

Výskyt *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* v hematofágních členovcích na Břeclavsku v roce 2022

Mravcová K.¹, Zdražilová S.^{1,2}, Vlčková I.³, Orliková H.^{3,4}, Malý M.³, Kynčl J.^{3,4}, Mendel J.¹, Hubálek Z.¹, Šikutová S.¹, Rudolf I.^{1,2}

¹Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., Brno

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³Státní zdravotní ústav, Praha

⁴Ústav epidemiologie a biostatistiky, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

SOUHRN

Tularemie je zoonóza, jejíž původcem je *Francisella tularensis*, gramnegativní aerobní bakterie patřící do třídy *Gammaproteobacteria* a čeledi *Francisellaceae*. Navzdory skutečnosti, že *F. tularensis* může mít významný dopad na zdraví člověka, existuje o aktuálním výskytu tohoto patogenu v různých hematofágních členovcích pouze velmi málo údajů. Cílem studie bylo provést rozsáhlý molekulární screening různých potenciálních hematofágních vektorů: klíšťat (4348 jedinců druhů *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* a *Haemaphysalis concinna*), komárů (4100 jedinců druhu *Aedes vexans*) a muchniček (6900 jedinců *Simulium* spp.) na přítomnost *F. tularensis* na Břeclavsku v roce 2022. Pozitivní byly pouze 2 vzorky, které obsahovaly DNA specifickou pro *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Oba vzorky pocházely z klíštěte *D. reticulatus* a to jak po infestaci srnce, tak jednoho smíšeného vzorku nasbíraných klíšťat (n = 10). Oba pozitivní vzorky byly sekvenovány a byla potvrzena přítomnost *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Přítomnost *F. tularensis* v komárech a muchničkách nebyla prokázána.

KLÍČOVÁ SLOVA

Francisella – tularemie – *Ixodes ricinus* – *Dermacentor reticulatus* – *Haemaphysalis concinna* – *Aedes vexans* – *Simulium* spp. – zoonóza

ABSTRACT

Mravcová K., Zdražilová S., Vlčková I., Orliková H., Malý M., Kynčl J., Mendel J., Hubálek Z., Šikutová S., Rudolf I.: Occurrence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in haematophagous arthropods in the Breclav district in 2022

Tularemia is a zoonosis caused by *Francisella tularensis*, a gram-negative aerobic bacterium belonging to the class of *Gammaproteobacteria* and the family *Francisellaceae*. Despite its undeniable importance for human health, there is little data on the current distribution of *F. tularensis* in various hematophagous arthropods. The aim of this study was to perform a mass molecular screening of different possible hematophagous vectors: ticks (4348 ticks of the species *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, and *Haemaphysalis concinna*), mosquitoes (4100 specimens of *Aedes vexans*), and blackflies (6900 specimens of the *Simulium* spp.) for the presence of *F. tularensis* in the Breclav district in 2022. Only two specimens were positive for the specific DNA of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Both samples originated from *D. reticulatus*, one collected from infested roe deer and the other included in a pooled sample (n = 10). Both positive samples were sequenced, and the presence of *F. tularensis* subsp. *holarctica* was confirmed. In addition, the absence of *F. tularensis* in mosquitoes and black flies was documented.

KEYWORDS

Francisella – tularemia – *Ixodes ricinus* – *Dermacentor reticulatus* – *Haemaphysalis concinna* – *Aedes vexans* – *Simulium* spp. – zoonosis

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2024; 73(3): 147–152
<https://doi.org/10.61568/emi/11-6352/20240726/138066>

ÚVOD

Francisella tularensis je obligátně aerobní, gramnegativní, intracelulární, nesporulující bakterie, náležící do kmene *Pseudomonadota*, třídy *Gammaproteobacteria* a čeledi *Francisellaceae*, která způsobuje akutní onemocnění – tularemii neboli zaječí nemoc. Nákaza se vyskytuje sezonně s nejvyšším počtem případů v pozdních jarních měsících, během léta až do začátku podzi-

mu [1, 2]. Bakterie může infikovat širokou škálu hostitelů včetně bezobratlých, ptáků (stěhovaví pobřežní ptáci) a savců [3]. Za nejvýznamnější savčí hostitele jsou však považováni zástupci řádů zajícovci (*Lagomorpha*) a hlodavci (*Rodentia*) [4]. Jako vektorů hrají významnou roli v přenosu hematofágní členovci, a to převážně klíšťata. Role dalších zástupců hematofágních členovců (především komárů) při biologickém přenosu *F. tularensis* není dosud zcela zřejmá [4]. Mezi další způsoby přenosu

