

Francisella tularensis – patogen zwierząt i ludzi oraz broń biologiczna

Zdzisław Gliński, Andrzej Żmuda

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

F Francisella tularensis jest fakultatywnym wewnątrzkomórkowym patogenem wielu gatunków zwierząt. Cechuje się przy tym właściwościami zoonotycznymi, a ponadto – ze względu na swoje właściwości – jest potencjalną bronią biologiczną (1). *F. tularensis* atakuje ok. 190 gatunków ssaków, 23 gatunki ptaków oraz 3 gatunki płazów, ryby, bezkręgowce i pierwotniaki (2). Chorują przede wszystkim zajęczaki (króliki, zajęce, dzikie króliki, szczekuszki) i gryznie, zwłaszcza nornikowate (norniki, piżmaki), a także zwierzęta domowe (owce, konie, króliki, świny, kury), zwierzęta towarzyszące człowiekowi (psy, koty) oraz wiele gatunków zwierząt nieudomowionych, jak wilki, lisy, niedźwiedzie, łasice, jeno-ty, wiele gatunków ptaków (przepiórki, kuropatwy, wróble, wrony, sępy, myszołowy), a także niektóre gatunki bezkręgowców (3, 4, 5). Tularemia występuje endemicznie na półkuli północnej, jest też przyczyną epizootii w wielu krajach Ameryki i Europy, a także wywołuje sporadycznych infekcje w Europie i Azji. Rzadko tularemia występuje w tropikach i na półkuli południowej (3).

Tularemia jest typową zoonozą, przebiega w postaci wrzodząco-węzłowej lub węzłowej, płucnej, węzłowo-ocznej i trzewnej (durowej), często o ciężkim przebiegu, przy czym zakażenie *F. tularensis* typu A przebiega gwałtownie, może kończyć się szokiem septycznym i zgonem (6).

Broń biologiczna jest bronią masowego rażenia, w której wykorzystuje się patogenne bakterie, wirusy i toksyny biologicznego pochodzenia (botulina, ryцина). Tularemia należy do kategorii A broni biologicznych razem z wąglikiem, botulizmem, chorobą marburską, wirusem ebola, dżumą i ospą prawdziwą (7, 8). Przed produkcją i masowym zastosowaniem broni biologicznej jako bardzo groźnej, skutecznej i masowo niszczącej ludzi, zwierzęta lub uprawy roślin przestrzegano zaraz po I wojnie światowej:

Jest więcej niż pewne, że niejedno laboratorium bada możliwości systematycznego wyniszczenia ludzi oraz zwierząt przy pomocy zarazy. Rdza zbożowa niszcząca plony, karbunkul zabijający konie i bydło, zarazy zatruwające nie tylko armie, lecz całe dystrykty – tą właśnie drogą wiedza wojskowa kroczy bezlitośnie naprzód (9).

Niestety te słowa sprawdziły się w pełni w czasie II wojny światowej i po niej.

Francisella tularensis, określona pierwotnie jako *Bacterium tularense*, przyczyna nowej choroby, została wyizolowana w 1911 r. podczas badania dżumy dymienicznej u wiewiórek. Okazało się w badaniach

Francisella tularensis – the pathogen of animals, humans and the biological weapon

Gliński Z., Żmuda A., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Tularemia remains an important zoonosis as well as primary pathogen of wild and domestic animals. It is caused by a small, aerobic, facultatively intracellular, Gram-negative coccobacillus, *Francisella tularensis*. The species consists of four recognized subspecies: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (formerly type A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (formerly type B), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* and *F. tularensis* subsp. *novicida*. Although the organism is pathogenic to 190 animal species, clinical cases are associated mainly with lagomorphs and rodents. Tularemia can take multiple clinical forms depending on the portal of entry. It is plague-like and for humans the infectious dose is very low. The natural reservoirs are mice, muskrats, water rats, ground squirrels, voles and rabbits. In humans infection by *F. tularensis* occurs primarily after inadvertent exposure to infected wildlife species, most frequently rodents, hares, and rabbits. Transmission to animals and humans occurs through arthropod or insect vectors, via direct contact, by ingestion or by inhalation of aerosolized organisms. *F. tularensis* invades macrophages and spreads to regional lymph nodes causing inflammatory lesions resembling buboes encountered in plague. The organism disseminates throughout the body to the internal organs, reaching lungs, spleen, liver and kidneys. At the final, sepsis stage, the secretory changes develop, taking ulceroglandular form of tularemia. In sheep clinical signs include fever, rigid gait, diarrhea, frequent urination, weight loss, and difficulty breathing. In humans the ulceroglandular tularemia is the most common form of disease and usually occurs following a tick or deer fly bite or after handling of an infected animal. The most serious form is pulmonary and typhoid form of tularemia. Oropharyngeal form results from eating or drinking contaminated food or water. PCR, RT-PCR, a specific fluorescent antibody test or immunohistochemistry are safe and convenient methods for detection and identification of *F. tularensis* in clinical specimens. Serological tests (slide agglutination test, tube agglutination test, microagglutination test and ELISA), are useful for diagnosing human infection, but are of limited value in the more susceptible animal species that usually die before developing antibodies. The organism is considered as a serious potential bioterrorist threat and is classified as Category A select agent.

Keywords: tularemia, epidemiology, pathogen, clinical manifestations, biological weapon, control.

eksperymentalnych, że jest ona chorobotwórcza dla innych zwierząt. W 1919 r. Edward Francis stwierdził, że zakażenie określane jako gorączka much jelenich (deer-fly fever) wywołuje ta sama bakteria, która spowodowała eksperymentalne zachorowania i chorobę nazwał tularemią. Pierwszy przypadek tularemii u człowieka w formie zapalenia oczu i regionalnych węzłów chłonnych opisano u rzeźnika w Ohio w 1911 r., zaś w 1928 r. zdiagnozowano

679 przypadków choroby. Okres wylegania choroby u 259 chorych wynosił średnio 3,5 dni, objawy pojawiały się nagle w postaci gorączki, dreszczy, bólów mięśni i głowy, potów, wymiotów i krańcowego wyczerpania. W 1956 r. indukowano postać wrzodząco-węzłową u wolontariuszy po iniekcji 10 bakterii do przedramienia. W latach 1944–1959 zakaziło się 104 szczepionych pracowników spośród personelu laboratoryjnego, wiele przypadków wywołały produkowane w laboratorium szczepki odporne na streptomycynę. Od 1955 r. są prowadzone badania drogi aerozolowej zakażenia w celu potencjalnego wykorzystania tularemii jako broni biologicznej (1).

