

Kamila Formińska^{1*}, Aleksandra Anna Zasada¹

¹ Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
– Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło we wrześniu 2016 r.
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Chorobotwórczość, źródła i drogi zakażenia. 3. Występowanie choroby. 4. Wewnątrzkomórkowy cykl życiowy *F. tularensis*. 5. Czynniki zjadliwości *F. tularensis*. 5.1. Otoczką. 5.2. Lipopolisacharyd (LPS). 5.3. Pili typu IV. 5.4. Regulator MglA. 5.5. *Francisella* Pathogenity Island (FPI). 5.6. Białka błony zewnętrznej. 5.7. Białka wydzielnicze i systemy sekrecji. 6. Podsumowanie

Francisella tularensis – a deceitful pathogen

Abstract: *Francisella tularensis* is an intracellular bacterial pathogen which causes a potentially lethal disease named tularemia. Some studies have been conducted to describe and identify the virulence factors of *F. tularensis*. This pathogen is able to infect a variety of cells of various hosts, including wild animals, especially rabbits, hares and rodents, and humans. This may suggest that genes of *F. tularensis* must adapt to many different intraorganismal environments. Still, little is known about the virulence of *F. tularensis*. This review focuses on the main virulence factors of *F. tularensis* which are involved in intramacrophage replication and its survival mechanisms during infection.

1. Introduction. 2. Pathogenicity and source of infection. 3. Epidemiology. 4. Intracellular life cycle. 5. Virulence factors. 5.1. Capsule. 5.2. LPS. 5.3. Type IV Pili (Tfp). 5.4. Regulator MglA. 5.5. *Francisella* Pathogenity Island (FPI). 5.6. Outer membrane proteins (OMP). 5.7. Secreted proteins and secretion systems. 6. Summary

Słowa kluczowe: *F. tularensis*, tularemia, czynniki zjadliwości

Key words: *F. tularensis*, tularemia, virulence factors

1. Wstęp

Do rodzaju *Francisella* przez wiele lat zaliczane były zaledwie trzy gatunki: *F. tularensis*, *F. philomiragia* i *F. novicida*. Jednakże w ostatnich latach opisano kolejne gatunki należące do tego rodzaju: *F. guangzhouensis*, *F. halioticida*, *F. hispaniensis*, *F. noatunensis* oraz *F. piscicida* [9, 43, 49, 68, 73]. Ponadto, *Wolbachia persica* została przeklasyfikowana jako *F. persica* [49], a *F. novicida* jako *tularensis* obejmuje obecnie cztery podgatunki: *F. tularensis* spp. *tularensis* – określany również jako Typ A, *F. tularensis* spp. *holarctica* – określany też jako Typ B, *F. tularensis* spp. *mediasiatyca* oraz *F. tularensis* spp. *novicida*, których występowanie jest ściśle związane z obszarem geograficznym [45]. Uwzględniając obszar występowania oraz strukturę genomu Typ A *F. tularensis* podzielono dalej na podtypy A.I i A.II [24, 45]. Typ A występuje głównie w Ameryce Północnej, przy czym podtyp A.I dominuje w części centralnej i wschodniej kontynentu, a podtyp A.II w zachodniej części Stanów Zjednoczonych. Typ B występuje na całym świecie, a w szczególności w Europie i Azji. *F. tularensis* spp. *mediasiatyca* wykrywana była w rejonach centralnej i środkowej Azji, natomiast *F. tularensis* spp. *novicida* jest rzadko izolowana, głównie w Ameryce Północnej, Tajlandii [51] a w ostatnim czasie także w Australii [35, 63, 67, 95].

Bakteria *F. tularensis* jest wysoce zjadliwą, tlenową, Gram-ujemną pałeczką, o wielkości 0,2–0,5 µm do 0,7–1,0 µm. Jest to wewnątrzkomórkowy patogen – po wnikięciu do organizmu gospodarza bakteria ta zostaje wchłonięta przez makrofagi i namnaża się w nich. W warunkach laboratoryjnych *F. tularensis* do wzrostu wymaga obecności cystyny bądź cysteiny w podłożu. Stwierdzono jednak występowanie szczepów atypowych, które zdolne są do wzrostu bez obecności wymienionych związków [8, 46, 50]. Pałeczki *Francisella* nie tworzą przetrwalników, są nieruchliwe – słabo katalazododatnie, oksydazoujemne o charakterystycznym komórkowym profilu kwasów tłuszczowych. Zdolne są one do wzrostu na większości komercyjnych podłoży z dodatkiem krwi, nie rosną lub rosną słabo na podłożach z agarem [50, 56]. Większość szczepów zdolna jest do tworzenia biofilmu, co ma wpływ na patogenezę [61].

Ze względu na bardzo niską dawkę infekcyjną, łatwość rozprzestrzeniania się drogą powietrzną [24] i wysoką chorobotwórczość, *F. tularensis* wymaga specjalnego nadzoru sektora zdrowia publicznego i zaliczana jest do niebezpiecznych czynników biologicznych kategorii A wg CDC [16].

W naturalnych warunkach bakterie te można izolować ze skażonej wody, siana oraz gleby, gdzie mogą bytować przez wiele tygodni w warunkach obniżonej

* Autor korespondencyjny: Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 542 12 12; e-mail: kforminska@pzh.gov.pl

temperatury [59]. Rezerwuarem tego zarazka są m.in. myszy, szczury, nornice, wiewiórki, króliki i zające.

2. Chorobotwórczość, źródła i drogi zakażenia

Bakterie *F. tularensis* wywołują tularemię – ostrą chorobę zakaźną ludzi i zwierząt zwaną inaczej dżumą gryzoni, dawniej gorączką królików (rabbit fever), gorączką jelenich much (deer-fly fever), chorobą straganiarzy (market men's disease) w USA, chorobą zającą (yato-bayo) i chorobą Ohary w Japonii oraz chorobą łowców szczurów wodnych w Rosji [27, 36, 37]. Tularemia występuje bardzo szeroko wśród wielu gatunków, nie tylko dzikich zwierząt: opisano przypadki wśród zajączaków, gryzoni, zwierząt mięsożernych, ryb, bezkręgowców oraz stawonogów. Choroba może występować również u zwierząt domowych: w 2011 roku opisano pierwszy w Europie przypadek psa chorego na tularemię, który miał kontakt z dzikim zającem [15, 66].