PŮVODNÍ PRÁCE

řadíme nákazu aerogenní cestou, alimentární přenos nebo nákazu přímým kontaktem [4]. Mezilidský přenos nebyl dosud zaznamenán [5]. Díky mnoha faktorům virulence, poměrně snadnému šíření a nedostupnosti vakcinace představuje tularemie potencionální bioteroristickou zbraň [6]. Jsou popsány čtyři poddruhy tohoto patogenu: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* a *F. tularensis* subsp. *novicida* [4]. Typy A a B jsou považovány za nejdůležitější z hlediska patogenity pro člověka (více virulentní typ A převládá v Severní Americe, mírnější typ B se objevuje především v Eurasii). Klinické příznaky tularemie souvisejí především se vstupní bránou patogenu, stupněm virulence a imunitním stavem pacienta. Na základě místa vstupu a klinických projevů rozlišujeme 4 formy onemocnění, a to ulceroglandulární/okuloglandulární, pulmonární, střevní/abdominální a nejméně častou septickou [7]. Každá z forem tularemie může být doprovázena komplikacemi, které mohou vést k sekundární sepsi, zápalu plic, popřípadě meningitidě.

Cílem práce bylo zmapovat s využitím molekulárních metod aktuální výskyt *F. tularensis* subsp. *holarctica* u hematofágních členovců (klíšťat, komárů a muchniček) na vybraných lokalitách Břeclavska. Vzhledem k nárůstu ulceroglandulární formy onemocnění po sání klíštětem je nezbytné získat recentní data o skutečné prevalenci *F. tularensis* v klíštěcích vektorech a současně objasnit možnou roli dalších zástupců hematofágních členovců jako jsou komáři a muchničky při vektorovém přenosu *F. tularensis* na našem území.

MATERIÁL A METODY

Sběr klíšťat, komárů a muchniček a lokality sběru Sběr klíšťat

Sběr klíšťat byl prováděn metodou vlnkování. Odchyt probíhal v létě a na podzim roku 2022 na lokalitách Ladná, Podivín (Janův Hrad), Lanžhot (obora Soutok), Valtice (Rendezvous, Zahradky, Pískovna) a obora Soutok (Pohansko, Štrosflek). Již při sběru byla klíšťata tříděna a separována dle druhu (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*), vývojového stadia (nymfa, dospělec) a pohlaví (samec, samice). Do zkumavky bylo ke členovcům umístěno stéblo trávy, aby nedocházelo k jejich vysychání. Vzorky byly uchovány v chladničce při 6 °C a před analýzou sestavovány do směsí, tzn. 1 vzorek odpovídal 10 kusům jedinců samic, samců či nymf. Klíšťata byla následně homogenizována a využita k izolaci DNA. Další vzorky tvořila nasátá klíšťata odebraná z divoké zvěře (srnec obecný, jelen evropský, daněk evropský a prase divoké). Na rozdíl od klíšťat sesbíraných metodou vlnkování nebyly tyto vzorky vyšetřovány ve směsích (jeden vzorek tedy odpovídal 1 jedinci). Tyto vzorky pocházely z lokalit Hlohovec, Mikulov, Poštorná, Strachotín, Tvrdonice a Valtice.

Sběr komárů a muchniček

Odchyt probíhal v létě 2022 pomocí pastí EVS („*encephalitis vector surveillance*“) od výrobce BioQuip Products, USA s oxidem uhličitým a světlem jako atraktantem. Muchničky byly odchyceny v oblastech Lednice (rybník Mlýnský), Břeclav (Kančí Obora, Obora Soutok) a Tvrdonice. Komáři byli odchyceni v lokalitách Kančí Obora a Obora Soutok (Hvězda). Komáři a muchničky byli zpracováni ve směsích po 100 jedincích. Vzhledem ke složité taxonomické determinaci muchniček byli jedinci zařazeni pouze v rámci rodu *Simulium* spp. čeledi *Simuliidae*. Odchycení komáři patřili do druhu *Aedes vexans*.

