

一株弗兰西斯菌的鉴定及其微生物学特性研究

屈平华¹, 邓小玲², 张健¹, 陈经雕², 张晶¹, 张全新¹, 肖杨¹, 陈守义^{1*}

(¹广州市疾病预防控制中心微生物检验科, 广州 510880)

(²广东省疾病预防控制中心微生物检验所, 广州 510300)

摘要 【目的】对广州市某空调冷却水中分离的一株 L-半胱氨酸刺激生长性细菌 08HL01032 进行分类学鉴定及微生物学特性研究。【方法】通过培养基生长状况、菌株形态、生理生化特性、PCR 鉴定、16S rRNA 基因序列分析、RNA 聚合酶 β 亚单位(*rpoB*)基因序列分析、动物实验、药敏实验等多种表型与基因相结合的方法, 探讨该菌株的分类进化地位及一些基本的生物学特性。【结果】该菌株一些生理生化特征与军团菌十分相似, 为革兰氏阴性杆菌, 氧化酶阴性, 不还原硝酸盐, 不分解尿素, 血平板缓慢生长、易忽略, 酵母活性炭缓冲(BCYE)琼脂 48 h 内生长良好, 最初错误鉴定为军团菌。但 16S rRNA 基因(GenBank 登陆号:FJ591095)、*rpoB* 基因(GenBank 登陆号:FJ939309)系统发育进化显示, 该菌株为弗兰西斯(*Francisella*)属细菌, 与蜃楼弗兰西斯菌(*F. philomiragia*)最相近, 相似度分别为 95.3%、87.3%, 菌落形态、表型特征亦与弗兰西斯菌属相符。其最适生长温度在 25℃~28℃之间, 42℃不生长; 能耐受 pH 2.2 酸液 10 min; 万古霉素、青霉素、多粘霉素 B 等耐药, 军团菌甘氨酸-万古霉素-多粘霉素 B-放线菌酮(GVPC)选择性添加剂无生长抑制作用; 菌体无芽孢、无鞭毛动力, 透射电镜下观察到荚膜样结构, 但动物实验初步显示对小鼠无致病性。【结论】菌株 08HL01032 为弗兰西斯菌属一潜在的新种, 其典型特征为 L-半胱氨酸刺激生长性, 不同于军团菌的 L-半胱氨酸依赖性生长特性。

关键词: L-半胱氨酸刺激生长性; 弗兰西斯菌; 鉴定; 微生物学特性

中图分类号: Q939 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)08-1003-08

弗兰西斯菌(*Francisella*)属是一类革兰氏阴性、多形态、无动力、不形成芽孢, 具有严格需氧性的短小杆菌或球杆菌, 目前, 已确认有土拉热弗兰西斯(*F. tularensis*)、蜃楼弗兰西斯(*F. philomiragia*)、新凶手弗兰西斯(*F. novicida*)三个种。其中新凶手弗兰西斯(*F. novicida*)遗传学特性、致病性与土拉热弗兰西斯菌十分相似, 通常被认为是土拉热弗兰西斯菌的一个生物亚种^[1]。近几年来, 挪威学者有从病死的鳕鱼中分离出弗兰西斯菌的报道, 并初步命名为杀鱼弗兰西斯(*F. piscicida*); 但由于该菌种的

16S rRNA 与蜃楼弗兰西斯菌高度同源, 且 DNA-DNA 基因组杂交与蜃楼弗兰西斯同源率为 69.5%~70.8%^[2]。如按同源性大于 70% 作为同一菌种的鉴定依据^[3], 该菌种处于一个“灰色”区域, 因此并没有得到国际公认^[4]。2008 年 8 月, 我室参照《公共场所集中空调通风系统卫生规范》附录 B《空调系统军团菌的检验分析方法》, 从广州市某中央空调冷却塔水中分离出一株 L-半胱氨酸刺激生长性的苛养性细菌, 最初被误认为是军团菌。但进一步的生化表型特征、PCR 鉴定、16S rRNA 基因及 RNA 聚合酶 β 亚

基金项目: 广州市卫生局重点项目(2006-zdi-11); 省科技计划项目(2008B030301358)

* 通信作者。Tel: +86-20-83824103; E-mail: shouyi_chen@163.com

作者简介: 屈平华(1979-), 男, 湖南衡阳人, 临床检验技师, 硕士研究生, 主要从事病原微生物的分子流行病学分型及细菌分类学研究。

E-mail: ququtdr@163.com

收稿日期: 2009-02-12; 修回日期: 2009-05-20

单位(*rpoB*)基因的系统发育分析等,将该菌初步定位为弗兰西斯菌属细菌;且由序列的同源性分析结果来看,该菌株为弗兰西斯菌属的一个潜在的新种。现将该菌株的分离鉴定及微生物学特性,报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:本文所用的菌株见表1。其中土拉热弗兰西斯菌基因组DNA由北京军事医学科学院微生物流行病学研究惠赠。