Wektorami tularemii mogą być owady ssące, takie jak komary, pluskwy oraz kleszcze. Człowiek może zakażać się *F. tularensis* poprzez bezpośredni kontakt z chorym zwierzęciem, jego tkankami (przez uszkodzoną skórę, zadrapania, zranienia), drogą aerogenną (poprzez wdychanie pyłu roślinnego zanieczyszczonego odchodami gryzoni), drogą pokarmową (poprzez spożywanie skażonej żywności lub wody), przez spojówkę w wyniku zatarcia oczu brudnymi palcami oraz ukąszenia zakażonych stawonogów [28]. W ostatnim czasie coraz częściej odnotowywane są przypadki odkleszczowego zakażenia tularemią [25, 39, 75].

Pałeczki *F. tularensis* w kleszczach namnażają się bardzo intensywnie. Zakażenie kleszcza może nastąpić we wszystkich jego fazach rozwojowych (larwa, nimfa), co oznacza możliwość przebywania bakterii w organizmie kleszcza w ciągu całego jego życia, tj. nawet kilka lat. Zakażony kleszcz może przenosić zarazek pośród ludzi i zwierząt przez wszystkie swoje fazy rozwoju (transtadialnie), oraz poprzez składanie jaj (transowarialnie). Dzięki takim rezerwuansom w naturalnym ognisku infekcja może istnieć nieograniczenie długo, poprzez cyrkulację zarazka: gryzoń jako dawca – stawonóg jako przenosiciel – gryzoń jako biorca. Dzięki temu zarazek przechowuje się w okresach międzyepidemicznych i przy sprzyjających warunkach powoduje nowe epizootie i epidemie [48].

Tularemia u człowieka przyjmuje następujące postacie kliniczne: wrzodziejącą, węzłową, alginową, żółdkowo-jelitową, płucną, ocznowęzłową oraz durową. [1]. *F. tularensis* może wywoływać również zapalenie wsierdza. [22] Na uwagę zasługują nietypowe formy lub objawy tej rzadkiej choroby, które często mylone są z innymi chorobami chociażby takimi jak: mononukleozą zakaźną, atypowe zapalenie płuc, choroba kociego

pazura czy gruźlica węzłów chłonnych [7]. Występowanie objawów niespecyficznych i nieprawidłowa diagnoza przyczynia się do pominięcia choroby i nieprawidłowego leczenia. Taka sytuacja wpływa często na niedoszacowanie danych epidemiologicznych oraz utrudnia monitorowanie rozprzestrzeniania się choroby. Utrudnione zostaje wówczas oszacowanie ryzyka zagrożenia zdrowia w społeczeństwie i tym samym adekwatna reakcja na ewentualne ryzyko epidemii. Ma to szczególne znaczenie w przypadku zagrożenia bioterrorystycznego. [83].

Podgatunki *F. tularensis* drastycznie różnią się chorobotwórczością dla człowieka. *F. tularensis* spp. *tularensis* charakteryzuje bardzo niska dawka zakaźna od 10 do 50 komórek bakteryjnych oraz śmiertelność na poziomie 5–30%. Zakażenia *F. tularensis* spp. *holarctica* mają łagodniejszy przebieg, a przypadki śmiertelne zdarzają się rzadko [90]. Zakażenia *F. tularensis* spp. *novicida* odnotowywane są sporadycznie w niektórych rejonach Ameryki Południowej i Australii. Natomiast *F. tularensis* spp. *madiaasiatica* nie wywołuje zakażeń u ludzi [106]. Pomimo znaczących różnic w zjadliwości tych czterech podgatunków *F. tularensis* są one w 95–98% identyczne na poziomie genetycznym [17, 92, 93].

3. Występowanie choroby

Tularemia występuje endemicznie w większości krajów europejskich. Liczba przypadków zachorowań zwykle nie przekracza 1000 w ciągu roku w krajach Unii Europejskiej. Na obszarach, takich jak Finlandia i Szwecja, ogniska zawierające powyżej setki przypadków rejestrowane są co najmniej raz na dziesięć lat. W innych rejonach ogniska występują sporadycznie. W Hiszpanii w latach 1997–2007 zarejestrowano 916 przypadków tej choroby u ludzi. W latach 2006–2011 największe epidemie miały miejsce w Finlandii w liczbie 1565 przypadków (z których powyżej 400 zanotowano w roku 2006, 2007 oraz 2009), oraz w Szwecji w liczbie 1875 przypadków [71, 87]. W Niemczech od 2005 roku zaobserwowano wzrost liczby zachorowań na tularemię. W ciągu kolejnych 6 lat, liczba potwierdzonych przypadków wyniosła 109 [87], podczas gdy w ciągu 49 poprzednich lat całkowita liczba przypadków wynosiła 184 [41, 84]. W pozostałych krajach Unii Europejskiej liczba zarejestrowanych w tym okresie przypadków wynosiła od 50 do 100. W Polsce ogniska epidemiczne występowały głównie na północy kraju. W latach 2000–2010 zostało w sumie zarejestrowanych 25 przypadków tej choroby na terenie całego kraju. Według danych NIZP-PZH, zanotowano 58 przypadków tularemii u ludzi w latach 1996–2014, przy czym w roku 2011 oraz 2012 odnotowano po 6 przypadków tej choroby. W 2013 liczba zachorowań wzrosła do 8 zdiagnozowa-

nych przypadków, a w 2014 potwierdzono ich siedem [57]. W czasie ostatnich 50 lat większość odnotowanych przypadków tularemii w Polsce związana była z pracą przy królikach i dotyczyła septycznej i durowej postaci tej choroby. Ostatnio coraz częściej odnotowywana jest postać wrzodząco-węzłowa, rozwijająca się po ukąszeniu kleszcza lub innego stawonoga [62].

4. Wewnątrzkomórkowy cykl życiowy *F. tularensis*

Po dostaniu się do organizmu ssaków *F. tularensis* wnika do makrofagów. Jednakże badania wykazały, że posiada zdolność wnikania i przeżywania w różnych typach komórek, m.in. komórkach dendrytycznych, neutrofilach, hepatocytach, nabłonkowych komórkach płucnych.

