

Zastosowanie metody Real-time PCR opartej na fluorescencji barwnika SYBR Green I do wykrywania genów zlokalizowanych w DNA plazmidów pXO1 i pXO2 oraz specyficznego sekwencji chromosomalnej rpoB szczepów *Bacillus anthracis*

SYLWIA BUDNIAK, AGNIESZKA KĘDRAK-JABŁOŃSKA, MONIKA REKSA,
ANNA SZCZAWIŃSKA, BOGNA BORKOWSKA-OPACKA

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Budniak S., Kędrak-Jabłońska A., Reksa M., Szczawińska A., Borkowska-Opacka B.
Application of the real-time PCR method with the intercalating dye SYBR Green I for the detection of genes located on plasmids pXO1 and pXO2 as well as the specific chromosomal rpoB sequence of *Bacillus anthracis* strains

Summary

The aim of the study was to apply the real-time PCR method with the intercalating dye SYBR Green I for the detection of genes of *Bacillus anthracis* located on plasmids pXO1 and pXO2 and the specific chromosomal rpoB 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, gene cap coding capsule, and primers for the amplification of the specific chromosomal sequence. PCR enabled the detection of all genes under examination by the observation of amplification curves. The specificity of real-time PCR was confirmed by estimating melting temperatures of PCR products. It was shown that the melting temperatures of amplicons obtained in the reaction were 78°C, 79°C and 76°C in cases of detecting the chromosomal rpoB sequence, pag gene, and cap-C gene, respectively. 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.

Keywords: *Bacillus anthracis*, real-time PCR, SYBR Green I

Wąglík jest chorobą zakaźną wywołaną przez laseczkę wąglíka *Bacillus anthracis*, przebiegającą zazwyczaj pod postacią posocznicy. Charakterystycznymi zmianami pośmiertnymi są: obrzęk śledziony oraz surowiczo-krwotoczne nacieki w tkance łącznej podskórnej. Choroba występuje najczęściej u zwierząt roślinożernych, rzadziej u wszystkożernych i mięsożernych oraz u ludzi. U człowieka, w zależności od drogi zakażenia, wąglík może przebiegać w trzech postaciach: skórnej, płucnej oraz jelitowej (4, 6, 21, 24).

Mimo nielicznych przypadków wąglíka, notowanych w ostatnich dziesięcioleciach, za celowością badań nad tym drobnoustrojem przemawia możliwość niekontrolowanego importu surowców i produktów

pochodzenia zwierzęcego z terenów, gdzie wąglík występuje nadal enzootycznie, jak na przykład w niektórych krajach Azji i Afryki (24). Również stałe wymienianie laseczki wąglíka na pierwszym miejscu w wykazie czynników broni biologicznej i coraz bardziej niepokojąco sygnalizowany bioterroryzm wskazują na konieczność dokładnego zaznajomienia się z metodami diagnostycznymi tej jednostki chorobowej.

„Złotym standardem” w identyfikacji *B. anthracis* jest badanie hodowlane. Diagnostyka laboratoryjna *B. anthracis* oparta na ocenie morfologii kolonii, właściwościach fizjologicznych oraz biochemicznych jest czasochłonna i wymaga specjalistycznych testów.

B. anthracis jest blisko spokrewniony z kilkoma gatunkami laseczek występującymi w środowisku, ta-

kimi jak: *B. cereus*, *B. mycoides* i *B. thuringiensis* (2, 5). Ze względu na duże podobieństwo genetyczne tych gatunków niektórzy badacze uważają, że są one odmianami lub podgatunkami *B. cereus* i nie zawsze jest łatwe odróżnienie ich przy użyciu konwencjonalnych metod diagnostycznych (8, 10, 18).

