkowej analizy krzywych topnienia produktu jako elementu gwarantującego specyficzność reakcji koniecznej w przypadku zastosowania barwnika SYBR Green I (17).

WNIOSKI

Reasumując, zastosowanie metody Real-time PCR opartej na wykorzystaniu nukleolitycznych



Ryc. 4. Reakcja multiplex Real-time PCR z zastosowaniem starterów: rpoB-S, rpoB-R i PA-S, PA-R oraz sond TaqMan: rpoB-TM i PA-BHQ.

a) Krzywe wzrostu fluorescencji w poddanych amplifikacji próbkach rozcieńczeń dziesiętnych DNA ze szczepu BS4.

b) Krzywa standardowa skonstruowana na podstawie porównania wartości Ct i ilości DNA w poszczególnych próbkach.

sond typu TaqMan do wykrywania markera wirulencji *Bacillus anthracis* – genu *pag* oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej *rpoB* pozwala na wykrycie badanych genów na podstawie obserwacji krzywych amplifikacji. Zastosowanie sond TaqMan

umożliwia również przeprowadzenie reakcji multiplex Real-time PCR, co dodatkowo pozwala na skrócenie czasu identyfikacji. Wykazano, że testy Real-time PCR charakteryzują się wysoką czułością i specyficnością.

Tabela 3. Ocena specyficzności reakcji Real-time z zastosowaniem starterów *pag*, *rpoB* oraz sond TaqMan PA-TM, PA-BHQ i *rpoB* – TM.

| Szczepy | PA | | <i>rpoB</i> | <i>rpoB</i> , PA-TM |
|--|-------|--------|-----------------|-------------------------|
| | PA-TM | PA-BHQ | <i>rpoB</i> -TM | <i>rpoB</i> -TM, PA-BHQ |
| <i>Bacillus anthracis</i> BS4 | + | + | + | + |
| <i>Bacillus anthracis</i> B.a.1/47 | + | + | + | + |
| <i>Bacillus anthracis</i> B.a. 3/47 | + | + | + | + |
| <i>Bacillus anthracis</i> B.a. 15/93 | + | + | + | + |
| <i>Bacillus anthracis</i> B.a. 16/96 | + | + | + | + |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | - | - | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i> 1470 | - | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | - | - | - | - |
| <i>Bacillus brevis</i> 1114 | - | - | - | - |
| <i>Bacillus megaterium</i> 1534 | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | - | - | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 | - | - | - | - |
| <i>Pasteurella multocida</i> M1404 | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | - | - | - | - |
| <i>Salmonella thphimurium</i> ATCC 14028 | - | - | - | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 | - | - | - | - |