1.1.2 培养基:军团菌活性炭酵母缓冲(BCYE α)琼

脂、军团菌选择性甘氨酸-万古霉素-多粘霉素B-放线菌酮(GVPC)琼脂、不含L-半胱氨酸的BCYE α (-)、葡萄糖半胱氨酸(GC)兔血琼脂、厌氧血琼脂培养基、脑心浸液肉汤、及葡萄糖半胱氨酸营养肉汤等均由本室自行配制,所需的脑心浸液琼脂基础粉、厌氧琼脂基础粉、CYE琼脂基础粉均采用OXOID试剂。绵羊血琼脂、巧克力琼脂均购自广东环凯生物科技有限公司。其中葡萄糖半胱氨酸营养肉汤配制方法如下:称取脑心浸液琼脂肉汤3.7g,溶于90mL蒸馏水中,无菌加入10mL军团菌生长添加剂(Oxoid SR0110C)。

表1 菌株及相关信息

Table 1 Strains included in this study

Laboratory no. ^a	Species	Strains designation	Source	Nucleotide sequence accession no. ^b
1	<i>Francisella</i> sp.	08HL01032	Cooling tower, Guangzhou(广州), China	FJ591095, FJ939309, FJ939310
2	<i>L. pneumophila</i>	ATCC 33152	Human lung, pneumonia, Philadelphia, Pa.	M59157
3	<i>L. micdadei</i>	ATCC 33218	Human blood, pneumonia, Fort Bragg, Calif.	AF227162, S62141
4	<i>L. erythra</i>	ATCC 35303	Water in cooling tower, Seattle, Wash.	Z32638, U92203
5	<i>L. feeleii</i>	ATCC 35849	Human lung tissue, Wisconsin, Wis.	—
6	<i>L. gormanii</i>	Kingmed 186	Cooling tower, Xinhui(新会), China	FJ014925
7	<i>L. gormanii</i>	Kingmed 218	Fish pool, Xinhui(新会), China	FJ014926
8	<i>L. jordanis</i>	ATCC 33623	Jordan River, Bloomington, Ind.	Z32667, U92209
9	<i>L. oakridgensis</i>	JX 93	Cooling tower, Beijing(北京), China	—
10	<i>L. oakridgensis</i>	Kingmed 146	Dongshanhu lake, Guangzhou(广州), China	—
11	<i>L. pneumophila</i>	ATCC 33154	Human lung, Togus, Maine	AF022316
12	<i>L. pneumophila</i>	GZ_Leg001	Cooling tower, Guangzhou(广州), China	—
13	<i>L. pneumophila</i>	GZ_Leg002	Cooling tower, Guangzhou(广州), China	—
14	<i>L. pneumophila</i>	GZ_Leg003	Cooling tower, Guangzhou(广州), China	—
15	<i>L. pneumophila</i>	GZ_Leg004	Cooling tower, Guangzhou(广州), China	—
16	<i>L. quateirensis</i>	GZ_Leg023	Cooling tower, Guangzhou(广州), China	—
17	<i>F. tularensis</i>	410101	mice tissues, Beijing(北京), China	—
18	<i>F. tularensis</i>	410062	mice tissues, Beijing(北京), China	—

^a Numbers used to label lanes in Fig. 1. ^b EMBL database and Genbank accession numbers; —, no information; *L.*, abbreviation of *Legionella*

1.2 环境水样采集、处理与细菌培养

菌株08HL01032分离自广州市某宾馆中央空调冷却塔。采样、处理与分离培养参考《公共场所集中空调通风系统卫生规范》中附录B《空调系统军团菌的检验分析方法》。取200mL水样滤膜过滤浓缩,取下滤膜于15mL水样中充分洗脱。酸处理、热处理及未作处理的样品洗脱液,取0.1mL接种BCYE α -GVPC培养基,于含5%CO₂的潮湿环境中37℃孵育10d。以军团菌的菌落验证程序,可疑菌落二次传代至BCYE α 及不含L-半胱氨酸的BCYE α (-)培养基。

1.3 培养基生长实验

取葡萄糖半胱氨酸兔血琼脂上生长良好的新鲜菌株,配成约10⁵的菌悬液,取0.1mL涂布BCYE α 、BCYE α -GVPC、不含L-半胱氨酸的BCYE α (-)葡萄

糖半胱氨酸兔血琼脂、厌氧血琼脂、绵羊血琼脂、巧克力琼脂培养基,以得到单个菌落。5%CO₂的潮湿环境中37℃孵育7d,分别在第2d及第7d进行菌落生长状况及菌落直径的比较。