Charakterystyka *Francisella tularensis*

F. tularensis jest Gram-ujemnym, pozbawionym ruchu, niezarodnikującym obligatorem tlenowcem o wymiarach 0,2–0,5 µm × 0,7–1,0 µm. Nie wytwarza oksydazy, produkuje niewielkie ilości katalazy, wymaga obecności cysteiny do wzrostu. Jest wewnątrzkomórkowym patogenem, który po wniesieniu do organizmu gospodarza namnaża się w cytoplazmie makrofagów, gdzie aktywuje kaspazy i wydzielanie cytokin prozapalnych (10). Rośnie na większości komercyjnych podłoży z dodatkiem krwi (11). Większość szczepów tworzy biofilm (12). Zjadliwość *F. tularensis* zależy od wielu czynników, wśród nich od LPS, pili, białka błony zewnętrznej, wyspy patogenności, kwaśnej fosfatazy AcpA, katalazy, peroksydazy KatG, dysmutazy nadtlenu SodB. Niska aktywność LPS, ok. 1000 razy słabsza w porównaniu do Gram-ujemnych bakterii jelitowych, wpływa na zmniejszoną aktywność białek wychwytyjących LPS oraz aktywność receptora TLR4/MD-2, czego efektem jest słabsza odpowiedź immunologiczna gospodarza (13). Pili typu IV uczestniczą w kolonizacji organizmu gospodarza, tworzeniu biofilmu i pobieraniu obcego DNA (14). Wyspa patogenności *Francisella* (*Francisella* Pathogenicity Island) warunkuje wzrost zarazka w makrofagach i jego chorobotwórczość dla myszy (15). Białko Tul4 błony zewnętrznej (OMP) stymuluje proliferację limfocytów T, głównie CD4+, produkcję IL-2 oraz IFN-γ (16). Białko AcpA *F. tularensis* hamuje wybuch tlenowy neutrofilii, odgrywa rolę w wewnątrzkomórkowym wzroście, ucieczce z fagosomu i zjadliwości dla zwierząt (17), a KatG odgrywa rolę w neutralizacji aktywnego tlenu i azotu. Szczepki terenowe i szczep *F. tularensis* subsp. *holarctica* o niskiej zjadliwości (LVS) posiadają otoczkę polisacharydową, która chroni bakterie przed niszczeniem działaniem dopełniacza (18). *F. tularensis* przeżywa w wodzie, glebie przez wiele tygodni w obniżonej temperaturze. W wyschniętym sianie i słomie przeżywa około 120 dni, w wysuszonej skórze do 45 dni, w hemolimfie kleszczy i owadów do 240 dni, w tuszkach zajęcy do 133 dni. W zamrożonym mięsie króliczym *F. tularensis* przeżywa wiele lat. W 56–58°C ginie w ciągu 10 min, a po ekspozycji na promienie słoneczne po 30 min. Powszechnie stosowane środki odkażające niszczą *F. tularensis* w ciągu kilku minut.

Na podstawie właściwości hodowlanych, roli epidemiologicznej i zjadliwości dla gospodarzy w obrębie gatunku *Francisella tularensis* wyróżniono dwa typy i cztery podgatunki: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* i *F. tularensis* subsp. *novicida* (19, 20). W oparciu o qPCR wyróżniono *F. tularensis* subsp. *tularensis* subtype A.I., *F. tularensis* subsp. *tularensis* subtype A.II, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida* i blisko z nią spokrewnione *Francisella philomiragia*, *Francisella persica*, *Francisella-like* endosymbionty występujące u kleszczy (21). *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Typ A) zakaża głównie zajęczaki w Ameryce Północnej. Jest bardzo zjadliwa także dla królików i człowieka, u którego wywołuje postać płucną i trzewną choroby. Dawka zakaźna *F. tularensis* subsp. *tularensis* dla człowieka w iniekcji podskórnej wynosi 10 bakterii, natomiast w aerozolu 25 bakterii (22). Większość izolatów tego podgatunku fermentuje glicerol. *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B) wywołuje chorobę najczęściej u zwierząt wodnych (bobry, piżmaki) i nornic w Ameryce Północnej oraz u zajęcy i drobnych gryzoni w Europie i Azji. Zakaża też oposy w Australii. Jest mniej zjadliwa dla ludzi i królików. Szerzy się głównie przez kontakty bezpośrednie i za pośrednictwem wektorów, jakimi są stawonogi (kleszcze, moskity), na drodze inhalacyjnej, za pośrednictwem zanieczyszczonej wody (water-borne) i pokarmu (food-borne; 19, 23). Nie fermentuje glicerolu (20). *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* występuje w Azji Środkowej. Często stwierdza się ten podgatunek u zajęcy i myszokoczek (Gerbillinae), wektorem są kleszcze. Jest mniej zjadliwa dla królików aniżeli *F. tularensis* subsp. *tularensis* (24). Nie wywołuje zakażeń u ludzi (25). *F. tularensis* subsp. *novicida* cechuje się mniejszą zjadliwością aniżeli *F. tularensis* subsp. *tularensis* (25). Wywołuje chorobę o objawach zbliżonych do tularemii u pacjentów z niedoborami immunologicznymi (26). Jest rzadko izolowana, występuje głównie w Ameryce Północnej, Tajlandii, a w ostatnim czasie także w Australii (25, 27). Pomimo różnic w zjadliwości podgatunków *F. tularensis* są one w 95–98% identyczne na poziomie genetycznym (28).