Wraz z rozwojem metod biologii molekularnej opracowano czule i swoiste testy, które znajdują coraz szersze zastosowanie w identyfikacji laseczek *B. anthracis*. Podstawową metodą stosowaną w diagnostyce *B. anthracis* jest PCR. Metoda ta pozwala na selektywną amplifikację wybranych fragmentów DNA (15). Dzięki swoistym starterom możliwe jest wykrycie genów *B. anthracis* zlokalizowanych w DNA plazmidu pXO1, tj. genu pag, genu lef oraz genu cya kodującego czynnik obrzęku EF (edema factor) (1, 3, 11, 13, 16, 25, 27). W drugim plazmidzie pXO2 zlokalizowane są natomiast sekwencje genu cap (A, B i C), odpowiedzialnego za wytwarzanie otoczki (12, 25, 26). Stwierdzenie u *B. anthracis* obecności wspomnianych dwu plazmidów świadczy o wirulencji badanego szczepu, co ma wartość diagnostyczną (5, 9, 17).

Konwencjonalne testy PCR nie zostały powszechnie wdrożone w laboratoriach w związku z czasochłonnością i pracochłonną procedurą obejmującą przygotowanie próbki, amplifikację i potwierdzenie produktu. Zastosowanie Real-time PCR pozwoliło na zwiększenie czułości, skuteczności metody oraz na skrócenie czasu oczekiwania na wynik. Real-time PCR umożliwia monitorowanie ilości produktu w każdym cyklu prowadzonej reakcji, dzięki czemu cała procedura analizy jest szybka. W metodzie tej amplifikacja kwasów nukleinowych i detekcja produktu dokonywana jest w tej samej, zamkniętej próbówce, zmniejsza to ryzyko kontaminacji próbki (7). W miarę przyrastania ilości kopii amplifikowanego produktu zwiększa się w czasie rzeczywistym fluorescencja próbki. Pomiar fluorescencji w trakcie trwania reakcji PCR pozwala na oszacowanie ilości kopii amplifikowanego fragmentu DNA. Do uzyskania sygnału fluorescencji mogą być wykorzystywane barwniki interkalujące, które emitują światło o określonej długości po związaniu z dwuniciowym DNA, jak SYBR Green I (niespecyficzne wykrywanie produktu). Drugim wariantem techniki Real-time PCR, który pozwala na specyficzne wykrywanie produktu z wykorzystaniem zjawiska transferu energii rezonansu fluorescencji, jest zastosowanie hybrydujących sond np. typu TaqMan (14, 22).

Celem prezentowanych badań było zastosowanie metody Real-time PCR, opartej na fluorescencji barwnika SYBR Green I emitującego światło w przypadku związania z dwuniciowym DNA, do wykrywania genów zlokalizowanych w DNA plazmidów pXO1 (gen pag) i pXO2 (gen cap-C) oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej rpoB szczepów *B. anthracis* (5, 19).

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 z 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 temperaturze 37°C. Hodowlę bakteryjną wirowano przez 10 min. przy 7500 obr./min. Supernatant usuwano, a osadu 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. W oparciu o dane z piśmiennictwa wybrano sekwencje starterów do amplifikacji (5). Charakterystykę starterów do reakcji przedstawiono w tabeli 1. Startery zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA IBB PAN.

Real-time PCR. Reakcję prowadzono w próbkach optycznych MicroAmp Optical Tube zamykanych wieczkami optycznymi Optical Caps (Applied Biosystems). W badaniach zastosowano zestaw QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen), będący mieszaniną polimerazy HotStarTaq, buforu QuantiTect SYBR Green PCR, dNTP, 5 mM MgCl₂ oraz barwników SYBR Green I (barwnik interkalujący) i ROX (barwnik referencyjny).

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

Startery		Sekwencja	Wielkość produktu	Koncentracja
rpoB	rpoB-S	CCACCAACGTACAAATGCC	175 pz	0,1 µM
	rpoB-R	AAATTCACCAGTTTCTGGATCT		
pag	PA-S	CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA	204 pz	0,5 µM
	PA-R	CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT		
Cap-C	Cap-S	ACGTATGGTGTTCAGATTTCATG	291 pz	1,0 µM
	Cap-R	ATTTTCGTCTCATTCTACCTCACC		

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 oraz 0,1 μ M każdego primera.