1.4 生理生化特征分析及比较

包括革兰氏染色镜检形态、氧化酶、触酶实验、温度生长试验、耐酸实验、及微量生化反应管(板)生化鉴定等。其中氧化酶、触酶试剂均采用生物梅里埃试剂,按说明书操作。生长温度试验参考1.3,取葡萄糖半胱氨酸兔血琼脂上生长良好的新鲜菌株,配成约10⁵的菌悬液,取0.1mL涂种葡萄糖半胱氨酸兔血琼脂,分别置于25℃、37℃、42℃的含5%CO₂的潮湿环境中恒温箱孵育48h。最适生长温度试验取0.1mL菌悬液,接种5mL葡萄糖半胱氨酸营养肉

汤,分别于 10℃、20℃、25℃、28℃、37℃ 孵育 24 h,分气光度计检测其吸光度。酸处理及热处理试验,均参考军团菌的方法,即以配制好的 10⁵ 菌悬液 1 mL,按 1:1 比例与 pH 2.2 KCl-HCl 混和,分别放置 5 min、10 min 进行酸耐受性试验;10⁵ 菌悬液 50℃ 水箱分别放置 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min 进行热处理试验;经处理的菌液以 0.1 mL 涂种平板,5% CO₂ 的潮湿环境中 37℃ 孵育 72 h,以观察菌落生长状况。生化实验分别以北京友康军团菌生化反应管,梅里埃 API NH,API Camp 生化反应板条,调整麦氏浊度 4.0 菌悬液接种生化管,进行实验。API NH 分别以孵育 2 h、24 h 生化实验结果进行比较。

1.5 血清学试验

日本生研(Denka Seiken)株式会社军团菌乳胶凝集试剂盒(内含嗜肺军团菌血清 1-6 型、麦氏军团菌(*Legionella micdadei*)、博氏军团菌(*Legionella bozemanii*)、杜氏军团菌(*Legionella dumoffii*)、戈氏(*Legionella gormanii*)军团菌单价血清),英国 Microgen 军团菌乳胶凝集试剂盒(内含嗜肺军团菌血清 1 型单价血清,嗜肺军团菌 2-15 型多价血清,以及针对麦氏、博氏、杜氏军团菌等 10 个常见军团菌种的多价血清),按说明书进行操作。

1.6 PCR 鉴定

大连 TaKaRa 细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒 kits 2.0,按说明书抽提细菌基因组 DNA 模板,分光光度计 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 检测其浓度及纯度。TaKaRa TaqTM 酶体系,按试剂使用说明书操作。军团菌 16S rRNA 鉴定同时采用引物对 L16S_225f-L16S_858r 及 L16S_p1.2-L16S_cp3.2,扩增条件见文献报道^[5-6]。弗兰西斯菌 16S rRNA 鉴定采用引物 F11-F5,土拉热弗兰西斯菌鉴定则同时采用 16S rRNA 引物 FTL8-FTL12 及 17-kDa 脂蛋白基因的引物 TUL4_435-TUL4_838,扩增条件见文献报道^[7-8]。

1.7 基于 PCR 扩增的基因序列分析

针对军团菌 mip 基因、16S rRNA 基因、ropB 基因的 PCR 扩增及测序方法,见文献报道^[9-12]。针对弗兰西斯菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增及测序方法,见文献报道^[7]。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定后,送与上海英骏广州公司进行基因测序。核苷酸序列在 NCBI GenBank 数据库进行 Blast 比对,相关序列以 Clustal W 和 Mega 4.1 软件进行序列同源性分析,绘制系统发育树。

1.8 毒力试验

毒力实验分实验组及阴性对照组,取雌性小鼠

各 10 只。挑取 BCYE α 平板上生长良好的新鲜菌落,以生理盐水配制约 10⁹ 细菌悬液。实验组取 0.5 mL 菌悬液进行腹腔接种,阴性对照组直接取 0.5 mL 生理盐水。每天观察小鼠的活动度、饮食、及皮毛状况。连续观察 15 d。

1.9 药敏实验

药敏实验采用 K-B 法,所用的药敏纸片均为 Oxoid 试剂。以葡萄糖半胱氨酸肉汤配制菌悬液,涂种于含 5% 兔血的葡萄糖半胱氨酸琼脂,5% CO₂ 培养箱孵育 24 h,测量其抑菌环直径。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离及鉴定

分离到一株 L-半氨酸刺激生长性细菌 08HL01032。该菌株在 BCYE α 平板上生长良好,培养 48 h 后菌落表面光滑,扁平凸起,白色湿润,直径约 1.0 mm ~ 1.5 mm。革兰氏染色初次分离为阴性短小杆菌,具多形态性。氧化酶阴性,触酶弱阳性,血平板上培养 48 h 后生长仍未有生长迹象,最初鉴定为军团菌。采用北京中生军团菌生化试剂盒进行生化实验,结果显示:该菌株不还原硝酸盐,不水解尿素,不发酵葡萄糖产酸(孵育 24 h 实验结果),缓慢液化明胶,生化特征与军团菌十分相似(见表 2)。

表 2 菌株 08HL01032 的生理生化特征及与军团菌的比较

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain 08HL01032, *L. pneumophila* and *L. micdadei*