Źródła, wektory i drogi zakażenia

Głównym źródłem zakażenia *F. tularensis* są chore lub będące nosicielami gryzonie i zajęczaki, które okresowo wydalają zarazek z wydalninami wydzielanymi, zanieczyszczając one wodę i produkty stanowiące pokarm dla ludzi i zwierząt. Zagrożeniem stanowią też zwłoki padłych zwierząt. Wektorem zarazka jest wiele gatunków owadów krwiopijnych: komary z rodzaju *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* i *Ochlerotatus excrucians*, bąki Tabanidae (*Tabanus* spp., *Chrisozona* spp. i *Chrisops* spp.; 29) i kleszcze z rodzaju *Dermacentor* (30). W warunkach naturalnych zakażone są też kleszcze z rodzaju *Amblyomma*, *Ixodes* i *Ornithodoros*. W Europie głównym wektorem *F. tularensis* są kleszcze *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Kleszcze przekazują zakażenie transtadialnie

i transowarialnie, dzięki czemu zarazek przechodzi się w okresach międzyepidemicznych (31). Rezerwuarem zarazka są gryzonie (myszy, szczury, nornice), wiewiórki, króliki i zające, a także muchy, komary, kleszcze, pchły, ślelaki, baki, bolimuszka i jusznicza. Wrotami zakażenia są ukłucia wektorów oraz przewód pokarmowy podczas konsumpcji pokarmu i wody zanieczyszczonej przez *F. tularensis*. Możliwe jest zakażenie aerozole pod czas kontaktów bezpośrednich oraz ze środowiska zanieczyszczonego przez zarazek (32).

Człowiek zakaża się *F. tularensis* poprzez bezpośredni kontakt z chorymi zwierzętami i ich tkankami – wtedy wrotami zakażenia jest nieuszkodzona (mieszki włosowe, ujście gruczołów łojowych) i uszkodzona skóra lub spojówki, a także drogą aerogenną, wdychając pył zawierający kał gryzoni zanieczyszczony zarazkiem, drogą pokarmową za pośrednictwem zanieczyszczonego pożywienia i wody oraz przez ukąszenia zakażonych wektorów (33, 34).

Patogeneza

Makrofagi, komórki dendrytyczne, wielojądrzaste neutrofile, hepatocyty, komórki śródbłonna naczyniowego, komórki nabłonka pęcherzyków płucnych typu II są komórkami docelowymi dla *F. tularensis* (35), a przy tym makrofagi są głównym rezerwuarem zarazka w zakażonym organizmie. Bakteria zakaża makrofagi myszy, neutrofile i komórki dendrytyczne człowieka przez receptor dla składnika 3-dopełniacza lub przez receptor mannozowy, namnaża się w cytozolu i powoduje apoptozę komórek (36). Apoptoza może być następstwem uwolnienia w zakażonej komórce mitochondrialnego cytochromu c, aktywacji kaspazy-9 i kaspazy-3 oraz rozszczepienie polimerazy rybozy poli-ADP lub może przebiegać w szlaku inflamasomu kaspazy-1 (37). Szczególny tropizm *F. tularensis* do komórek fagocytujących jest przyczyną uogólnienia zakażenia. W miejscu wniknięcia zarazka w błonę śluzową lub skórę pojawia się ostro zaznaczony odczyn zapalny w postaci grudki, który przechodzi w owrzodzenie. Z wrót zakażenia drogą naczyń chłonnych zarazek przedostaje się najbliższego węzła chłonnego, gdzie po intensywnym namnożeniu w makroflagach powstaje guz. Po przełamaniu odporności zarazek jest rozsiwany z krwią, zakażenie ulega uogólnieniu, dochodzi do zakażenia wielu narządów wewnętrznych, szczególnie wątroby, śledziony, płuc, nerek, błon surowiczych i szpiku kostnego, gdzie powstają liczne ogniska martwicy skrzepowej. U najbardziej wrażliwych zwierząt rozwija się posocznica, zwierzęta padają w ciągu kilku dni. U zwierząt mniej wrażliwych choroba przebiega łagodnie. Likwidacja zakażenia przebiega przy udziale limfocytów TCD4+, TCD8+ i cytokin. Makrofagi w ciągu kilku godzin po zakażeniu produkują i wydzielają cytokiny prozapalne typu Th1: TNF α , INF γ i IL-12 (38). Natomiast swoiste przeciwciała indukowane zakażeniem modulują aktywność cytokin w zakażonym organizmie (39). U ludzi swoiste przeciwciała *anty-F. tularensis* pojawiają się po tygodniu po zakażeniu, ich miano

rośnie wraz z progresją objawów klinicznych (40). Lipopolisacharyd *F. tularensis* jest najważniejszym celem przeciwciał (41). Chronią one przed zakażeniem szczepami o niskiej zjadliwości (42).

Objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne u zwierząt

U gryzoni lądowych i gryzoni wodnych oraz u zajęczaków, które są najbardziej podatne na zakażenie, choroba przebiega najczęściej w formie posocznicy kończącej się po 2–3 dniach padnięciem. U zajęcy i dzikich królików tularemia jest ostrą posocznicową chorobą zakaźną z gorączką, utratą łaknienia, osowiałością, osłabieniem, zaburzeniem akcji serca i oddechów, narastającą dusznością. Rozwija się nieżytowe zapalenie nosa, występuje obrzęk węzłów chłonnych, a pod koniec choroby pojawia się sztywny chód i niezborność ruchów dotycząca głównie kończyn miednicznych. Zwierzęta padają po 1–3 dniach. U zwierząt mniej wrażliwych tularemia ma łagodny przebieg. Na czoło objawów klinicznych wysuwa się powiększenie węzłów chłonnych. W podostrej postaci choroby, która występuje rzadziej i może trwać długo, obserwuje się utratę łaknienia, biegunkę, bladeść błon śluzowych, powiększenie węzłów chłonnych i postępujące wyniszczenie.