Amplifikację z zastosowaniem starterów PA-S i PA-R przeprowadzono w objętości 25 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 500 ng DNA oraz 0,5 μ M każdego primera.

Kolejny test oparty na wykryciu genu cap-C kodującego otoczkę przeprowadzono w objętości 25 μ l mieszaniny reakcyjnej, która zawierała 500 ng DNA oraz 1 μ M primery cap-S i cap-R.

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

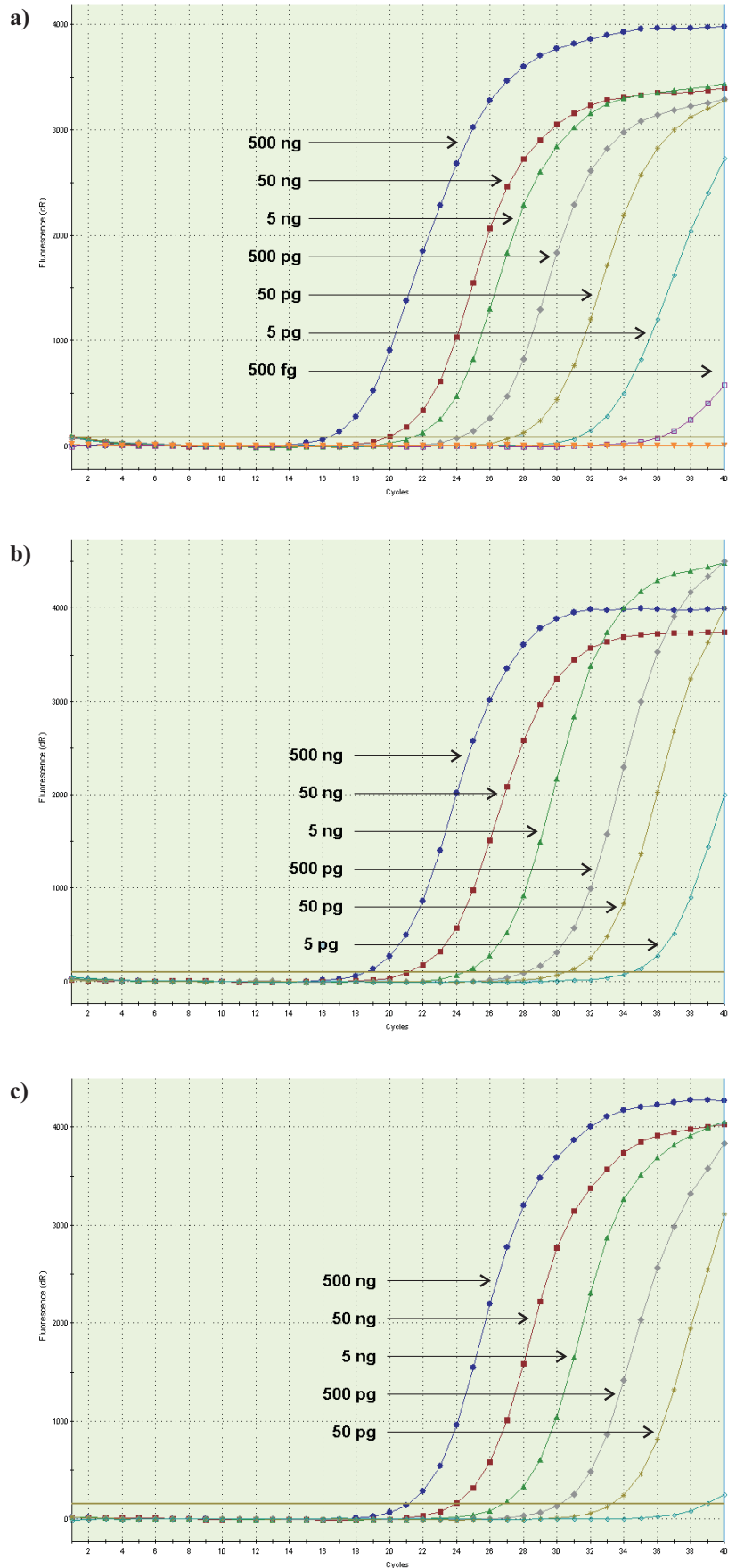
Reakcje Real-time PCR prowadzono w aparacie Mx3005P[®] (Stratagene) z oprogramowaniem MxPro – Mx3005P v3.20. We wstępnym etapie próbki reakcyjne inkubowano przez 10 min. w 95°C w celu aktywacji polimerazy Hot-StarTaq i wstępnej denaturacji matrycy DNA. Właściwa amplifikacja obejmowała 40 cykli denaturacji, hybrydyzacji i wydłużania starterów (30 sek./95°C, 60 sek./55°C, 90 sek./72°C), po czym próbki poddawano 1 min. inkubacji w temperaturze 95°C. Pomiar fluorescencji mieszaniny reakcyjnej wykonywano na etapie wydłużania starterów. Następnie, w celu potwierdzenia swoistości amplifikacji, określano temperaturę topnienia produktów PCR poprzez stopniowe podnoszenie temperatury mieszaniny reakcyjnej z 55°C do 95°C i ciągły pomiar fluorescencji.