Test items ^a	strain	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. micdadei</i>
	08HL01032	ATCC 33152	ATCC 33218
Gram stain	-	-	-
L-cysteine requirement	FP	+	+
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	+
Glucose fermentation	FN	-	-
Nitrate reaction	-	-	-
Urea hydrolysis	-	-	-
Gelatine Liquefaction	+	+	-
Hippurate sodium hydrolysis	-	+	-
Mobile	-	+	+
API Campy kits	4001004	4771004	4671004
API NH kits	3120	7132	7032

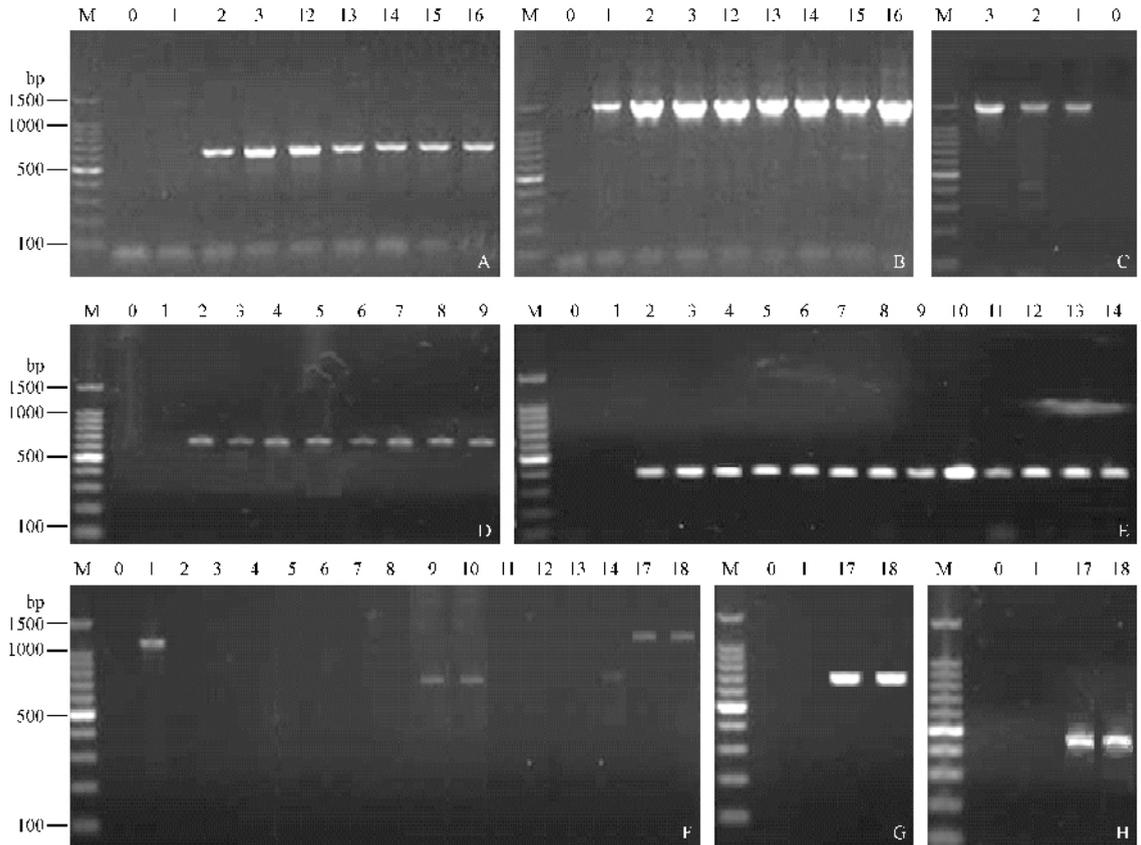
^a Test items of glucose fermentation, nitrate reaction, urea hydrolysis, gelatine Liquefaction, hippurate sodium hydrolysis were Zhongsheng *Legionella* biochemical kits. +, positive; -, negative; FP, false positive result for the delayed growth on the media without L-cysteine; FN, false negative result for 24 ~ 48 h incubation with 0.5 M cell suspensions.

但该菌株与日本生研、英国 Microgen 军团菌乳胶凝集试剂盒所有军团菌抗体,均无凝集现象。针对 16S rRNA 基因设计的两对军团菌属特异性引物,以

及 *mip* 基因测序引物,均无法扩增出目的片段。

按照 Lo Presti 及 Ko 等报道的军团菌 16S rRNA 基因及 *ropB* 基因测序引物^[11-12],则均能进行基因序列分析,并将该菌株初步鉴定为弗兰西斯菌属细菌。其中 16S rRNA 基因,与土拉热弗兰西斯(*F. tularensis*)的同源性为 94.8%~94.9%,与蜃楼弗兰西斯(*F. philomiragia*)的最大相似度为 95.3%,无同源性更高的序列(GenBank 登陆号:FJ591095)。*ropB* 基因与蜃楼弗兰西斯的最大相似度为 87.3%,无同