U większości gatunków zwierząt hodowlanych choroba ma przebieg subkliniczny i prowadzi do wyniszczenia (43). O infekcji świadczy serokonwersja. Jednak u owiec *F. tularensis* subsp. *tularensis* wywołuje chorobę o ostrym przebiegu i wysokiej śmiertelności. Rzadko tularemia ma jawny przebieg u psów i kotów (44). W postaci jawnej choroby u jednego psa występowała gorączka, utrata łaknienia, powiększenie węzłów chłonnych. Objawy ustąpiły po pięciu dniach. Chorobę u drugiego psa cechowała pojawiające się nagle utrata apetytu i osłabienie (45). Koty chorowały albo wśród objawów gorączki (39,6°C), osowienia, utraty apetytu, odwodnienia lub wymiotów, zawsze ulegały powiększeniu węzły chłonne i wątroba (46).

Na sekcji stwierdza się ogniska martwicy i owrzodzenia skóry. Węzły chłonne są powiększone, na przekroju suche, wypełnione serową masą z guzkami barwy szarobiałej, które z łatwością dają się wyłuskać. W guzkach dominują zmiany martwicze cechujące się rozpadem jąder komórkowych. W silnie powiększonych wątrobie, śledzionie i nerkach występują prosówkowe lub większe martwicze guzki. Rozsiane guzki martwicze mogą występować też w płucach i na opłucnej. U gatunków zwierząt mniej wrażliwych na zakażenie *F. tularensis* występują ziarniniaki, często z ogniskami martwicy w płucach, nasierdziu, nerkach, śledzionie i wątrobie, w których oprócz makroflagów mogą występować limfocyty, granulocyty, komórki wielojądrzaste (3, 47). W postaci posocznicowej choroby oprócz zmian w wątrobie, śledzionie i nerkach występują ogniska martwicy w szpiku kostnym, w obrzękłych płucach występują obszary konsolidacji, włóknikowe zapalenie płuc lub opłucnej. W jamie brzusznej mogą występować złogi włóknika.

Na sekcji kotów w silnie powiększonej śledzionie występowały nekrotyczne guzki o średnicy 1–2 mm barwy białej do szarej, zagardłowe i krezkowe węzły chłonne były silnie powiększone. W preparatach mikroskopowych śledziona stwierdza się zatarcie prawidłowej struktury, w miazdze białej liczne ogniska martwicy i zanik tkanki limfoidalnej. Liczne ogniska martwicy występują też w węzłach chłonnych zagardłowych i krezkowych.

Tularemia jako zoonoza

Tularemia jest groźną zoonozą (29). W 2010 r. w Unii Europejskiej na tularemię chorowało 800 osób (48). Choroba występuje w USA, Kanadzie, Meksyku i Azji. W krajach skandynawskich i Rosji stanowi wciąż poważny problem epidemiologiczny. Największą liczbę zachorowań notuje się w Szwecji i w Finlandii, gdzie najważniejszym źródłem zakażenia jest woda strumieni, jezior i rzek, mniejszą rolę odgrywają kleszcze *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna* i *Ixodes ricinus*. W Polsce po raz pierwszy tularemię rozpoznano u człowieka w 1949 r., a przypuszczalnie źródłem zakażenia była skórka zająca. Co roku rejestruje się w Polsce pojedyncze zachorowania, głównie w rejonach endemicznych. W Polsce w latach 1949–2009 na tularemię zachorowało 614 osób (49). W Unii Europejskiej w 2019 r. stwierdzono 1463 potwierdzone przypadki tulareмии (0,3 przypadki / 100 tys. osób). Stosunek zachorowań mężczyzn do kobiet wynosi 1,5 : 1,0 we wszystkich grupach wiekowych, z wyjątkiem dzieci w wieku 0–4 lata. Odsetek chorych rośnie wraz z wiekiem, osiągając maksimum dla grupy wiekowej 45–64 lata.

W Europie Środkowej najważniejszym wektorem *F. tularensis* są *D. reticulatus* i *I. ricinus* (50). Oprócz pośrednictwa wektorów człowiek zakaża się przez kontakt bezpośredni z chorymi zwierzętami, podczas skórowania i rozbiórki tuszy, drogą pokarmową, spożywając mięso chorych zwierząt niepoddane odpowiedniej obróbce termicznej lub zanieczyszczony moczem i kałem chorych gryzoni. Postacie wrzodziejąco-węzłowa lub węzłowa są następstwem zakażenia przez skórę, postać anginowa przez jamę ustną, płucna jest efektem zakażenia aerozolu za pośrednictwem pyłu zawierającego kał gryzoni zakażonych *F. tularensis* (34, 51). W transmisji choroby z kota na człowieka najważniejsze role odgrywają ugryzienia i zadrapania skóry, z psa na człowieka – rany z pogryzienia, lizanie i ślinienie, zakażone kleszcze oraz zwłoki chorych psów i kotów (52).

Okres wylegania choroby wynosi kilka dni. Pierwsze objawy są nieswoiste, występują dreszcze, gorączka, bóle głowy i złe samopoczucie. W zależności od wrót zakażenia i podgatunku *F. tularensis* rozwija się postać choroby z określonymi objawami klinicznymi (53). Postać wrzodziejąco-węzłowa lub węzłowa, będąca następstwem zakażenia przez skórę, stanowią ponad 90% wszystkich przypadków tulareмии w Europie. Postać oczno-węzłowa, która rozwija się w następstwie zakażenia aerogenego lub zatarcia oczu palcami zanieczyszczonymi zarazkiem, stanowi

od jednego do kilku procent przypadków tulareмии. Cechuje się ona zazwyczaj zapaleniem spojówek jednego oka, obrzękiem powiek, fotofobią i ropnym wydzieleniem z worka spojówkowego.

W postaci wrzodziejąco-węzłowej lub węzłowej w miejscu infekcji rozwija się na skórze pierwotny odczyn zapalny w postaci grudki, który następnie przechodzi w owrzodzenie. Często te objawy ustępują w ciągu tygodnia. Następnie pojawia się w 30–40% przypadków obrzęk i zropienie regionalnych węzłów i naczyń chłonnych (1). Najcięższy przebieg ma postać płucna i trzewna (durowa) choroby (54).