Wyniki i omówienie

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

W pierwszym etapie pracy wykonywano test Real-time PCR na obecność sekwencji chromosomalnej rpoB. Uzyskane wartości Ct wahały się w granicach od 16,37 do 36,08. Swoistość amplifikacji potwierdzono określając temperaturę topnienia produktu PCR. Wykazano, że temperatura topnienia produktów syntetyzowanych w reakcji wynosiła 78°C.

Na podstawie obserwacji krzywych amplifikacji w reakcji polimeryzacji łańcuchowej z zastosowaniem starterów PA-S i PA-R stwierdzono obecność badanego genu pag zlokalizowanego w DNA plazmidu pXO1. Uzyskane wartości Ct wahały się w granicach 21,53-37,45. Swoistość amplifikacji potwierdzono określając temperaturę topnienia produktu PCR. Wykazano, że temperatura topnienia produktów syntetyzowanych w reakcji wynosiła 79°C.



Ryc. 1. Oznaczenie czułości reakcji Real-time PCR z zastosowaniem barwnika SYBR Green I. Krzywe wzrostu fluorescencji w poddanych amplifikacji próbkach rozcieńczeń dziesiętnych DNA ze szczepu *Bacillus anthracis* BS4 z zastosowaniem starterów: a) rpoB-S i rpoB-R; b) PA-S i PA-R; c) cap-S i cap-R

W przypadku wykrycia genu *cap-C* *B. anthracis* zlokalizowanego w DNA plazmidu pXO2 uzyskane wartości Ct wynosiły 20,04-32,8. Specyficzne produkty amplifikacji dysocjują w temperaturze 76°C.

Oznaczono również czułość reakcji Real-time PCR. Jak widać na ryc. 1a, czułość testu z zastosowaniem starterów rpoB-S i rpoB-R określono wyrażając ją jako ilość wykrywanego DNA na przeprowadzoną reakcję na poziomie 500 fg/reakcję. Dla amplifikacji rozcieńczeń matrycy zawierających od 500 ng do 500 fg DNA wykazano wysoki współczynnik regresji wynoszący 0,993.

Czułość reakcji z zastosowaniem primerów PA-S i PA-R określono na poziomie 5 pg/reakcję (ryc. 1b). Współczynnik regresji 0,997 wskazuje na wysoki stopień liniowości reakcji.

W przypadku zastosowania starterów *cap-S* i *cap-R* wykazano, że czułość wynosiła 50 pg/reakcję (ryc. 1c). Współczynnik regresji określający zależność między ilością DNA w ng wyrażoną w skali logarytmicznej i wartością Ct wynosił 0,996.