源性更高的序列(GenBank 登陆号:FJ939309)。针对弗兰西斯菌属及土拉热弗兰西斯菌的 PCR 鉴定结果亦表明,该菌株属于弗兰西斯菌属,但不是具有烈性传染性的土拉热弗兰西斯菌(见图 1)。结合 PCR 鉴定及基因序列分析的结果,可初步将该菌株鉴定为弗兰西斯菌属细菌。以 16S rRNA 基因 3% 的序列差异性,作为不同菌种的鉴定依据^[13],则该菌株可鉴定为一新种,其系统发育进化树见图 2。



1 PCR 产物的凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Identification of PCR amplification by gel electrophoresis. Laboratory no. 1 to 18 represented these strains depicted in table 1, and 0 is the negative contrast of distill water. Label A to H represented the photographs using these following primer pairs: *mip_f-mip_r*, A1-r1488, F1-R13, L16S_225f-L16S_858r, L16S_p1.2-L16S_cp3.2, F11-F5, FTL8-FTL12, TUL4_435-TUL4_863.

2.2 菌株 08HL01032 的微生物学特性

按照弗兰西斯菌属的特点进行培养基生长实验,结果表明,菌株 08HL01032 符合弗兰西斯菌的生长特点,能够在多个含 L-半胱氨酸的培养基上生长良好。BCYE α 琼脂平板上孵育 48 h 出现直径约 1 mm~1.5 mm 大小白色湿润菌落,表面光滑,扁平凸起,边沿整齐,呈露滴样,菌落粘稠,可拉出长丝,长波紫外灯下无荧光。Thayer-Martin 培养基孵育 72 h 为 1.0 mm 左右白色半透明菌落,其他特征与 BCYE α 琼脂平板相似。在含 L-半胱氨酸的脑心浸

兔血琼脂平板上生长迅速,培养 24 h 即可出现 0.5 mm 左右黄绿色膏样粘稠状菌落,挑开菌落后可见微弱的草绿色溶血。在厌氧血琼脂平板,菌落呈白色半透明,其他特征则基本与脑心浸兔血琼脂平板相似。血平板及巧克力琼脂平板培养 7 d,亦可出现针尖样大小白色菌落,不同培养时间及不同培养基上的菌落大小及比较见表 3。

菌株 08HL01032 的生理生化特性还包括:25℃、37℃ 生长,42℃ 不生长,最适生长温度为 25℃。50℃ 热处理 20 min,其生长现象将受到抑制,但能耐受

pH 2.2 KCl-HCl 酸处理 10 min。营养要求苛刻,普通营养肉汤不生长,普通脑心浸液肉汤中缓慢生长,但在以军团菌生长添加剂配制葡萄糖半胱氨酸营养肉汤中生长良好。糖发酵实验可因为营养条件限制而得到错误的假阴性结果,生化反应时需调整菌液浓度到 3.0 M 浊度以上。API NH 板条孵育 2 h 结果如下:葡萄糖、果糖、蔗糖发酵实验阳性;麦芽糖发酵实验阴性;鸟氨酸脱羧酶阴性;脲酶阴性;脂酶阴性

(24 h 可呈弱阳性);碱性磷酸酶阳性; β -半乳糖苷酶阴性;脯氨酸芳酶阴性; γ -谷氨酰转移酶阴性;吡啉酶阴性;生化反应编码为:3120。API Campy 板条孵育 24 h 结果如下:脂酶,碱性磷酸酶阳性;尿素酶,硝酸盐还原实验,马尿酸水解实验,氯化三苯基四氮唑,吡咯烷酮芳香酰氨转移酶等为阴性;同化实验亦均为阴性(可能与营养条件有关);生化反应编码为:4001004。