Postać płucna pierwotna rozwija się w następstwie zakażenia inhalacyjnego i przebiega albo z objawami zapalenia płuc, takimi jak suchy kaszel, duszność, bóle w klatce piersiowej i gorączka, lub bez objawów zapalenia płuc. Zapalenie płuc może też wystąpić po dwóch dniach do kilku miesięcy jako powikłanie postaci wrzodziejąco-węzłowej lub trzewnej choroby. Śmiertelność w pierwotnej tulareмии płuc oraz w zapaleniu płuc wikłającym postać trzewną choroby jest wysoka. Zapalenie płuc wywołane przez *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* ma gwałtowny przebieg i może kończyć się szokiem septycznym (postać septyczna) i śmiercią u ponad 50% pacjentów, podczas gdy zapalenie płuc na tle *F. tularensis* subsp. *holarctica* ma łagodny przebieg (6).

Następstwem konsumpcji zakażonego pożywienia lub wody jest postać anginowa charakteryzująca się zapaleniem i owrzodzeniem jamy ustnej, zapaleniem gardła i powiększeniem szyjnych węzłów chłonnych. Postać durowa choroby występuje w mniej niż 5% przypadków. Do najcięższych objawów choroby należą wysoka gorączka (do 40°C), dreszcze bóle głowy i mięśni, ogólne osłabienie, suchy kaszel, bóle w klatce piersiowej. Może wystąpić biegunka. Często, bo u 50–80% pacjentów, rozwija się wtórne zapalenie płuc z dusznością i ropną płwociną. Śmiertelność sięga 50% (55). *F. tularensis* może również wywoływać zapalenie wsierdzia (56).

Rozpoznanie

Wstępne rozpoznanie choroby u zwierząt jest możliwe w oparciu o endemiczne jej występowanie, zmiany, w mniejszym zakresie o objawy kliniczne. Ostateczna diagnoza opiera się o izolację *F. tularensis*, wykrycie materiału genetycznego zarazka testem PCR (57), RT-PCR (58) w materiale biologicznym, jego identyfikację przy użyciu testu immunofluorescencji (59), testu immunohistochemicznego (60) lub techniką MALDI-TOF MS (61) w preparatach odciskowych ze zmian patologicznych. Zarazek izoluje się z punktu powiększonych węzłów chłonnych i ropni żywych zwierząt oraz ze zmian patologicznych padłych zwierząt na podłożu Francisca, McConkeya i Chapina, zmodyfikowanym agarze Thayer-Martin, podłożu CHAB (bulion z wyciągiem z serca, cysteiną i krwią) z dodatkiem antybiotyków. *F. tularensis* rośnie w postaci drobnych przejrzystych kolonii po 48 godz. inkubacji w 37°C.

Testy serologiczne są bardzo przydatne w diagnostyce tularemii u ludzi, mniej przydatne u bardzo wrażliwych gatunków zwierząt, ponieważ zwierzęta mniej wrażliwe padają przed serokonwersją. Testy serologiczne natomiast są zalecane do diagnostyki u owiec, bydła, świń, psów, kotów, nieudomowionych zwierząt kopytnych, lisów i dzików. Można je też stosować w diagnostyce tularemii u zający i gryzoni. WOAH zaleca do potwierdzenia przypadków klinicznych choroby izolację bakterii, wykrycie antygeny zarazka, test PCR i RT-PCR. Test RT-PCR jest też wykorzystywany w nadzorze (3). Z testów serologicznych stosuje się test aglutynacji szkiełkowej, aglutynacji próbówkowej, a najczęściej jest zalecany test mikroaglutynacji (62), test immunofluorescencji i ELISA (62). Dwa ostatnie testy cechują się zbliżoną czułością i swoistością. ELISA umożliwia wykrycie choroby po dwóch tygodniach po zakażeniu (63). Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt zaleca test aglutynacji szkiełkowej do oceny populacji zwierząt wolnej od zakażenia, wszystkie cztery testy serologiczne do badania poszczególnych zwierząt przed transportem i monitoringu infekcji (surveillance), natomiast test aglutynacji próbówkowej i mikroaglutynacji do potwierdzenia klinicznej choroby.

Próbę biologiczną wykonuje się na świnkach morskich i białych myszkach zakażonych śródskórnie lub dootrzewnowo zawieszoną ziarniniaków, homogenatem wątroby lub śledziony. W próbie dodatniej zwierzęta padają po 2–10 dniach po zakażeniu. *F. tularensis* izoluje się ze krwi pobranej z serca oraz ze szpiku kostnego padłych zwierząt (64).

Rozpoznanie węzłowej postaci tularemii u ludzi w oparciu o objawy kliniczne i wywiad epidemiologiczny jest łatwe. Inne postacie choroby wymagają potwierdzenia badaniem laboratoryjnym. Obejmują one izolowanie zarazka oraz badanie testem RT-PCR lub immunofluorescencji wymazów z nosogardzieli lub zeszkrobiny z owrzodzeń, aspiratu węzłów chłonnych lub biopłatów węzłów chłonnych i wysięku opłucnowego. Pomocne jest badanie surowicy krwi na obecność przeciwciał dla pałeczki tularemii w klasie IgM lub IgG w badaniu par surowic w odstępie 2–3 tyg. Pierwsze badanie należy przeprowadzić krwią pobraną w ostrej fazie choroby. Wartość diagnostyczną posiada skórny test alergiczny.

Postępowanie

Tularemia znajduje się w wykazie chorób zakaźnych zwierząt zgłaszanych do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH). W Polsce znajduje się w wykazie chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi rejestracji (65). Znajduje się też w wykazie chorób zakaźnych i zakażeń człowieka (66). Zapobieganie tularemii polega na unieszkodliwieniu źródła zakażenia oraz przecięciu dróg rozprzestrzeniania się choroby, jest realizowane przez zwalczanie gryzoni, przestrzeganie zasad higieny, unieszkodliwianie zwłok zwierząt, zachowanie szczególnego bezpieczeństwa podczas skórowania zający (rękawice gumowe, maska), zabezpieczenie

produktów spożywczych i wody przed dostępem gryzoni, gotowanie wody przed spożyciem, obróbka termiczna pokarmu. Chore zwierzęta podlegają izolacji, zabiciu i utylizacji (palenie lub grzebanie po uprzednim zanurzeniu padłego zwierzęcia w roztworze 3–5% lizolu w celu likwidacji ektopasożytów). Pomieszczenia dla zwierząt podlegają odkażeniu 1% roztworem formaliny, 1% trójkreozolu. Dobre efekty daje antybiotykoterapia. Zwierzęta podejrzone o zakażenie szczepi się interwencyjnie szczepionką zawierającą atenuowany szczep *F. tularensis* subsp. *holartica* (LVS; 67).