Homogenizace vzorků klíšťat, komárů a muchniček

Homogenizace vzorků probíhala v chlazených třecích miskách v přítomnosti sterilního písku, kde byly jednotlivé vzorky (nebo jejich směsi) homogenizovány v 500 µl chlazeného fosfátového pufru (PBS) a centrifugovány při 4 °C a 500 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Byl odebrán supernatant, který byl dále zpracován při izolaci DNA.

Izolace genomické DNA

Automatická izolace DNA z hematofágních členovců probíhala pomocí automatického přístroje QIAcube a využitím QIAamp DNA Mini Kit, a to přesně dle instrukcí výrobce.

Real-time PCR

Pro detekci *F. tularensis* pomocí Real-Time PCR ve vzorcích DNA izolované z členovců byly využity primery zacílené na gen *tul4*, který kóduje 17-kDa lipoprotein vnější membrány. Primery, sonda i podmínky reakce byly převzaty z publikace Versage et al. (2003) [8]. Navržená PCR nedetekovala tzv. *Francisella*-like endosymbionty, je tedy vysoce specifická ale i citlivá (schopna detekovat 1 buňku *F. tularensis* ve vzorku) [9]. V počátečních fázích screeningu jsme používali také interní pozitivní kontrolu (tzv. IPC) pro ověření optimálního průběhu PCR reakce.

Konvenční PCR

Pro konfirmaci *Francisella tularensis* ve vzorcích DNA izolované z hematofágních členovců a pro sekvenaci byly využity primery cílené opět na konzervativní oblast genu *tul4* [10].

Sekvenace pozitivních vzorků

Pozitivní vzorky, tedy produkty konvenční PCR, byly následně osekvenovány a bioinformaticky analyzovány dle studie uveřejněné dříve [11]. Purifikace PCR produktů byla realizována prostřednictvím soupravy DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). PCR produkty byly sekvenovány dle pokynů výrobce pomocí BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA). K odstranění nečistot byla použita sada ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research). Sekvenování probíhalo na ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro zajištění vysoké kvality čtení byly PCR amplikony sekvenovány obousměrně. Následně proběhla úprava sekvencí DNA a jejich porovnání pomocí modulu Seqman v rámci Lasergene v. 6.0 (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA). Porovnání bylo následně zkontrolováno také ručně. Výsledné sekvence byly vyhledány v databázi ve formátu FASTA, použitým algoritmem byl BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

VÝSLEDKY

Celkem bylo na přítomnost *F. tularensis* vyšetřeno 4 348 jedinců tří druhů klíšťat (*I. ricinus*, *D. reticulatus*, *H. concinna*), 4 100 jedinců komárů druhu *Ae. vexans*

a 6 900 jedinců muchniček rodu *Simulium* spp. Údaje o lokalitách sběru, vyšetřených jedincích (druhu, stadiu, pohlaví) a prevalence *F. tularensis* jsou přehledně shrnuty (tab. 1 a 2). Z celkově vyšetřených 505 vzorků klíšťat, 69 vzorků muchniček a 41 vzorků komárů byly zjištěny 2 pozitivní vzorky. V případě positivity se jednalo o vzorek číslo 114 (směs samic *D. reticulatus*, lokalita Ladaná, metoda vlnkování) a vzorek číslo 404 (jedinec *D. reticulatus*, lokalita Poštorná, odběr ze srnce obecného). Positivita těchto dvou vzorků byla určena pomocí Real-Time PCR a následně ověřena i konvenční PCR a elektroforézou. Pro porovnání sekvenční homologie vzorku 114 s jinými sekvencemi dostupnými v GenBank databázi Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) pomocí nástroje BLASTn (nucleotide-nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) byla prokázána shoda s *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen B-8364 chromosome (*complete genome*) a mnoha dalšími kmeny *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Tabulka 1. Souhrnná tabulka vyšetření vzorků klíšťat na přítomnost *Francisella tularensis*