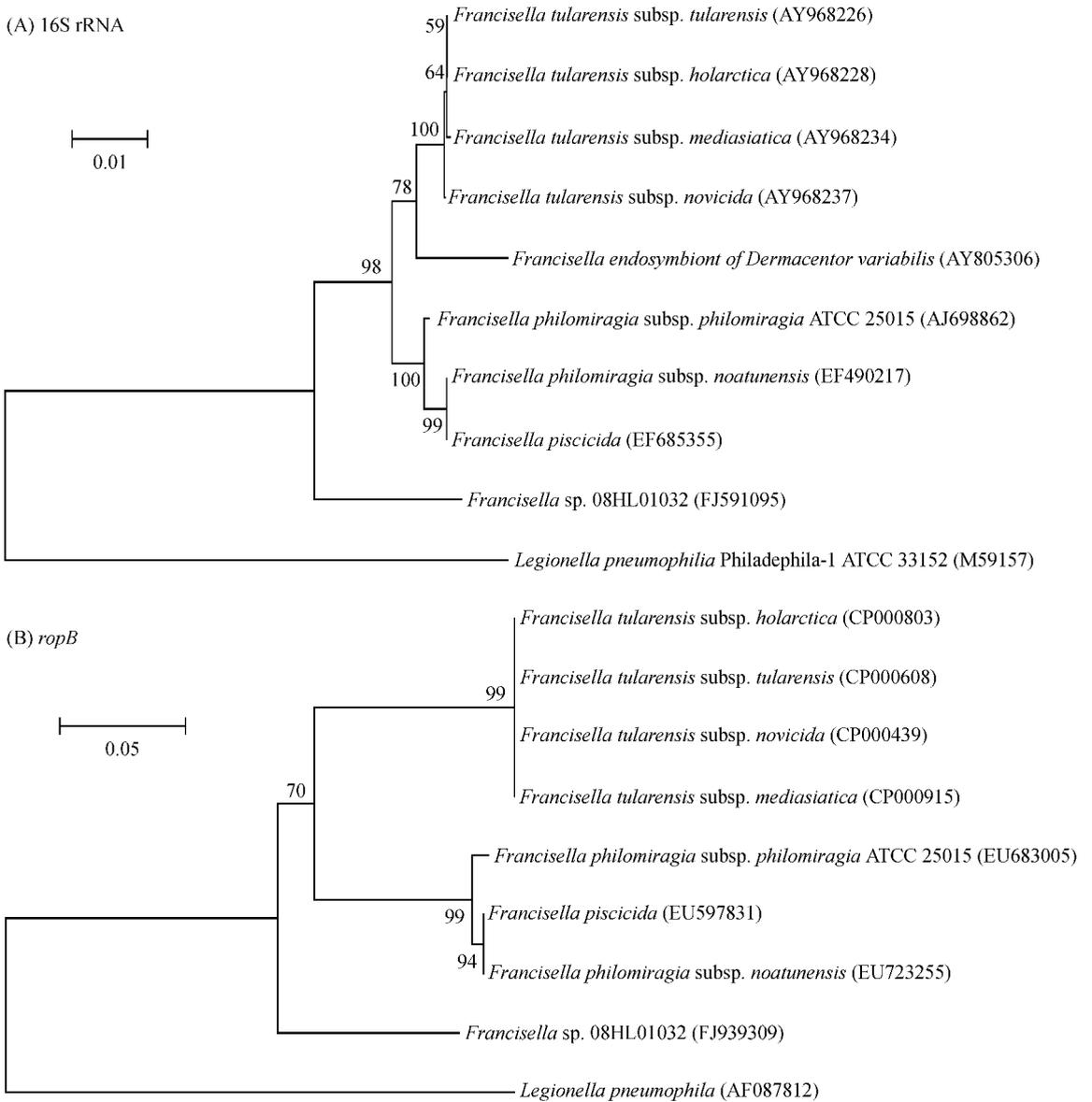


图 2 菌株 08HL01032 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic relationships of strain 08HL01032 and reference *Francisella* species. The tree was constructed by the neighbor-joining method rooting with *Legionella pneumophila*. Numbers at branching nodes are percentages of 1000 bootstrap replications; only values greater than 50% are indicated. A: Tree constructed on the basis of 16S rRNA sequences of 1377 bp fragment. B: Tree constructed on the basis of *ropB* sequences of 367 bp fragment. Both *Francisella tularensis* subsp. *novicida* and *Francisella piscicida* are informal bacterial names in this tree, and symbols in the brackets are accession numbers in GenBank. Bars, 1 (a) or 5 (b) percents of sequence divergence.

表 3 菌株 08HL01032 在不同培养基上的生长状况及比较

Table 3 Sizes of isolated colonies at 2 and 7 days and the comparison to *Legionella* on various media

Name of medium	<i>Francisella</i> sp. 08HL01032		<i>Legionella</i> spp. (15 strains) ^a	
	2 days	7 days	2 days	7 days
Maconkey agar	NG	NG	NG	NG
KIA slant	NG	NG	NG	NG
Sheep blood agar	< 0.1 mm	0.3 mm	NG	NG
Chocolate agar	0.2 mm	0.8 mm	NG	NG
Thayer-Martin agar	0.5 mm	2.0 mm	NG	NG
BCYE α agar without L-cysteine	1.0 mm	3.0 mm	NG	NG
BCYE α agar	1.5 mm	3.0 mm	0.5 ~ 2.0 mm	1.5 ~ 3.5 mm
BCYE α agar with GVPC	1.8 mm	3.0 mm	0.4 ~ 2.0 mm	1.5 ~ 3.5 mm
Anaerobic agar with 5% rabbit blood	1.8 mm	3.0 mm	NG	NG
HIA with L-cysteine and 5% rabbit blood	2.0 mm	3.5 mm	NG	NG

^a 16 strains of *Legionella* are listed in table 1. NG, no growth.