Badanie na wolontariuszach w USA wykazało, że szczepionka LVS indukuje proliferację limfocytów TCD4+ i TCD8+, głównie podzbioru TCR $\gamma\delta$ +, komórek NK i monocytów (68). Spośród wielu szczepionek będących w fazie oceny przydatności handlowej na uwagę zasługuje szczepionka żywa oparta o mutant Δ pdpC zjadliwego szczepu SCHU P9 *F. tularensis*, która u myszy i małp indukuje wysoki stopień odpowiedzi humoralnej i komórkowej (69) oraz żywe atenuowane szczepionki oparte o szczep SchuS4- Δ clpB i Δ clpB- Δ capB. Według badań *in vivo* przeprowadzonych na szczurach szczepi te cechują się lepszymi właściwościami immunogennymi aniżeli LVS (70). Duże nadzieje budzi też szczepionka z genetycznie zmodyfikowanym antygenem O *F. tularensis* (glucoconjugate vaccine). Szczepionka zawierająca antygen O o dużej masie cząsteczkowej (HMW, 220 kDa) w połączeniu z toksoidem *C. tetani* (HMW-TT) cechuje się dużą immunogennością (71).

Tularemia jako broń biologiczna

Od dawna stosowano różnego rodzaju broń biologiczną. 300 lat p.n.e. Grecy zatruli wodę w studniach nieprzyjaciół przy użyciu rozkładających się zwłok zwierząt. Identyczną taktykę stosowali później Persowie i Rzymianie. W 1155 r. Fryderyk Barbarossa w bitwie pod Tortoną (Włochy) w tym samym celu używał zwłok wojowników i padłych zwierząt. Broń ta, pomimo że wykorzystywała materiał biologiczny, nie odpowiada kryteriom nowoczesnej broni biologicznej stosowanej zwłaszcza w celach terrorystycznych. Według powszechnie przyjętych kryteriów broń biologiczna jest typową bronią masowego rażenia, w której wykorzystuje się patogenne bakterie, wirusy i toksyny pochodzenia biologicznego (botulina, rycyna). Cechuje się dużą skutecznością, często szerokim spektrum działania (ludzie i zwierzęta), niewielkimi kosztami produkcji, słabą wykrywalnością zwłaszcza na początku ataku. Istnieje w wielu przypadkach możliwość jej modyfikacji genetycznej w celu zwiększenia skuteczności działania, posiada często zdolność do samopowieliania się, niekiedy też zdolność przetrwania w środowisku przez dłuższy czas. Można ją zastosować w wielu postaciach do skażenia wody, roślin, w tym – w formie aerozolu. Z reguły istnieje trudność szybkiego wykrycia broni biologicznej na początku jej użycia, często brak jest skutecznego leczenia skutków działania tej broni i możliwości zapobiegania skutkom jej działania przy użyciu szczepionek i/lub surowic

odpornościowych. Do szerzenia się broni biologicznej w populacji ludzi można często wykorzystać zwierzęta towarzyszące człowiekowi, gryzonie, zakażone owady, skażoną wodę i żywność (72, 73). Większość tych kryteriów spełnia *F. tularensis* typ A. Cechuje się ona dużą zjadliwością, łatwo ją wyprodukować takim kosztem w dużych ilościach, jest trudna do wykrycia podczas transportu w porównaniu do innych broni, do ataku można wykorzystać skażoną wodę, żywność, gryzonie, wektory biologiczne i aerozole. Na drodze inżynierii genetycznej otrzymano szczepy wieloantybiotykooporne. W Związku Radzieckim otrzymano szczep oporny na działanie szczepionki anty-*F. tularensis* do wykorzystania jako broń biologiczną (74). Ze względu na różne postaci kliniczne tularemii i na charakter zoonotyczny *F. tularensis* istnieje duża trudność ustalenia przyczyny ataku bioterrorystycznego w początkowym okresie jej zastosowania. Ważną cechą *F. tularensis* jako broni biologicznej jest jej samopowielanie w organizmie chorych, gryzoni i możliwość długotrwałego przetrwania w rezerwuarach biologicznych tego zarazka (73, 75). W 1969 r. WHO zaprezentowała możliwe skutki użycia *F. tularensis* w ataku terrorystycznym. Użycie 50 kg *F. tularensis* typ A w formie aerozolu w ataku na 5-milionowe miasto spowoduje chorobę 250 000 i zgon 19 000 osób. Zachorowania mogą występować w ciągu kilku tygodni, a nawroty choroby w ciągu następnych tygodni lub miesięcy (76).

Przypuszcza się, że *F. tularensis* jako broń była „nieświadomie” wykorzystywana do wywołania epidemii w XIV wieku p.n.e. na obszarze rozciągającym się od Cypru do Iraku, w Izraelu, Syrii i Egipcie, skąd została zawleczona do Anatolii i tam też użyta jako broń biologiczna (77). Wysłunięto nawet hipotezę, że epidemia tularemii w starożytnym Egipcie wpłynęła na losy świata (78). *F. tularensis* była uznana w USA i ZSRR w latach 1940–1950 za jedną z najważniejszych broni biologicznych. W USA była składowana nawet w późnych latach 60. XX wieku (73). Rządy wielu krajów zobowiązały się do zaprzestania produkcji broni biologicznej i zniszczenia jej zapasów. Można jednak przypuszczać, że to zobowiązanie nie jest rygorystycznie przestrzegane.