F. tularensis wnika do komórek na drodze nietypowego mechanizmu fagocytozy zapętlającej (looping phagocytosis), który wykorzystuje przebudowę aktywny przez szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i jest silnie zależny od obecności czynnika C3 komplementu i receptora CR3 [19]. Bakterie te mogą również wnikać do komórek poprzez receptory mannozowe, receptory zmiatacze klasy A typu I i II, a także receptory Fcy [69, 70, 81]. Po wnikięciu do komórki makrofaga *F. tularensis* zmienia normalny proces bakteriobójczy: przeciwdziała indukcji wybuchu tlenowego ograniczając w ten sposób narażenie komórek bakteryjnych pobranych przez makrofaga, na działanie aktywnych form tlenu. *F. tularensis* modyfikuje proces dojrzewania fagosomu w taki sposób, aby komórki bakteryjne miały kontakt z procesami endocytarnymi tylko przejściowo. Bakterie *F. tularensis* na początku przebywają w przestrzeni utworzonej przez błonę komórkową makrofaga, która pobiera ograniczoną ilość markerów wczesnego endosomu i późnego endolizosomu, takich jak EEA1, CD63, LAPM1 i LAMP2. Wakuola zawierająca *F. tularensis* nie pobiera kwaśnej hydrolazy katepsyny D i nie łączy się z lizosomem. Następnie *F. tularensis* ucieka z fagosomu do cytozolu komórki, gdzie zaczyna się intensywnie namnażać. Intensywnie namnażająca się w cytozolu *F. tularensis* doprowadza ostatecznie do śmierci komórki, opuszcza ją i infekuje następną komórkę [20, 69].

5. Czynniki zjadliwości *F. tularensis*

Geny wirulencji bakterii są często zlokalizowane w obrębie ruchomych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony, bakteriofagi, wyspy patogenności, które mogą być wymieniane pomiędzy bakteriami na drodze horyzontalnego transferu genów. Jednakże badania wskazują, że w przypadku czterech

podgatunków *F. tularensis* geny związane ze zjadliwością nabyte zostały drogą wertykalnego transferu genów. Analiza genomu *F. tularensis* pozwoliła zidentyfikować 30 genów, które mogły zostać nabyte na drodze horyzontalnego transferu. Jednak żaden z nich nie koduje potencjalnych czynników zjadliwości [35, 88–89]. Zidentyfikowano tylko jedną wyspę patogenności zwaną FPI (*Francisella* Pathogenicity Island), która jest związana z patogennymi właściwościami tego drobnoustroju [33, 64]. Porównanie całych genomów patogennych i niepatogennych podgatunków *F. tularensis* pokazało, że patogenne podgatunki wyewoluowały z niepatogennych na drodze rearanżacji genomu, mutacji punktowych oraz niewielkich delecji i insercji [77]. Poniżej przedstawiamy krótką charakterystykę czynników, które zostały zidentyfikowane jako kluczowe w zjadliwości *F. tularensis*. Jednakże należy zwrócić uwagę, że ze względów bezpieczeństwa, badania prowadzone są zazwyczaj na szczepach o obniżonej zjadliwości, takich jak *F. tularensis* spp. *holarctica* LVS (atenuowany szczep szczepionkowy) czy *F. tularensis* spp. *novicida*, rzadziej na wirulentnym szczepie laboratoryjnym *F. tularensis* spp. *tularensis* Schu S4, co może dostarczać informacji nie obejmujących wszystkich cech występujących u szczepów klinicznych.

5.1. Otoczka

Otoczka chroni bakterie przed lizą powodowaną przez składniki komplementu, fagocytozą oraz rozpoznanie przez układ immunologiczny. Wydaje się, że wytwarzanie antyfagocytarnej otoczki przez drobnoustroj wewnątrzkomórkowy, jakim jest *F. tularensis*, może utrudniać proces wnikania do komórek gospodarza. Jednak patogen ten potrafi manipulować mechanizmami komórkowymi gospodarza w celu ograniczenia stanu zapalnego i zwiększenia wewnątrzkomórkowej przeżywalności [35].

Otoczka *F. tularensis* tworzy strukturę o grubości około 0,02–0,04 μm . Zbudowana jest z polisacharydu identycznego jak antygen O stanowiący składnik lipopolisacharydu (LPS). Jej wielkość molekularna oszacowana została na 100–250 kDa. W części rdzeniowej zawiera powtórzenia tetrasacharydowe 2-acetamido-2,6-dideoxy-o-glukozy (o-QuiNAc), 4,6-dideoxy-4-formamido-D-glukozy (o-Qui4NFm) i 2-acetamido-2-deoksy-o-galaktrunoamidu (o-GalNAcAN), przy czym liczba jednostek o-GalNAcAN jest dwukrotnie większa niż pozostałych dwóch cukrów [2, 34, 47].

Genami odpowiedzialnymi za wytwarzanie otoczki są *wbtA1*, *wbtA2*, *wbtC*, *wbtI*, *wbtM* oraz *FTL0708*. Pojedyncza delecja *wbtA1*, *wbtA2*, *wbtC*, *wbtI* lub *wbtM* skutkuje utratą zarówno otoczki, jak też antygeny O LPSu, co wskazuje na wspólną ścieżkę biosyntezy antygeny O otoczki i LPSu. Natomiast delecja genu *FTL0708*

powoduje, że otoczka nie jest wytwarzana, ale LPS powstaje normalnie, co wskazuje na istnienie genów specyficznych tylko dla otoczki [2]. Z kolei badania Lindemann i wsp. wykazały, że geny *waaY* i *waaL* są konieczne do wytwarzania otoczki przez szczep Schu S4 [52]. Co ciekawe, *locus capBCA*, homologiczny do genów *cap* *Bacillus anthracis* odpowiedzialnych za wytwarzanie otoczki zbudowanej z kwasu poli-D-glutaminowego u tego drobnoustroju, nie wpływa na zdolność wytwarzania otoczki *F. tularensis*. Ma on jednak istotne znaczenie dla wirulencji ponieważ mutanty *F. tularensis* w *capBCA* lub *capB* są atenuowane zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [2, 78, 86].