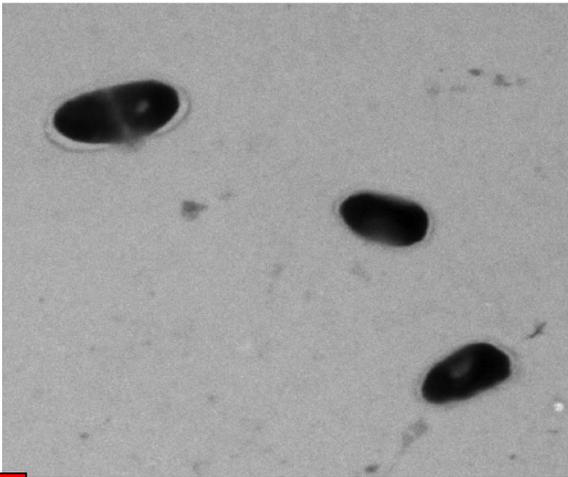


图 3 菌株 HL01032 的透射电镜照片

Fig.3 Transmission electron micrograph of strain 08HL01032 (2500 \times).

表 4 菌株 08HL01032 的抑菌环直径

Table 4 Zone diameters of strain 08HL01032 under the certain concentration of various antimicrobials

Antimicrobials	Abbreviations	Levels	Zone diameters
Cephazolin	KZ	30 μ g	—
Ciprofloxacin	CIP	5 μ g	42 mm
Clindamycin	DA	2 μ g	—
Gentamicin	CN	10 μ g	32 mm
Norfloxacin	NOR	10 μ g	41 mm
Ofloxacin	OFX	5 μ g	40 mm
Penicillin G	P	10 μ g	—
Polymyxin B	PB	300U	—
Tetracycline	TE	30 μ g	30 mm
Tobramycin	TOB	10 μ g	31 mm
Vancomycin	VA	30 μ g	—

—, no zone diameters observed.

取 L-半胱氨酸的脑心浸兔血琼脂平板上生长 24 h 的新鲜菌株,透射电镜下进行形态观察,其菌体直径为 0.4 ~ 0.6 μ m \times 1.0 μ m,无鞭毛,外表裹一类似于荚膜的薄层结构(见图 3)。但小鼠腹腔接种

10⁹ 菌液,15 d 内活动度与饮食状况均无异常,无死亡,动物实验初步显示对小鼠无致病性。由 K-B 纸片扩散法的抑菌环直径来看,该菌株对四环素、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、庆大霉素、妥布霉素等敏感,对万古霉素、克林霉素、青霉素、头孢唑啉、放线菌酮等耐药(见表 4)。经初步的分析,对于环境水样,可完全按照军团菌的水样浓缩及酸处理方法,接种军团菌选择性 GVPC 培养基,以分离该种类的菌株。

3 讨论

弗兰西斯菌广泛存在于自然界中,生命力顽强,在土壤、水、动物腐烂的尸体及粪便中能存活数周,并且对包括人类在内的多种哺乳动物、鸟类、节肢类、甲壳类动物(龙虾)、鱼类等具有致病性^[14-16]。土拉热弗兰西斯菌土拉亚种(*F. tularensis* subsp. *tularensis*)是弗兰西斯菌属中发现最早,毒性最强,也最具传播性及感染致死性的甲类生物恐怖细菌^[17]。在外环境中,该菌能够在阿米巴宿主细胞内繁殖和扩散,这一特点与军团菌十分相似^[18]。并且,作为胞内寄生菌,土拉热弗兰西斯菌土拉亚种还具有气溶胶传播性及低剂量感染性,是实验室获得性感染(laboratory-acquired infections, LAI)的重要病原菌^[19]。尽管该菌引发的感染,多发生于北方草原,但在 1994 年,我国山东省有从眼结膜炎及咽峡炎患儿血中曾有分离报道,并证实土拉热弗兰西斯菌有南移趋势^[20]。而我国部分地区嗜食鱼生、醉虾、老鼠、龙虱等,具有潜在的感染危险因素,故应当引起实验室人员的注意。