Piśmiennictwo

- Sjostedt A.: Tularemia: history, epidemiology, pathogen, physiology, and clinical manifestations. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, 1105, 1–29.
- OIE: Report of the meeting of the OIE Working Group on Wildlife Diseases 2003, 9–11 February, Paris OIE.
- WOAH: Tularemia. *OIE Terrestrial Manual* 2022, chap. 3.1.23. 1–9.
- Petersen J.M., Schriefer M.E.: Tularemia: emergence / re-emergence. *Vet Res.* 2005, 36, 455–467.
- Yeni D.K., Bürük F., Ashraf A., Shah M.S.U.D.: Tularemia; a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2020, 28, 1–14.
- Tärnvik A., Berglund L.: Tularemia. *Eur. Resp. J.* 2003, 21, 361–373.
- Frischknacht F.: The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century. *EMBO Rep.* 2003, suppl 1, 47–52.
- Breithaupt H.: Toxins for terrorists. *EMBO Rep.* 2000, 298–301.
- Churchill W.S.: *Wojna Światowa*, tom 1, księga 1, 45. *Phantom Press Int.* Gdańsk 1994.
- Gavrilin M.A., Bouakil I.J., Knatz N.L., Duncan M.D., Hall M.W., Gunn J.S., Wewers M.D.: Inter- and phagosome escape required for Francisella to induce human monocyte IL-1 beta processing and release. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2005, 103, 141–146.
- Marrs C.F., Weir S.: Pili (fimbriae) of *Branhamella* species. *Am. J. Med.* 1990, 14, 36–40.
- Van Hoek M.L.: Biofilms an advancement in our understanding of Francisella species. *Virulence* 2015, 4, 833–846.
- Telepnev M., Golovilov I., Grundstrom T., Tarnvik A., Sjostedt A.: Francisella tularensis inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signaling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2003, 5, 41–51.
- Gil H., Benach J.L., Thanassi D.G.: Presence of pili on the surface of Francisella tularensis. *Infect. Immun.* 2004, 72, 3042–3047.
- Nano F.E., Schmerk C.: The Francisella pathogenicity island. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, 1105, 122–137.
- Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C. Anda P., Ka'mpfer P., Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of Francisella tularensis outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 561–574.
- Mohapatra N.P., Balagopal A., Soni S., Schlesinger L.S., Gunn J.S.: AcpA is a Francisella acid phosphatase that affects intracellular survival and virulence. *Infect. Immun.* 2007, 75, 390–396.
- Sandstrom G., Lofgren S., Tarnvik A.: A capsule-deficient mutant Francisella tularensis LVS inhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1988, 56, 1194–1202.
- Ellis J., Oyston P.C., Green M., Titball R.W.: Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15, 631–636.
- Keim P., Johansson A., Wagner D.M.: Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, 1105, 30–66.
- Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., Dempsey M.P.: Differentiation of Francisella tularensis subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020, 58. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.01495-19>.
- Saslaw S., Eigelsbach H.T., Wilson H.E., Prior J.A., Carhart S.: Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. *Arch. Intern. Med.* 1961, 107, 689–701.
- Markowitz L.E., Hynes N.A., De La Cruz P., Campos E., Barbaree J.M., Plikyatis B., Moosier D.A., Kaufman A.F.: Tick-borne tularemia. *J. Am. Med. Ass.* 1985, 254, 2922–2925.
- Olshufiev N.G., Meshcheryakova I.S.: Intraspecific taxonomy of tularemia agent Francisella tularensis McCoy et Chapin. *J. Hyg. Microbiol. Epidemiol.* 1982, 26, 291–299.
- 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.* 2003, 52, 839–842.
- Hollis D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G., Wenger J.D., Moss C.W., Brenner D.J.: Francisella philomiragia comb. Nov (formerly Yersinia philomiragia) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly Francisella novicida) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 1601–1608.
- Formińska K., Zasada A.A.: Francisella tularensis-podstępny patogen. *Post. Microbiol.* 2017, 56, 187–195.
- Vogler A.J., Keim P.: Phylogeography of Francisella tularensis: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 2474–2484.
- Petersen J.M., Mead P.S., Schriefer M.E.: Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. *Vet. Res.* 2009, 40, 7–14.
- Reese S.M., Dietrich G., Dolan M.C., Sheldon S.W., Piesman J., Petersen J.M.: Transmission dynamics of Francisella tularensis subspecies and clades by nymphal Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010, 83, 645–652.
- Hubálek Z., Sixl W., Halouzka J.: Francisella tularensis in Dermacentor reticulatus ticks from the Czech Republic and Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1998, 110, 909–910.
- Mörner T.: The ecology of tularemia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1992, 11, 1123–1130.
- 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.* 2010, 76, 6929–6836.
- Formińska K., Zasada A.A., Rastawicki W., Śmietańska K., Bander D., Wawrzynowicz-Syczevska 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.* 2015, 22, 443–446.
- Celli J., Zahrt T.C.: Mechanisms of Francisella tularensis intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013, 3, a010314.
- 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.* 2004, 72, 3204–3217.
- Lai X.H., Sjostedt A.: Delineation of the molecular mechanisms of Francisella tularensis-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003, 71, 4642–4646.