Table 1. Summary table for the examination of ticks for *Francisella tularensis*

Lokalita	Samice (D.r./I.r./H.c.)	Samci (D.r./I.r./H.c.)	Nymfy (D.r./I.r./H.c.)	Celkem dle druhů (D.r./I.r./H.c.)	Počet vyšetřených klíšťat/počet směsí/ prevalence (%)	Positivní vzorky
Klíšťata sbíraná metodou vlnkování (1 vzorek = 10 jedinců)						
Břeclav – Ladaná	26/16/0	17/11/1	0/40/0	43/67/1	1110/111/0,09	1
Janův Hrad – Podivín	1/9/0	1/9/1	0/3/0	2/21/1	240/24/0	0
Lanžhot	11/3/0	6/4/0	0/0/2	17/7/2	260/26/0	0
Rendezvous – Valtice	16/5/1	10/4/3	0/11/2	26/20/6	520/52/0	0
Sportoviště – Valtice	18/5/0	14/5/0	0/3/0	32/13/0	450/45/0	0
Štrosflek	25/1/0	23/1/0	0/0/0	48/2/0	500/50/0	0
Zahrádky – Valtice	38/12/0	22/12/1	0/32/2	60/56/3	1 190/119/0	0
Celkem	135/51/1	93/46/6	0/89/6	228/186/13	4 270/427/0,02	1
Klíšťata odebraná z divokých zvířat (1 vzorek = 1 jedinec)						
Hlohovec	0/7/2	0/0/0	0/0/0	0/7/2	9/---/0	0
Mikulov	0/0/6	0/0/1	0/0/1	0/0/8	8/---/0	0
Poštorná	1/4/0	0/0/0	0/0/0	1/4/0	5/---/20	1
Strachotín	0/5/0	0/1/0	0/0/0	0/6/0	6/---/0	0
Tvrdonice	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0/1/0	1/---/0	0
Valtice	0/42/5	0/0/2	0/0/0	0/42/7	49/---/0	0
Celkem	1/59/13	0/1/3	0/0/1	1/60/17	78/---/1,28	1

Vysvětlivky: D.r. – *Dermacentor reticulatus*; I.r. – *Ixodes ricinus*; H.c – *Haemaphysalis concinna*.

Explanations: D.r. – *Dermacentor reticulatus*; I.r. – *Ixodes ricinus*; H.c – *Haemaphysalis concinna*.

Tabulka 2. Souhrnná tabulka vyšetření vzorků komárů a muchniček na přítomnost *Francisella tularensis*
Table 2. Summary table for the examination of mosquitoes and blackflies for *Francisella tularensis*

Lokalita	Komáři (<i>Aedes vexans</i>)	Muchničky (<i>Simulium</i> spp.)	Počet vyšetřených jedinců/ počet směsí/prevalence (%)	Pozitivní vzorky
Směsi komárů a muchniček (1 vzorek = 100 jedinců)				
Apollo	0	3	300/3/0	0
Kančí Obora	26	8	3 400/34/0	0
Obora Soutok	0	42	4 200/42/0	0
Pohansko	0	1	100/1/0	0
Tvrdonice	0	14	1 400/14/0	0
Břeclav	0	1	100/1/0	0
Hvězda	15	0	1 500/15/0	0
Celkem	41	69	11 000/110/0	0