5.2. Lipopolisacharyd

Lipopolisacharyd (LPS), zwany endotoksyną bakteryjną, jest jednym z bardziej istotnych komponentów większości bakterii Gram-ujemnych, wywierającym duży wpływ na przebieg infekcji. Jest to integralny składnik błony komórkowej, niezbędny do prawidłowego funkcjonowania drobnoustroju, stanowiący ok. 70% jego powierzchni. Oprócz podstawowych funkcji życiowych komórki bakteryjnej LPS jest ważnym czynnikiem chorobotwórczym, który stymuluje układ odpornościowy gospodarza. LPS w swej strukturze posiada lipid A, rdzeń oligosacharydowy oraz O-antygen [34, 94]. Budowa LPS *F. tularensis* posiada wiele unikalnych struktur, wskazujących na jego niską toksyczność: lipid A, który jest asymetryczny, posiada dłuższy łańcuch kwasów tłuszczowych (16–18 węglowych) oraz cztery podstawniki acylowe. Jest niefosforylowany lub monofosforylowany w pozycji 1'. U większości bakterii gram ujemnych lipid A jest sześćoacylowany, a jego łańcuchy są 12–14 węglowymi łańcuchami oraz posiada dwie grupy fosforylowe w pozycji 1' i 4'. Unikalny charakter lipidu A objawia się możliwością jego występowania jako wolny lipid (bez komponentów rdzenia oraz antygeny O [94]. Różnice w budowie lipidu A *F. tularensis* mogą mieć wpływ na zmniejszoną aktywację białek wychytujących LPS oraz aktywność receptora TLR4/MD-2, wywołując tym samym słabszą odpowiedź immunologiczną gospodarza [46]. Badania wykazały, iż LPS drobnoustrojów z gatunku *F. tularensis* spp. *novicida* wywołuje silniejszą odpowiedź immunologiczną niż szczepu LVS stymulując makrofagi do produkcji IL-12 oraz TNFalfa [80].

Antygen O gatunku *F. tularensis* spp. *tularensis* oraz *F. tularensis* spp. *holarctica* zawiera 15 genów kodujących otoczonych transpozazą natomiast *F. tularensis* spp. *novicida* posiada tych genów tylko 12 z czego osiem jest homologicznych z podgatunkiem *F. tularensis* spp. *tularensis*. Trzy geny występujące tylko u *F. tularensis* spp. *holarctica* to *wzy*, *wzx* i *wbt*. Natomiast delecja trzech silnie konserwowanych genów *wbtDEF*

w szczepach *F. tularensis* spp. *novicida* i *F. tularensis* spp. *tularensis* Schu S4 powoduje utratę zdolności do wytwarzania antygeny O i obniżenie patogenności tych szczepów dla myszy. Ale co ciekawe tylko mutanty Schu S4 pozbawione *wbtDEF* utraciły zdolność do wzrostu w mysich makrofagach. Mutanty *F. tularensis* spp. *holarctica* LVS pozbawione *wbtDEF* również nie wytwarzały antygeny O, ale wciąż były w stanie namnażać się w ludzkich makrofagach [78].

Niska aktywność LPS *F. tularensis* w organizmie gospodarza powoduje słabszą odpowiedź immunologiczną i tym samym wpływa na ograniczone rozpoznanie wniknięcia tego drobnoustroju do organizmu człowieka. Dzięki temu *F. tularensis* może przez odpowiedni czas, umożliwiając jej przejście do kolejnych etapów zakażenia, pozostać niezauważona przez organizm gospodarza.

5.3. Pili typu IV

Pili typu IV (Tfp) są ważnym czynnikiem wirulencji wielu gram-ujemnych patogenów, w tym także *F. tularensis*. Biorą one udział w adhezji, agregacji komórek bakteryjnych, poruszaniu się, tworzeniu biofilmu, kolonizacji organizmu gospodarza, a także pobieraniu obcego DNA [55, 78, 85]. Obecność pili u *F. tularensis* zaobserwowano po raz pierwszy stosunkowo niedawno, bo w 2004 r. [30].

Klaster genów *Tfp* u podgatunków *F. tularensis* spp. *tularensis*, *F. tularensis* spp. *holarctica* oraz *F. tularensis* spp. *novicida* zawiera 14 genów kodujących białka błony zewnętrznej, białka błony wewnętrznej, ATPazy i podjednostki piliny, czyli białka strukturalne pili. Wykazują one homologię do genów pili typu IV *Neisseria* i *Pseudomonas* [30, 78]. Włókienka pili *F. tularensis* zbudowane jest z 5–6 podjednostek piliny Pile1-Pile6. Wszystkie 6 genów kodujących podjednostki piliny jest obecnych w szczepach *F. tularensis* spp. *tularensis* i *F. tularensis* spp. *novicida*. Szczepy *F. tularensis* spp. *holarctica* zawierają różne mutacje (delecje, skrócenia) w obrębie genów *pile1*, *pile2* lub *pile3*. *Pile4* jest niezbędne do składania pili u wszystkich trzech podgatunków *F. tularensis*. Natomiast rola *Pile5* i *Pile6* w składaniu pili i w wirulencji nie jest poznana [78–79]. Pozostałe geny związane z wytwarzaniem pili typu IV u *F. tularensis* wydają się mieć istotną rolę w wirulencji tych bakterii. Przykładowo, delecja genu białka błony wewnętrznej *pilC* albo delecja genu *pilQ* kodującego białko błony zewnętrznej powoduje atenuację szczepu Schu S4 dla myszy [26]. ATPazy PilF i PilT są wymagane dla wirulencji szczepu LVS u myszy, chociaż PilT nie jest niezbędna dla wirulencji szczepu Schu S4 [26, 76].

Istnieje doniesienie, że Tfp ma udział w sekrecji białek u *F. tularensis* spp. *novicida*. Jednak nie zauważono

tego zjawiska w warunkach *in vitro* u *F. tularensis* spp. *tulatis* i *F. tularensis* spp. *holarctica* [38].

Obecna wiedza w zakresie roli pili typu IV w wirulencji *F. tularensis* jest bardzo niepełna, a jej głębsze zrozumienie dodatkowo komplikuje fakt rozbieżności w nomenklaturze stosowanej przez różnych autorów. Dla przykładu gen *pilE1* określany jest też jako *pilA*, *pilE2* jako *pilE*, *pilE3* jako *pilV*, a *pilO* jako *pilA*.

5.4. Regulator MglA

MglA jest kodowany przez gen *mglA* (macrophage growth locus A) i reguluje transkrypcję genów *F. tularensis* niezbędnych do wewnątrzkomórkowego wzrostu. Gen *mglA* zlokalizowany jest na operonie wraz z genem *mglB*, który również jest niezbędny do wzrostu *F. tularensis* wewnątrz makrofagów [6]. Ekspresja MglA jest indukowana w ciągu 1,5 godziny od wnikięcia bakterii do makrofagów. Po wnikieniu do makrofagów *F. tularensis* ucieka z fagosomu i namnaża się w cytoplazmie makrofaga, a MglA jest niezbędne właśnie do ucieczki z fagosomu [4, 32].