38. Bahuaud O., Le Brun C., Lemaigen A.: Host immunity and *Francisella tularensis*: A review of tularemia in immunocompromised patients. *Microorganisms* 2021, 9, 2539.
39. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.A.H.: *Francisella tularensis*; taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006, 60, 167–185.
40. Jacob D., Barduhn A., Tappe D., Rauch J., Heuner K., Hierhammer D., vom Berge K., Riehm J.M., Hanczaruk M., Böhm S., Böhmer M.M., Konrad R., Bouschery B., Dauer M., Schichtl E., Hossain H., Grunow R.: Outbreak of tularemia in a group of hunters in Germany in 2018: Kinetics of antibody and cytokine responses. *Microorganisms* 2020, 8, 1645, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111645>
41. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E.: Vaccines against tularemia. *Hum. Vaccin* 2009, 5, 832–838.
42. Kirimanjeswara G.S., Golden J.M., Bakshi C.S., Metzger D.W.: Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2007, 179, 532–539.
43. Berdal B.P., Mehl R., Meidell N.K., Lorentzen-Styr A.M., Scheel O.: Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 13, 191–291.
44. Feldman K.A.: Tularemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, 222, 725–730.
45. Meinkoth K.R., Morton R.J., Meinkoth J.H.: Naturally occurring tularemia in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, 225, 545–547.
46. Woods J.P., Crystal M.A., Morton R.J., Panciera R.J.: Tularemia in two cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 212, 81–83.
47. Gyuranecz M., Szeredi L., Makrai L., Fodor L., Mészáros A.R., Szépe B., Füleki M., Erdélyi K.: Tularemia of European brown hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 2010, 47, 958–963.
48. Anonim.: Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm, ECDC, 2013, 1–119.
49. ECDC: Tularaemia, *Annual Epidemiol. Rep. for 2019*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tularaemia-annual-epidemiological-report-2019>
50. Hubálek Z., Halouzka J.: Mosquitoes (Diptera: Culicidae), in contrast to ticks (Acari: Ixodidae), do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic. *J. Medical Entomol.* 1997, 34, 660–663.
51. 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.* 2010, 76, 6929–6836.
52. Kwit N.A., Schwartz A., Kugeler K.J., Mead P.S., Nelson C.A.: Human tularemia associated with exposure to domestic dog- United States, 2006–2016. *Zoon. Public Hlth*, 2019, 66, 417–421.
53. Moniuszko A., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grygorczuk A., Czuoryna P.: Arthropod-borne tularemia in Poland: A case report. *Vector Borne Zoon. Dis.* 2015, 10, 1399–1401.
54. Plourde P.J., Embree J., Friesen F., Lindsay G., Williams T.: Glandular tularemia with typhoidal features in a Manitoba child. *Canadian Med. Assoc. J.* 1992, 146, 1953–1955.
55. Klapeč T., Cholewa A.: Tularemia: still dangerous zoonosis. *Med. Og. Nauk Zdr.* 2011, 17, 155–160.
56. Tancik C.A., Dillaha J.A.: *Francisella tularensis* endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 30, 399–400.
57. Barns S.M., Grow C.C., Okinaka R.T., Keim P., Kuske C.R.: Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 5494–5500.
58. Versage J.L., Severin D.D.M., Chu M.C., Petersen J.M.: Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 5492–5499.
59. Morner T.: The use of FA technique of detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. *Acta Vet. Scand.* 1981, 22, 296–306.
60. Gyuranecz M., Szeredi L., Makrai L., Fodor L., Mészáros A.R., Szépe B., Füleki M., Erdélyi K.: Tularemia of European brown hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 2010, 47, 958–963.
61. Lopez-Ramos I., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D., Gutiérrez M.P., Zarzosa P., Orduña A., March G.A.: Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 2020, 177, 106055
62. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W., Sachse K., Araj G., Diller R., Tomaso H.: Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.* 2014, 14, 234.
63. Maurin M.: *Francisella tularensis*, tularemia and serological diagnosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020, 10, 512090.
64. Gyuranecz M., Fodor L., Makrai L., Szoke I., Jánosik K., Krisztalovics K., Erdélyi K.: Generalized tularemia in a velvet monkey (*Chlorocebus aethiops*) and a patas monkey (*Erythrocebus patas*) in a zoo. *J. Diagn. Invest.* 2009, 21, 384–387.
65. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. O ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt, Dz.U. z dnia 20 kwietnia 2004 r.
66. Ustawa z dnia 5 grudnia z grudnia 2008 r. O zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi. Dz.U. 2008 nr 234 poz. 1570.
67. Oystom P.C.F.: *Francisella tularensis* vaccines. *Vaccine* 2009, 27 suppl. 4, 48–51.
68. Fuller C.L., Brittingham K.C., Hepburn M.J., Martin J.W., Pettit P.L., Pittman P.R., Bavari S.: Dominance of human innate immune responses in primary *Francisella tularensis* live vaccine strain vaccination. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117, 1186–1188.
69. Tian D., Uda A., Ami Y., Hotta A., Park E., Nagata N., Iwata-Yoshikawa N., Yamada A., Hirayama K., Miura K., Koyama Y., Azaki M., Morikawa S.: Protective effects of the *Francisella tularensis* ΔpdpC mutant against its virulent parental strain SCHU P9 in Cynomolgus macaques. *Sci. Rep.* 2019, 9, 9193, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45412-8>
70. De Pascalis R., Frey B., Rice H.M., Bhargava V., Wu T.H., Peterson R.L., Conlan J.W., Sjöstedt A., Elkins K.L.: Working correlates of protection predict SchuS4-derived-vaccine candidates with improved efficacy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis*. *NPJ Vaccines* 2022, 7, 95, <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00506-9>
71. Stefanetti G., Okan N., Fink A., Kasper D.L.: Glycoconjugate vaccine using a genetically modified O antigen induces protective antibodies to *Francisella tularensis*. *PNAS* 2019, 116, 7062–7070.
72. Convention on the prohibition of the development, production and stockpiling of bacteriological (biological) and toxin weapons and on their destruction. Conference of the Committee on Disarmament in Geneva, Switzerland, 26 March 1975.
73. Barras V., Greub G.: History of biological warfare and bioterrorism. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20, 497–502.
74. Hirschmann J.V.: From squirrels to biological weapons: The early history of tularemia. *Am. J. Med. Sci.* 2018, 356, 319–328.
75. Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Friedlander A.M., Hauer J., Layton M., Lillibridge S.R., McDade J.E., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker D., Perl T.M., Russel P.K., Tonat K., WGCB.: Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *J. Am. Med. Assoc.* 2001, 285, 2763–2773.
76. WHO: Health aspects of chemical and biological weapons. WHO, Geneva, Switzerland, 1970.
77. Trevisanato S.I.: The 'Hittite plaque' an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare. *Med. Hypotheses* 2007, 69, 1371–1374.
78. Trevisanato S.I.: Did an epidemic of tularemia in Ancient Egypt affect the course of world history? *Med. Hypotheses* 2014, 63, 905–910.