DISKUSE

Tato práce je nejrozsáhlejším molekulárním screeningem různých skupin hematofágních členovců na přítomnost *F. tularensis* (porovnáno s dostupnou literaturou). Výzkum probíhal v několika lokalitách v okrese Břeclav v Jihomoravském kraji. Lokality pro sběr klíšťat byly vytipovány na základě dostupných epidemiologických dat poskytnutých Státním zdravotním ústavem, Krajskou hygienickou stanicí Jihomoravského kraje se sídlem v Brně a místními veterináři a infektoLOGY. Minimální prevalence *F. tularensis* (tj. jedno klíště v dané směsi je pozitivní) u klíšťat odchycených metodou vlnkování byla 0,02 % (1/4 270), prevalence u klíšťat odebraných z divoké zvěře byla 1,28 % (1/78), zatímco u ostatních zástupců hematofágních členovců (komáři a muchničky) nebyla *F. tularensis* prokázána. Námi zjištěné relativně nízké hodnoty prevalence jsou nižší jak v rámci České republiky, tak i v porovnání s jinými evropskými zeměmi. V důsledku nastavení velmi citlivé Real-time PCR, která je schopna detegovat dokonce 1 buňku *F. tularensis* ve vzorku je zřejmé, že volba směsných vzorků neovlivnila konečnou prevalenci *F. tularensis* v daném souboru hematofágních členovců. S největší pravděpodobností došlo k vyšetřování vzorků v tzv. meziepidemickém období, kdy cirkulace patogenu v přírodním ohnisku nákazy je utlumena, což koresponduje i s incidencí u lidí v daném kalendářním roce (SZÚ). V roce 2022, kdy probíhal výzkum, byla incidence hlášených případů tularemie u lidí nízká a její hodnota 0,4 na 100 000 obyvatel pro ČR byla shodná s incidencí v Jihomoravském kraji. Ve třech letech 2019, 2020 a 2021, které předcházely studii, byla incidence v Jihomoravském kraji (2,9; 1,4 a 0,7 na 100 000 obyvatel), tedy vždy vyšší, než v roce výzku-

mu a pokaždé převyšovala incidenci celorepublikovou (1,0; 0,7 a 0,5/100 000 obyvatel) v jednotlivých letech. V roce 2023 incidence onemocnění tularemii v Jihomoravském kraji opět stoupla na 0,7 a v celé ČR na 0,5 na 100 000 obyvatel [Zdroj: ISIN, Informační systém infekčních nemocí, Státní zdravotní ústav, Praha].

Jižní Morava, zejména oblast dolního toku řeky Dyje a Moravy při hranicích s Rakouskem a Slovenskem, je dlouhodobě (od roku 1936) známá jako oblast endemického výskytu tularemie [12, 13]. V bývalém Československu byla *F. tularensis* izolována v klíšťatech *I. ricinus* [14, 15, 16, 17], *I. trianguliceps* [18], *Haemaphysalis concinna* [19] a *D. reticulatus* [20], který je z dlouhodobého pohledu také nejvýznamnějším vektorem a současně rezervoárem agens [21]. Transstadiální přenos *F. tularensis* byl prokázán experimentálně u *I. ricinus* i *D. reticulatus* [15, 22, 23], a transovariální přenos byl popsán u *D. reticulatus* [13, 15]. Prevalence *F. tularensis* v klíšťatech *D. reticulatus* v Česku a na Slovensku se v minulých letech pohybovala v rozmezí jednotek procent (0–2,6 %) [20, 21, 24]. Podobné hodnoty prevalence byly zaznamenány i v okolních zemích jako jsou Bělorusko (0,9 %), Francie (1 %), Maďarsko (0 %), Portugalsko (8,9 %) a Španělsko (0,5 %) [25, 26, 27, 28, 29]. Vyšší prevalence byla naopak detekována při vyšetřování klíšťat *I. ricinus* v Srbsku (3,8 %) [30] a Německu (8,4 %) [31]. Obecně platí, že u prací, kde jsou uváděny vysoké hodnoty prevalence *F. tularensis*, je třeba vyloučit nespécifický záchyt tzv. 'Francisella-like' endosymbiontů [9].

V severských zemích se na základě dostupných dat zvažuje také přenos *F. tularensis* infikovanými komáři [3, 32, 33]. *F. tularensis* byla prokázána v roce 2019 v odchycených komárech *Aedes cinereus* při sezonní epidemii v centrálním Švédsku [34]. Navíc některé švédské

práce experimentálně potvrzují transstadiální přenos *F. tularensis* v komárech [33, 35, 36]. Finská studie z roku 2021 prokázala absenci *F. tularensis* v klíšťatech *I. ricinus*, na rozdíl od významné prevalence *F. tularensis* v komárech [37]. Naše studie z roku 1997, která probíhala v endemické oblasti výskytu tularemie na Břeclavsku, však nepotvrdila výskyt *F. tularensis* u komárů (bylo vyšetřeno celkem 9167 samic komárů *Aedes* spp.) [38]. Absenci *F. tularensis* v komárech potvrzuje i tato práce. Přenos *F. tularensis* komáry stejně jako muchničkami lze tedy v rámci střední Evropy považovat za spíše nepravděpodobný [39].