+ wynik dodatni

- wynik ujemny

PIŚMIENNICTWO

- Kohler TM, Dai Z, Kaufman-Yarbray M: Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J Bacteriol* 1994; 176, 586-595.
- Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanne PC: Antrax. *N Engl J Med* 1999; 341, 815-826.
- Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM et al.: Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA* 1997; 278, 399-411.
- Sohni Y, Kanjilal S, Kapur V: Performance evaluation of fine commercial Real-time PCR reagent systems Rusing TaqMan assays for *Bacillus anthracis* detection. *Clin Biochem* 2008; 41, 640-644.
- Turnbull P: Antrax in Humans and Animals. WHO, Genewa 2008.
- Charakasskiy BC: A national register of historic and contemporary anthrax foci. *J Appl Microbiol* 1999; 87, 192-195.
- Fellows PF: A survey of world wide strains of *Bacillus anthracis*. *Salisbury Med Bulletin, Special Suppl.* 1996; 87, 31-33.
- Zieliński KW, Brocki M, Janiak MK, Wiśniewski A: Patologia wąglika. [W:] Patologia obrażeń i schorzeń wywołanych współczesną bronią w działaniach wojennych i terrorystycznych. Wyd. MON, Warszawa 2010; 353-377.
- Bode E, Hurtle W, Norwood D: Real-Time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42, 5825-5831.
- Ellerbrok H, Nettermann H, Özel M et al.: Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 214, 51-59.
- Helgason E, Okstad OA, Caugant DA et al.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66, 2627-2630.
- Keim P, Klevystka AM, Price LB et al.: Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol* 1999; 87, 215-217.
- Prince LB, Hugh-Jones M, Jackson PJ, Keim P: Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1999; 181, 2358-2362.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S et al.: Specific enzymatic amplification and detection of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 1992; 24, 17-27.
- Adone R, Pasquali P, La Rosa G et al.: Sequence analysis of the genes encoding for the major virulence factors of *Bacillus anthracis* vaccine strain Carbosap. *J Appl Microbiol* 2002; 93, 117-121.
- Bragg TS, Robertson DL: Nucleotide sequence of the lethal factor gene from *Bacillus anthracis*. *Gene* 1989; 81, 45-54.
- Makino S, Cheun HI, Watarai M et al.: Detection of anthrax spores from air by real-time PCR. *Let Appl Microbiol* 2001; 33, 237-240.
- Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM: Evidence for plasmid mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 1983; 39, 371-376.
- Okinaka R, Cloud K, Hampton O et al.: Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol* 1999; 181, 6509-6515.
- Turnbull PC, Hutson RA, Ward MJ et al.: *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol* 1992; 72, 21-28.
- Welkos SL: Plasmid – associated virulence factors of non-toxicogenic (pXO1) *Bacillus anthracis*. *Microb Pathog* 1991; 10, 183-198.
- Makino S, Uchida I, Terakado N et al.: Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1989; 171, 722-730.
- Uchida I, Sekizaki T, Hashimoto K, Terakado N: Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 megadalton plasmid. *J Gen Microbiol* 1985; 131, 363-367.
- Kaspar RL, Robertson DL: Purification and physical analysis of *Bacillus anthracis* plasmids pXO1 and pXO2. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149, 362-368.

25. Okinaka R, Cloud K, Hampton O et al.: Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2. *J Appl Microbiol* 1999; 87, 261-262.
26. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24, 954-962.
27. Stadejek T: Postęp w rozwoju techniki cyklicznej polimeryzacji DNA *in vitro* – Real-Time PCR. *Medycyna Wet* 2006; 62, 390-394.
28. Qi Y, Patra G, Liang X et al.: Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67, 3720-3727.
29. Stadejek T, Janicka K, Pejsak Z: Zastosowanie Real-Time PCR do wykrywania zakażeń pestivirusowych. *Medycyna Wet* 2006; 62, 165-169.
30. Clementi M.: Quantitative molecular analysis of virus Expression and replication. *J Clin Microbiol* 2000; 38, 2030-2036.
31. Sohni Y, Kanjilal S, Kapur V: Performance evaluation of fine commercial Real-time PCR reagent systems Rusing TaqMan assays for *Bacillus anthracis* detection. *Clin Biochem* 2008; 41,640-644.
32. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6, 986-994.
33. Budniak S, Kędrak-Jabłońska A, Reksa M et al.: Zastosowanie metody Real-time PCR opartej na fluorescencji barwnika SYBR Green I do wykrywania genów zlokalizowanych w DNA plazmidów pXO1 i pXO2 oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej rpoB szczepów *Bacillus anthracis*. *Med Wet* 2010; 66, 630-634.
34. Hurtle W, Bode E, Kulesh DA et al.: Detection of the *Bacillus anthracis* gyrA Gene by Using a Minor Groove Binder Probe. *J Clin Microb* 2004; 42, 179-185.
35. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245, 154-160.

otrzymano/received: 18.08.2011

zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:

*Sylvia Budniak

Zakład Mikrobiologii

Państwowy Instytut Weterynaryjny

Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

tel.: (81) 889-30-11

e-mail: sylvia.budniak@piwet.pulawy.pl