MglA jest pozytywnym regulatorem transkrypcji genów zlokalizowanych na FPI (Francisella Pathogenicity Island), jak również pozytywnym lub negatywnym regulatorem prawie 100 genów zlokalizowanych poza FPI [12].

5.5. Francisella Pathogenicity Island (FPI)

Wyspa patogenności *Francisella* (FPI) ma wielkość 30 kb. Wykazano, że jej obecność jest wymagana do wzrostu *F. tularensis* w makrofagach, a także warunkuje chorobotwórczość tych bakterii dla myszy. FPI zawiera geny *iglABCD*, tworzące operon, oraz geny *pdpABCD* (pathogenicity determinant protein). Sekwencja aminokwasowa IglA i IglB wykazuje 30% homologii do hipotetycznych białek kilku innych gatunków bakterii, z których większość to patogeny zwierząt lub roślin. Ekspresja genu *iglC* jest silnie indukowana po wnikieniu *F. tularensis* do makrofagów, a powstający produkt jest niezbędny do namnażania się tych drobnoustrojów w makrofagach. Sekwencje aminokwasowe IglC i IglD, jak również produktów genów *pdpABCD*, nie wykazują podobieństwa do żadnych znanych białek [31, 33, 63]. Co ciekawe, gen *pdpD* nie występuje w szczepach *F. tularensis* spp. *holarctica*. Natomiast białko PdpD *F. tularensis* spp. *novicida* jest większe o 50 aminokwasów od białka PdpD *F. tularensis* spp. *tularensis*. Ponadto, wirulentne szczepy *F. tularensis* spp. *tularensis* i *F. tularensis* spp. *holarctica* posiadają w genomie dwie identyczne kopie FPI [4, 63]. Dotychczas jednym czynnikiem patogenności występującym w wysoce zjadliwych szczepach *F. tularensis* spp. *tularensis* a nie występującym w szczepach *F. tularensis* spp. *tularen-*

sis, które mają znacząco mniej patogenne dla ludzi, jest gen *pdpD*. Ale co zaskakujące, mutant *pdpD* *F. tularensis* spp. *novicida* wykazywał mniejszą wirulencję dla myszy niż szczep LVS, który również pozbawiony jest tego genu. Może to być efektem duplikacji FPI w szczepie LVS i tym samym większej ilości produktów genów FPI, co może kompensować brak *pdpD* [63]. Geny znajdujące się w obrębie FPI odgrywają rolę w sekrecji białek, co zostało przedstawione w dalszej części pracy.

5.6. Białka błony zewnętrznej

Białka błony zewnętrznej (OMP) są istotnym elementem strategii inwazyjnej bakterii po wnikieniu do komórek gospodarza, ułatwiają wewnątrzkomórkowy rozwój i mają wpływ na wirulencję. Dotychczas tylko dla części OMP *F. tularensis* wykazano rolę w wirulencji. Do najwcześniej opisanych należy białko Tul4 o wielkości 17 kDa. Stymuluje ono proliferację limfocytów T, głównie receptorów CD4, produkcję IL-2 oraz IFN- γ . Brak genu *Tul4* hamuje wewnątrzkomórkowy wzrost szczepu LVS *F. tularensis* [42, 63, 82]. Z kolei lipoproteina Flpp3 stymuluje TLR2 i jest wymagana do przeżycia szczepu LVS w płucach myszy [78].

Białko DipA warunkuje wirulencję szczepu Schu S4 *in vivo* i *in vitro*. Razem z FopA tworzy kompleks w błonie zewnętrznej [18]. OmpA wymagane jest do replikacji w makrofagach. Jego delecja powoduje wzrost produkcji cytokin (m.in. TNF- α i IL-6) przez makrofagi. Co więcej, białko to wpływa na morfologię komórki bakteryjnej oraz zwiększenie przeżywalności bakterii [4, 76]. FupA (YapH-N, FopC) to 58 kDa białko niezbędne do wirulencji *in vivo* i *in vitro*. Mutanty w tym genie są bardziej wrażliwe na zabijanie przez makrofagi indukowane IFN- γ . Odgrywa również istotną rolę w sideroforozeależnych i sideroforoniezaależnych mechanizmach pozyskiwania żelaza [78]. FslE (SrfA) jest drugim białkiem OMP, które odgrywa rolę w pobieraniu żelaza. Wykazano, że jego obecność jest kluczowa dla wzrostu szczepu Schu S4 w warunkach niedoboru żelaza, ale nie do wzrostu szczepu LVS. Ekspresja tego białka wzrasta przy ograniczonym dostępie żelaza w środowisku. Rola FslE w wirulencji polega na synergistycznym działaniu z białkiem FupA [74]. Kolejne białko – DsbA (FipB), zlokalizowane u innych bakterii periplazmatycznie, u *F. tularensis* umiejscowione jest nietypowo w błonie zewnętrznej. Jest niezbędne do wewnątrzkomórkowego przeżywania bakterii, ucieczki z fagosomu i wirulencji dla myszy [72]. Z kolei OMP FsaP pełni istotną rolę w przyleganiu szczepu LVS do komórek nabłonkowych. Wykazuje 98% homologię z podobnym białkiem w szczepie Schu S4. Natomiast u *F. tularensis* spp. *novicida* w części sygnałnej tego białka występuje substytucja aminokwasowa co wpływa na umiejscowienie i funkcję

tego białka, które w tym przypadku nie jest zlokalizowane w błonie zewnętrznej [58].

Wśród innych białek błony zewnętrznej, które mogą mieć znaczenie w wirulencji *F. tularensis* wymienia się FopA, IglE i TolC [44, 78]. OMP są obecnie intensywnie badane nie tylko ze względu na ich rolę w patogenezie, ale także ze względu na ich potencjalną przydatność jako składnik antygenowy szczepionki przeciw tularemii, nad stworzeniem której trwają prace od wielu lat.