ZÁVĚR

Povědomí o tularemii je v běžné populaci i u praktických lékařů spíše nízké, příznaky onemocnění nejsou ve většině případů specifické, a proto mnohdy není onemocnění vůbec diagnostikováno nebo je zaměněno s jinou zoonózou. Navíc počet případů ulceroglandulární formy tularemie způsobené sáním klíšťat v poslední době narůstá i v důsledku změn environmentálních či socio-ekonomických. Je třeba definovat a lépe prozkoumat všechny možné zvířecí rezervoáry, přenašeče a vodní i suchozemská prostředí, ve kterých *F. tularensis* přežívá. Pro správné pochopení cirkulace *F. tularensis* v přírodním ohnisku nákazy je vhodné zvýšit aktivní dohled (tzv. surveillance), a souběžně vyšetřovat lidskou populaci (např. screening protilátek), volně žijící i domácí zvířata a hematofágní vektory (klíšťata) v souladu s aktuálně doporučovaným konceptem Jedno zdraví (One Health).

LITERATURA

- Neemann KA, Snowden JN. Tularemia. In D. Schlossberg (Ed.), *Clinical Infectious Disease* (2. vyd.). Cambridge University Press, 2015:1007–1009. ISBN: 978-1-107-03891.
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020; 70(11):5607–5612.
- Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, et al. The status of tularemia in Europe in a one-health context: A review. *Epidemiol Infect*, 2015;143(10):2137–2160.
- Hubálek Z, Rudolf I. *Microbial Zoonoses and Saprozooses*. Springer: Dordrecht, 2011:51–81.
- Troha K, Božanič Urbančič N, Korva M, et al. Vector-Borne Tularemia: A Re-Emerging Cause of Cervical Lymphadenopathy. *Trop Med Infect Dis*, 2022;7(8):189.
- Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015;13(2):141–144.
- Evans ME, Gregory DWMD, Schaffner WMD, et al. A 30-Year Experience With 88 Cases. *Medicine*, 1985;64(4):251–269.
- Versage JL, Severin DDM, Chu MC, et al. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens. *J Clin Microbiol*, 2003;41(12):5492–5499.
- Michelet L, Bonnet S, Madani N, et al. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: Evaluation of current molecular techniques. *Vet Microbiol*, 2013;163(3–4):399–403.
- Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, et al. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol*, 1997;35(5):1045–1048.
- Venclíková K, Mendel J, Betášová L, et al. Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011–2014. *Ticks Tick Borne Dis*, 2016;7:107–112.
- Drbohlav J. L'épidémie de tularemie en Tchécoslovaquie. *Les Trav. L'Inst. Hyg. Publ. L'Et. Tchecos*, 1937;8:79–104.
- Benda R, Heyberger K, Čapek J. Tularemia in the lower reaches of the Morava river (In Czech). *Voj zdrav listy*, 1955;24:419–425.
- Benda R, Heyberger K. Isolation of *Pasteurella tularensis* from engorged *Ixodes ricinus* ticks (in Czech). *Českosl Biol*, 1953;2:308–311.
- Heyberger K, Benda R, Čapek J. A complex investigation of a natural focus of tularemia in South Moravia during an interepizootic period (In Czech). *Přírodní Ohniská Nákaz* (ed. By D. Blaško-vič), SAV Bratislava, 1956:173–189.
- Hubálek Z, Juřicová Z, Peško J. Isolation of *Francisella tularensis* from *Ixodes ricinus* ticks in the protected Lands cape Area of Pálava. *Českosl Epidem*, 1987;36:223–230.
- Hubálek Z, Juřicová Z, Halouzka J. *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. *Folia Parasitol*, 1990;37:255–260.
- Guryčová D, Lysý J, Lichard M, et al. Study of a natural focus of tularemia in the Small Carpathian mountains. *Bratisl Lek Listy*, 1982;78:155–163.
- Kmety E, Guryčová D, Jareková J, et al. Versuch der Tilgung eines Naturherdes der Tularamie und der Leptospirose. *Zbl Bakt Hyg*, 1987;266:249–254.
- Hubálek Z, Tremel F, Halouzka J, et al. Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularemia. *Med Vet Entomol*, 1996;10(3):241–246.
- Hubálek Z, Rudolf I. *Francisella tularensis* prevalence and load in *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Central Europe. *Med Vet Entomol*, 2017;31(2):234–239.
- Petrov VG, Olsufiev NG. Replication of Bacterium tularense in *Dermacentor pictus* ticks in the course of their metamorphosis (in Russian). *Vopr Krai Obsch Eksp Parazitol Med Zool* (Moskva), 1953;8:149–156.
- Výrosteková V. *Importance of some ectoparasites in the natural locality of tularemia* (In Slovak). Ph.D. thesis, Comenius University, Bratislava, 1984:1–50.
- Guryčová D, Kocianová E, Výrosteková V, et al. Prevalence of Ticks Infected with *Francisella tularensis* in Natural Foci of Tularemia in Western Slovakia. *Eur J Epidemiol*, 1995;11(4):469–474.
- Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, et al. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks from Different Geographical Locations in Belarus. *PLoS One*, 2013;8(1):e54476.
- de Carvalho IL, Escudero R, García-Amil C, et al. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 2007;13(4):666–667.
- Egyed L, Élő P, Sréter-Lancz Z, et al. Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary. *Ticks Tick Borne Dis*, 2012;3(2):90–94.
- Reis C, Cote M, Paul REL, et al. Questing Ticks in Suburban Forest Are Infected by at Least Six Tick-Borne Pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011;11(7):907–916.
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg*, 2009;81(1):67–74.
- Milutinović M, Masuzawa T, Tomanović S, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp Appl Acarol*, 2008;45:171–183.
- Gehring H, Schacht E, Maylaender N, et al. Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis* holarctica in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany. *Ticks Tick Borne Dis*, 2013;4(1):93–100.
- Eliasson H, Sjöstedt A, Bäck E. Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularemia. *Scand J Infect Dis*, 2005; 37(11–12):833–837.
- Thelaus J, Andersson A, Broman T. *Francisella tularensis* Subspecies holarctica Occurs in Swedish Mosquitoes, Persists Through the Developmental Stages of Laboratory Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding. *Microbial Ecol*, 2014; 67(1):96–107.