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* 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 2 przedstawiono zestawienie wyników specyficzności reakcji PCR pozwalającej na wykrycie genu *pag*, genu *cap-C* oraz stwierdzenia obecności sekwencji chromosomalnej *rpoB*.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 2, ocena specyficzności testu pozwalająca na stwierdzenie obecności sekwencji chromosomalnej *rpoB* wykazała, że w teście PCR uzyskano produkty specyficzne dla *B. anthracis* oraz 2 szczepów *B. cereus*. Dzieje się tak z powodu bliskiego pokrewieństwa genetycznego tych gatunków (2). Jednakże w przypadku szczepów *B. cereus* uzyskane wartości Ct wynosiły więcej niż 30. Również Ellerbrok i wsp. (5) wykazali obecność sekwencji chromosomalnej u czterech spośród pięciu badanych szczepów *B. cereus*. Dla *B. cereus* wartości Ct zaobserwowali 10 cykli później niż w przypadku *B. anthracis*, chociaż próbki zawierały porównywalną liczbę bakterii. W pracy własnej, podobnie jak w badaniach przeprowadzonych przez Bode i wsp. (2) u izolatów innych gatunków drobnoustrojów nie stwierdzono obecności sekwencji chromosomalnej *rpoB*.

W przypadku zastosowania zestawów starterów swoistych dla genu *pag* oraz genu *cap-C* wykazano dużą specyficzność reakcji. Uzyskano produkty specyficzne dla *B. anthracis*. U izolatów różnych gatun-

Tab. 2. Ocena specyficzności reakcji Real-time z zastosowaniem starterów *rpoB*, *PA*, *Cap-C*

Szczepy	rpoB	PA	Cap-C
<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 typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-

Objaśnienia: + wynik dodatni; (+) wynik dodatni (Ct > 30); - wynik ujemny

ków z rodzaju *Bacillus* oraz szczepów sześciu innych drobnoustrojów nie stwierdzono obecności produktów reakcji PCR. Także Ellerbrok i wsp. (5), badając szczepy *B. anthracis* i innych gatunków z rodzaju *Bacillus*, wykazali 100% specyficzność reakcji.

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. W celu oznaczenia początkowej liczby kopii badanej sekwencji wyznacza się wartość progową fluorescencji Ct (threshold cycle). Im więcej kopii matrycy w badanej próbce było w momencie rozpoczęcia reakcji, tym mniej cykli reakcji PCR potrzeba, aby poziom fluorescencji pochodzący z powstających produktów przekroczył wartość Ct. Zastosowanie barwnika SYBR Green I sprawia, że również nieswoiste produkty amplifikacji (np. dimery starterów PCR) są źródłem fluorescencji. Z tego powodu konieczna jest analiza krzywych topnienia produktów w celu określenia swoistości amplifikacji (20, 23).

Reasumując, zastosowanie metody Real-time PCR opartej na fluorescencji barwnika SYBR Green I emitującego światło w przypadku interkalacji z dwuniciowym DNA do wykrywania genów zlokalizowanych w DNA plazmidów pXO1 i pXO2 oraz specyficznej sekwencji chromosomalnej *rpoB* pozwoliło na wykrycie wszystkich badanych genów na podstawie obserwacji krzywych amplifikacji. Wykazano, że testy Real-time PCR charakteryzowały się wysoką czułością i specyficznością. Swoistość testów potwierdzono

określając temperatury topnienia produktów PCR. Czulość i liniowość reakcji określono korzystając ze współczynnika regresji (23).

W celu pełnego wykorzystania zalet metody Real-time PCR do identyfikacji laseczek *B. anthracis* do dalszych badań zostaną użyte sondy typu TaqMan. Wykorzystanie znakowanych fluorescencyjnie sond może dodatkowo wpłynąć na zwiększenie czulości i specyficzności metody (7, 22).