5.7. Białka wydzielnicze i systemy sekrecji

System sekrecji w komórkach bakteryjnych służy przede wszystkim wydzielaniu cząstek molekularnych oraz białek poza komórkę bakteryjną co stanowi niezbędny mechanizm adaptacji oraz przeżycia w środowisku zewnętrznym a przede wszystkim w komórkach gospodarza. Niewiele wiadomo o molekularnych mechanizmach systemu sekrecji *F. tularensis*. Jest on powiązany z wirulencją oraz zdolnością do replikacji wewnątrz makrofagów komórek gospodarza. [5] Co ciekawe, badania wykazały brak u *F. tularensis* systemu sekrecji typu III oraz IV, których kluczową funkcją u innych patogenów bakteryjnych jest wprowadzanie białek efektorowych do komórek gospodarza umożliwiających zakażenie i rozwój choroby [40].

Sekrecja białek związanych z wirulencją *F. tularensis* związana jest ze wspomnianą wcześniej wyspą patogenności FPI, której część genów (m.in. *iglA*, *iglB*, *pdpB*, *dotU*, i *vgrG*) wykazuje homologię z VI typem systemu sekrecji T6SSs [10–11, 14]. System sekrecji typu VI *F. tularensis* zbudowany jest z zewnętrznego futerału utworzonego z heterodimerów IglA/IglB ułożonych w postaci helikalnego cylindra. Wewnątrz znajduje się rurka utworzona przez IglC, która prawdopodobnie przemieszczana jest do błony komórki docelowej na skutek kurczenia się futerału IglA/IglB. VgrG jest zlokalizowane na końcu T6SS tworząc strukturę przebijającą komórkę gospodarza. Struktura rurki i futerału jest umocowana w błonie zewnętrznej za pomocą lipoproteiny IglE, która oddziałuje także z białkami PdpB i DotU zlokalizowanymi w błonie wewnętrznej tworząc kanał periplazmatyczny [21, 78]. Wykazano, że mutacja w genach *IglA* oraz *IglB* uniemożliwia *F. tularensis* ucieczkę z fagosomu i wewnątrzkomórkowy wzrost [13]. Pomimo licznych badań rola systemu sekrecji typu VI w wirulencji *F. tularensis* pozostaje kontrowersyjna.

Wiele białek *F. tularensis* jest wydzielanych na zewnątrz komórki bakteryjnej, ale mechanizm ich sekrecji pozostaje nieznany. Wśród wydzielanych czynników wirulencji wymienić należy kwaśną fosfatazę AcpA, katalazę-peroksydazę KatG, symutazę nadtlenu SodB. AcpA jest związane z błoną zewnętrzną lub wydzielane do supernatantu hodowli szczepów LVS i *F. tularensis* spp. *novicida*. Było również izolowane z cytozolu zain-

fekowanych makrofagów, co sugeruje rolę tego białka w wirulencji. Oprócz aktywności kwaśnej fosfatazy białko AcpA *F. tularensis* posiada aktywność fosfolipazy i lipazy, hamuje wybuch tlenowy neutrofilii, odgrywa rolę w wewnątrzkomórkowym wzroście, ucieczce z fagosomu i zjadliwości dla zwierząt [23, 60]. KatG odgrywa rolę w neutralizacji aktywnego tlenu i azotu w szczepach LVS i Schu S4. Jednakże nie jest niezbędny do wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach obydwu tych szczepów. Wykazano jego rolę w wirulencji LVS dla myszy [53]. Niewiele jest badań dotyczących roli SodB w wirulencji *F. tularensis*. Te nieliczne wskazują na udział tego białka w oporności bakterii na nadtlenu oraz w zjadliwości szczepu LVS dla myszy [3].

6. Podsumowanie

F. tularensis jest patogenem znanym od ponad 100 lat jednak wciąż niewiele wiadomo o czynnikach wirulencji tego drobnoustroju oraz o patogenezie tularemii. Pomimo niewielkich różnic na poziomie genomu podgatunku *F. tularensis* znacząco różnią się patogennością dla ludzi i zwierząt. Badania pokazują, że identyfikowane u jednego podgatunku funkcje pewnych genów i białek – potencjalnych czynników zjadliwości, mogą pełnić zupełnie odmienne funkcje u innego podgatunku. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że większość badań prowadzona jest na szczepach o obniżonej zjadliwości. Przedstawione w niniejszej pracy czynniki zjadliwości *F. tularensis* z całą pewnością nie wyczerpują tematu. Co więcej, potrzeba jeszcze wielu badań, aby w pełni ustalić ich funkcję u każdego z podgatunków *F. tularensis*.

Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer 2013/11/N/NZ/6/01247.

Piśmiennictwo

1. Anda P., Martínez Nawarro J.F i wsp.: Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 575–582 (2001)
2. Apicella M.A., Gibson B.W. i wsp.: Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS ONE*, **5**, e11060 (2010)
3. Bakshi C.S., Malik M., Regan K., Melendez J.A., Metzger D.W., Pavlov V.M., Sellati J.S.: Super oxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hyper sensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* **188**, 6443–6448 (2006)
4. Barker J.R., Klose K.E.: Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann. NY Acad. Sci.* **1105**, 138–159 (2007)