34. Dryselis R, Hjertqvist M, Makitalo S, et al. Large outbreak of tularemia, central Sweden, July to September 2019. *Eurosurveillance*, 2019;24:1–2.
 35. Bäckman S, Näslund J, Forsman M, et al. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci Rep*, 2015;5(1):7793.
 36. Lundström JO, Andersson AC, Bäckman S, et al. Transstadial Transmission of *Francisella tularensis* holarctica in Mosquitoes, Sweden. *Emerg Infect Dis*, 2011;17(5):794–799.
 37. Sormunen JJ, Pakanen VM, Elo R, et al. Absence of *Francisella tularensis* in Finnish *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, 2021;12(6):101809.
 38. 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 Med Entomol*, 1997;34(6):660–663.
 39. Nieboer LFWJ, Ficher EAJ, Braks. Available evidence for mosquito-borne *Francisella tularensis* transmission is inconclusive. *Front Trop Dis*, 2023;4:1–11.
-

Poděkování

Práce byla finančně podpořena v rámci projektu Agentury pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví České republiky (reg. číslo projektu NU21-05-00143). Autoři by rádi poděkovali primáři infekčního oddělení nemocnice Břeclav MUDr. Danielu Fuchsovi za informace o klinických případech tularemie u lidí na Břeclavsku a MVDr. Markétě Reichelové, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. za poskytnutí DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Do redakce došlo dne 24. 5. 2024.

Adresa pro korespondenci:
doc. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.
Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.
Klášteří 212
691 42 Valtice
e-mail: rudolf@ivb.cz