Piśmiennictwo

1. Adone R., Pasquali P., La Rosa G., Marianelli C., Muscillo M., Fasanella A., Francia M., Ciuchini F.: Sequence analysis of the genes encoding for the major virulence factors of *Bacillus anthracis* vaccine strain Carbovap. J. Appl. Microbiol. 2002, 93, 117-121.
2. 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.
3. Bragg T. S., Robertson D. L.: Nucleotide sequence of the lethal factor gene from *Bacillus anthracis*. Gene 1989, 81, 45-54.
4. Dixon T. C., Meselson M., Guillemin J., Hanne P. C.: Anthrax. N. Engl. J. Med. 1999, 341, 815-826.
5. Ellerbrok H., Nettermann H., Özel M., Beutin L., Appel B., Pauli G.: Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. FEMS Microbiol. Lett. 2002, 214, 51-59.
6. Franz D. R., Jahrling P. B., Friedlander A. M., Clain D. J., Hooven D. L., Bryne W. R., Pavlin J. A., Christoper G. W., Eitzen E. B.: Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. JAMA 1997, 278, 399-411.
7. Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M.: Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996, 6, 986-994.
8. Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstro A. B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 2627-2630.
9. Kaspar R. L., Robertson D. L.: Purification and physical analysis of *Bacillus anthracis* plasmids pXO1 and pXO2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987, 149, 362-368.
10. Keim P., Klevytska A. M., Price L. B., Schupp J. M., Zinser G., Smith K. L., Hugh-Jones M. E., Okinaka R., Hill H. K., Jackson P. J.: Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. J. Appl. Microbiol. 1999, 87, 215-217.
11. Makino S., Cheun H. I., Watarai M., Uchida I., Takeshi K.: Detection of anthrax spores from air by real-time PCR. Let. Appl. Microbiol. 2001, 33, 237-240.
12. Makino S., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M.: Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 1989, 171, 722-730.
13. Mikesell P., Ivins B. E., Ristrop J. D., Dreier T. M.: Evidence for plasmid mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1983, 39, 371-376.
14. Morrison T. B., Weis J. J., Wittwer C. T.: Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques 1998, 24, 954-962.
15. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification and detection of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Biotechnology 1992, 24, 17-27.
16. Okinaka R., Cloud K., Hampton O., Hoffmaster A. R., Hill K. K., Keim P., Koehler T. M., Lamke G., Kumano S., Mahillon J., Manter D., Martinez Y., Ricke D., Svensson R., Jackson P. J.: Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. J. Bacteriol. 1999, 181, 6509-6515.
17. Okinaka R., Cloud K., Hampton O., Hoffmaster A. R., Hill K. K., Keim P., Koehler T. M., Lamke G., Kumano S., Manter D., Martinez Y., Ricke D., Svensson R., Jackson P. J.: Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2. J. Appl. Microbiol. 1999, 87, 261-262.
18. Prince L. B., Hugh-Jones M., Jackson P. J., Keim P.: Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 1999, 181, 2358-2362.
19. Qi Y., Patra G., Liang X., Williams L. E., Rose S., Redkar R. J., DelVecchio V. G.: 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.
20. Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 1997, 245, 154-160.
21. Shafazand S., Doyle R., Ruoss S., Weinacker A., Raffin T. A.: Inhalation anthrax: epidemiology, diagnosis and management. Chest. 1999, 116, 1369-1376.
22. Stadejek T.: Postęp w rozwoju techniki cyklicznej polimeryzacji DNA in vitro – Real-Time PCR. Medycyna Wet. 2006, 62, 390-394.
23. Stadejek T., Janicka K., Pejsak Z.: Zastosowanie Real-Time PCR do wykrywania zakażeń pestiwirusowych. Medycyna Wet. 2006, 62, 165-169.
24. Turnbull P.: Anthrax in Humans and Animals. WHO, Genewa 2008.
25. Turnbull P. C., Hutson R. A., Ward M. J., Jones M. N., Quinn C. P., Finnie N. J., Duggleby C. J., Kramer J. M., Melling J.: *Bacillus anthracis* but not always anthrax. J. Appl. Bacteriol. 1992, 72, 21-28.
26. 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.
27. Welkos S. L.: Plasmid – associated virulence factors of non-toxigenic (pXO1) *Bacillus anthracis*. Microb. Pathog. 1991, 10, 183-198.

Adres autora: lek. wet. Sylwia Budniak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: sylwia.budniak@piwet.pulawy.pl