5. Barker J.R., Chong A., Wehrly T.D., Yu J.J., Rodriguez S.A., Liu J., Celli J., Arulanandam B.P., Klose K.E.: The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol. Microbiol.* **74**, 1459–1470 (2009)
6. Baron G.S., Nano F.E.: MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol. Microbiol.* **29**, 247–259 (1998)
7. Baumann-Popczyk A., Sadkowska-Todys M., Zieliński A.: Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka. Wyd. VII, 2014, Lublin
8. Bernard K., Tessier S., Winstanley J., Chang D., Borczyk A.: Early recognition of atypical *Francisella tularensis* strains lacking a cysteine requirement. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 551–553 (1994)
9. Brevik O.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A.: *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **5**, 1044–1056 (2011)
10. Broms J.E., Meyer L., Sun K., Lavander M., Sjöstedt A.: Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection. *PLoS One*, **7**, (2012)
11. Bröms J.E., Sjöstedt A., Lavander M.: The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Front. Microbiol.* **1**, 136 (2010)
12. Brotcke A., Weiss A.D., Kim C.C., Chain P., Malfatti S., Garcia E., Monack D.M.: Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **74**, 6642–6655 (2006)
13. Bruin O.M., Duplantis B.N., Ludu J.S., Hare R.F., Nix E.B., Schmerk C.L., Robb C.S., Boraston A.B., Hueffer K., Francis E.: The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology*, **157**, 3483–3491 (2011)
14. Bruin O.M., Ludu J.S., Nano F.E.: The *Francisella* pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiology*, **7**, doi:10.1186/1471-2180-7 (2007)
15. Carvalho C.L., Lopes de Carvalho L., Zé-Zé L., Nuncio M.S., Duarte E.L.: Tularaemia: A challenging zoonosis. *Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 85–96 (2014)
16. Centers for Disease Control and Prevention: Emergency Preparedness and Response, <http://emergency.cdc.gov/bioterrorism/overview.asp> (20.02.2017)
17. Champion M.D., Galagan J i wsp.: Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* **5**, e1000459 (2009)
18. Chong A., Child R., Wehrly T.D., Rockx-Brouwer D., Qin A., Mann B.J., Jean C. Structure-function analysis of DipA a virulence factor required for intracellular replication. *PLoS One*, **8**, e67965 (2013)
19. Clemens D. L., Lee B.Y., Horwitz M.A.: Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.* **72**, 3204–3217 (2004)
20. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A.: *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect. Immun.* **73**, 5892–5902 (2005)
21. Clemens D.L., Ge P., Lee B.Y., Horwitz M.A., Zhou Z.H.: Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, **160**, 940–951 (2015)
22. Corey A. Dillaha T. and J.A.: *Francisella tularensis* endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 399–400 (2000)
23. Dai S., Mohapatra N.P., Schlesinger L.S., Gunn J.S.: The acid phosphatase AcpA is secreted *in vitro* and in macrophages by *Francisella* spp. *Infect. Immun.* **80**, 1088–1097 (2012)
24. Dennis D.T., Tonat K.: Tularemia as a biological weapon: medical and public management. *JAMA*, **285**, 2763–2773 (2001)
25. Formińska K., Zasada A.A., Rastawicki W., Śmietańska K., Bander D., Wawrzynowicz-Syczewska M., Yanushevych M., Niścigórska-Olsen J., Wawszczak M.: Increasing role of arthropod bites in tularemia transmission in Poland – case reports and diagnostic methods. *Ann. Agric. Environ. Med.* **22**, 443–6 (2015)
26. Forslund A.L., Salomonsson E.N., Golovliov I., Kuoppa K., Michell S., Titball R., Oyston P., Noppa L., Sjöstedt A., Forsber A.: The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *BMC Microbiol.* **10**, 227 (2010)
27. Francis E., M.D., Moore D. M.D.: Identity of Ohara's disease and tularemia. *JAMA*, **86**, 1329–1332 (1926)
28. Franke J., Fritzsche J., Tomaso H., Straube E., Dorn W., Hildebrandt A.: Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6929–6836 (2010)
29. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G.: Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systemic bacteriology, wyd. 2, Springer, New York, 2004
30. Gil H., Benach J.L., Thanassi D.G.: Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **72**, 3042–3047 (2004)
31. Golovilov I., Baranov Z., Krocova., Kovarova H., Sjöstedt A.: An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun.* **71**, 5940–5950 (2003)
32. Golovliov I., Ericsson M., Sandstrom G., Tarnvik A., Sjöstedt A.: Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect. Immun.* **65**, 2183–2189 (1997)
33. Gray C. G., Cowley S.C., Cheung K.K., Nano F.E.: The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 53–56 (2002)
34. Gun J.S., Ernst R.K.: The structure and function of *Francisella* Lipopolysaccharide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1105**, 202–218 (2007)
35. Gunnell M.K., Robison R.A., Adams B.J.: Natural selection in virulence genes of *Francisella tularensis*. *J. Mol. Evol.* **82**, 264–278 (2016)
36. Gürcan S.: Epidemiology of tularemia. *Balkan Med. J.* **31**, 3–10 (2014)
37. Hodges L., Penn R.L.: Tularemia and bioterrorism. *JAMA*, **21**, 285 (2001)
38. Hager A.J., Bolton D.L., Pelletier M.R., Brittnacher M.J., Gallagher L.A., Kaul R., Skerrett S.J., Miller S.I., Guina T.: Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol. Microbiol.* **62**, 227–237 (2006)
39. Hanke C.A., Otten J.E., Berner R., Serr A., Spletstoesser W., Schnakenburg C.: Ulceroglandular tularemia in a toddler in Germany after a mosquito bite. *Eur. J. Pediatr.* **168**, 937–940 (2009)
40. Hare R.F., Hueffer K.: *Francisella novicida* pathogenicity island encoded proteins were secreted during infection of macrophage-like cells. *Plos One*, **9**, (2014) e105773
41. Hauri A.M., Hofstetter I., Seibold E., Kaysser P., Eckert J., Neubauer H., Spletstoesser W.D.: Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 238–224 (2010)
42. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kämpfer P., Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 561–574 (2007)

43. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kamper P., Spletstoessem W.D.: Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolates from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *Novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **60**, 1887–1896 (2010)
44. Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane eproteins. *J. Bacteriol.* **189**, 561–574 (2007)
45. Jaohansson A., Keim P.: Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple – locus variable – number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* **17**, 5808–5818 (2004)
46. Johansson A., Petersen J.M.: Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *J. AOAC Int.* **93**(6), 1930–1943 (2010)
47. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R.: Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**(4), 2014
48. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna zoonoza. *MONZ*, **3**, 155–160 (2011)
49. Larson M.A., Nalbantoglu U., Sayood K., Zent E.B., Cer R.Z., Iwen P.C., Francesconi S.C., Bishop-Lilly K.A., Mokashi V.P., Sjöstedt A., Hinrichs S.H.: Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 1200–1205 (2016)
50. Larson M.A., Fey P.D., Hinrichs S.H., Iwen P.C.: *Francisella tularensis* bacteria associated with feline tularemia in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **20**(12), 2068–2071 (2014)
51. Leelaporn A., Yongyod S., Limsrivanichakorn S., Yungyuen T., Kiratisin P.: Emergence of *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(12), 1935–1937 (2008)
52. Lindemann S.R., Peng K., Long M.E., Hunt J.R., Apicella M.A., Monack D.M., Allen L.A., Jones B.D.: *Francisella tularensis* SchuS4O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect. Immun.* **79**, 581–594 (2011) doi:10.1128/IAI.00863-10
53. Lindgren H., Shen H., Zingmark C., Golovliov I., Conlan W., Sjöstedt A.: Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.* **75**, 1303–1309 (2007)
54. Mahawar M., Atianand M.K., Dotson R.J., Mora V., Rabadi S.M., Metzger D. W., Huntley J.F., Harton J.A., Malik M., Bakshi C.S.: Identification of a novel *Francisella tularensis* factor required for intramacrophage survival and subversion of innate immune response. *J. Biol. Chem.* **287**, 25216–25229 (2012)
55. Marrs C.F., Weir S.: Pili (fimbriae) of *Branhamella* species. *Am. J. Med.* **14**, 36–40 (1990)
56. May C. Chu., Carey R.B., Welch D.F.: Basic protocols for level a laboratories. For the presumptive identification of *Francisella tularensis*. Centers for Disease Control and Prevention.
57. Meldunki epidemiologiczne NIZP-PZH, http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (07.02.2017)
58. Melillo A., Sledjeski D.D., Lipski S., Wooten R.M., Basrur V., Lafontaine E.R.: Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol Lett.* **263**, 102–108 (2006)
59. Mierzyńska D., Hermanowska-Szapakowicz T.: Tularemia jako potencjalna broń bioterrorystów. *Med. Pr.* **53**, 279–281 (2002)
60. Mohapatra N.P., Balagopal A., Soni S., Schlesinger L.S., Gunn J.S.: AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. *Infect. Immun.* **75**, 390–396 (2007)
61. Monike L van Hoek.: Biofilms an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence*, **4**, 8, 833–846 (2015)
62. Moniuszko A., Zajkowska J., Pancewicz S. i wsp.: Arthropod-Borne Tularemia In Poland: A Case Report. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 1399–1401 (2011)
63. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.M., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkings K.L.: A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* **186**, 6430–6436 (2004)
64. Nano F.E., Schmerk C.: The *Francisella* pathogenicity island. *Ann. NY Acad. Sci.* **1105**, 122–137 (2007)
65. Nano F.E.: Identification of a heat-modifiable protein of *Francisella tularensis* and molecular cloning of the encoding gene. *Microb. Pathogenesis.* **5**, 109–119 (1988)
66. Nordstoga A., Handeland K., Johansen T.B., Iversen L., Gaviere-Widén D., Mattsson R., Wik-Larssen K., Afset J.G., Næverdal R., Lund A.: Tularemia in Norwegian dogs. *Vet. Microbiol.* **10**, 318–322 (2014)
67. Olsufjew N., Meshcheryakova I.S.: Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 872–874 (1983)
68. Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E., Friis-Møller A., Krossøy B., Knappskog B.: New species in the genus *Francisella* (*Gammaproteobacteria*; *Francisellaceae*); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Arch. Microbiol.* **188**, 547–550 (2007)
69. Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 684–711 (2009)
70. Pierini L.M.: Uptake of serum-opsonized *Francisella tularensis* by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors. *Cell. Microbiol.* **8**, 1361–1370 (2006)
71. Pilo P., Johansson A., Frey J.: Identification of *Francisella tularensis* Cluster in Central and Western Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 2049–2051 (2009)
72. Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J.: Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.* **77**, 152–161 (2009)
73. Qu P.H., Chen S.Y., Scholz H.C., Busse H.J., Gu Q., Kämpfer P., Foster J.T., Glaeser S.P., Chen C., Yang Z.C.: *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3628–3635 (2013)
74. Ramakrishnan G., Sen B., Johnson R.: Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis tularensis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 25191–25202 (2012)
75. Reye A.L., Hübschen J.M., Sausy A. i wsp.: Prevalence and seasonality of Tick-Borne pathogens in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* **9**, 2923–2931 (2010)
76. Robertson G.T., Case E.D., Dobbs N., Ingle C., Balaban M., Celli J., Norgard M.V.: FTT0831c/FTL_0325 contributes to *Francisella tularensis* cell division maintenance of cell shape, and structural integrity. *Infect. Immun.* **82**, 2935–2948 (2014)
77. Rohmer L., Brittnacher M.J. i wsp.: Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* **8**, (2007)
78. Rowe H.M., Huntley J.F.: From the outside-in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1–20 (2015)
79. Salomonsson Näslund E., Forslund A.L., Forsberg Å.: Type IV pili in *Francisella* – a virulence trait in an intracellular pathogen. *Front. Microbiol.* **2**, 29 (2011)
80. Sandström G., Sjöstedt A., Johansson T., Kuoppa K., Williams J.C.: Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide

- from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol. Immunol.* **105**, 201–210 (1992)
81. Schulert G.S., Allen L.A.: Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 563–571 (2006)
 82. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A., Jaurin B.: Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* **145**, 311–317 (1990)
 83. Spletstoesser W.D., Piechotowski I., Buckendahl A., Frangoulidis D., Kaysser P., Kratzer W., Kimmig P., Seibold E., Brockmann S.O.: Tularemia in Germany: the tip of the iceberg? *Epidemiol. Infect.* **137**, 736–743 (2009)
 84. Schmidt H., Hensel M.: Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 14–56 (2004)
 85. Strom M.S., Lory S.: Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 565–596 (1993)
 86. Su J., Yang J., Zhao D., Kawula T.H., Banas J.A. and Zhang J.R.: Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect. Immun.* **75**, 3089–3101 (2007)
 87. Surveillance Report Annual epidemiological report. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. ECDC, 2011
 88. Svensson K., Johansson A. i wsp.: Genome sequence of *Francisella tularensis* subspecies holarctica strain FSC200, isolated from a child with tularemia. *J. Bacteriol.* **194**, 6965–6966. (2012)
 89. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A.: Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* **187**(11), 3903–3908 (2005)
 90. Tomaso H., Scholz H.C., Naubauer H., Al Dahouk S., Seibold E., Landt O., Forsman M., Spletstoesser W.D.: Real-time PCR using hybridization probes for rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell. Probes.* **21**, 12–16 (2007)
 91. Versage J.L., Severin D.D.M., Chu M.C., Petersen J.M.: Development of multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5492–5499 (2003)
 92. Vogler A.J., Keim P.: Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* **191**, 2474–2484 (2009)
 93. Vogler AJ, Keim P. i wsp.: Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* **191**, 2474–2484 (2009)
 94. Wang X., Ribeiro A.A., Guan Z., Abraham S.M., Raetz C.R.H.: Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4136–4141 (2006)
 95. Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., De Boer J., Zhou J.Y., Bearden S.W., Petersen J.M., Chu M.C., Hogg G.: Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* **52**, 839–842 (2003)