鉴于弗兰西斯菌能够在 BCYE α 琼脂上生长良好^[21],且可能会与军团菌抗体出现交叉凝集^[22]。因此,在常规的军团菌检测过程中,出现可疑菌株时,

可以通过一些表型的生理生化特征,及分子生物学手段进行鉴别分析。鉴别实验包括:①培养基生长实验:军团菌同时具有L-同型半胱氨酸依赖性,及活性炭依赖性,但在含L-半胱氨酸而无活性炭的胱氨酸脑心浸液血琼脂,厌氧血琼脂平板上均不生长。弗兰西斯菌细菌的营养需求状况,则相对没有军团菌严格,延长孵育时间则多数培养基均能出现生长现象。②动力鞭毛观察:现有的弗兰西斯动力实验均为阴性,而军团菌属细菌,除橡树岭军团菌外,均有动力鞭毛^[23]。③PCR鉴定:弗兰西斯菌属特异性引物F11-F5、军团菌属特异性引物L16S_225-L16S_858、L16S_p1.2-L16S_cp3.2可将两个种属区分开来。需值得注意的是,弗兰西斯菌属特异性引物F11-F5的PCR鉴定,其退火温度控制在62~65℃左右,并注意目的片段大小,因多株军团菌可扩增出750 bp非特异性片段(见图1)。④细胞脂肪酸分析:弗兰西斯菌具有特殊的细胞脂肪酸谱,富含偶链饱和脂肪酸(C10:0、C14:0、C16:0),以及两个长链羟基酸(3-OH C16:0、3-OH 18:0)。⑤基于广谱PCR扩增基因测序鉴定:该方法是细菌分类学鉴定的确定性依据之一。且从我们的实验结果及文献资料来看,Forsman,Lo Presti,Ko等^[7,41-12]报道的16S rRNA基因的A1-r1488、F1-R13引物,ropB基因RL1-RL2引物均可同时扩增军团菌及弗兰西斯菌,并进行序列分析(见图1)。此外,从理论上说,糖发酵实验也可以用于鉴别军团菌与弗兰西斯菌。军团菌不氧化发酵任何糖类,而现有的弗兰西斯属细菌则均可发酵葡萄糖^[1,4]。但在API NH生化反应板条上,我们观察到嗜肺军团菌(*L. pneumophila* ATCC 33152)及麦氏军团菌(*L. micdadei* ATCC 33218)均出现阳性的糖发酵实验结果(见表2),具体原因则有待于进一步研究。

尽管动物实验的结果表明,弗兰西斯菌08HL01032对小鼠无致病性,但不排除该菌株因人工传代或培养基生长状况等因素,导致了毒力的减弱或丢失。从透射电镜观察的菌体表面包裹的一层类似荚膜样结构来看,该菌株具有潜在的致病性;因此,一旦在适宜的条件下获得某些毒力基因,通过空调系统以空气气溶胶的形式进行传播和扩散,亦有可能对人类身心健康造成重大危害。

参考文献

- [1] Hollis DG, Weaver RE, Steigerwalt AG, et al. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(7): 1601 - 1608.
- [2] Ottem KF, Nylund A, Karlsbakk E, et al. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Archives of Microbiology*, 2007, 188(5): 547 - 550.
- [3] Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 52(3): 1043 - 1047.
- [4] Ottem KF, Nylund A, Karlsbakk E, et al. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(4): 1231 - 1243.
- [5] Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. *Current Microbiology*, 2008, 7(4): 294 - 300.
- [6] Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, et al. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *Legionella* in bronchoalveolar fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(5): 1247 - 1252.
- [7] Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(1): 38 - 46.
- [8] Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, et al. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(6): 1045 - 1048.
- [9] 屈平华, 尹一兵, 胡朝晖, 等. 环境军团菌的分离培养及鉴定方法探讨. *中华预防医学杂志(Chinese Journal of Preventive Medicine)*, 2008, 42(9): 653 - 657.
- [10] Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, et al. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(6): 1560 - 1567.
- [11] Lo Presti F, Riffard S, Meugnier H, et al. *Legionella greslensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(6): 1949 - 57.
- [12] Ko KS, Lee HK, Park MY, et al. Application of RNA Polymerase β -Subunit Gene (*rpoB*) Sequences for the Molecular Differentiation of *Legionella* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(7): 2653 - 2658.
- [13] Stackebrandt E and Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 1994, 44: 846 - 849.

- [14] Barns SM , Grow CC , Okinaka RT , et al. Detection of diverse new Francisella-like bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 , 71(9) , 5494 – 5500 .
- [15] Evans ME , Gregory DW , Schaffner W , et al. Tularemia : a 30-year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1985 , 64(4) : 251 – 269 .
- [16] Anda P , Segura del Pozo J , Díaz García JM , et al. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerging infectious diseases*. 2001 , 7(3 Suppl) : 575 – 582 .
- [17] McLendon MK , Apicella MA , Allen LH. *Francisella tularensis* : taxonomy , genetics , and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annual Review of Microbiology*. 2006 , 60 : 167 – 185 .
- [18] Berdal BP , Mehl R , Meidell NK , et al. Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1996 , 13(3) : 191 – 195 .
- [19] Pike PM. Laboratory-associated infections : summary and analysis of 3921 cases. *Health Laboratory Science*. 1976 , 13(2) : 105 – 114 .
- [20] 杜文功 , 高元兰 . 从眼结膜炎及咽峡炎患儿血中分离出土拉热弗朗西氏菌 . 医学理论与实践(*Journal of Medical Theory and Practice*) , 1994 , 7(9) : 44 – 45 .
- [21] Westerman EL and McDonald J. Tularemia pneumonia mimicking legionnaires ' disease : isolation of organism on CYE agar and successful treatment with erythromycin. *Southern Medical Journal* , 1983 , 76(9) : 1169 – 1170 .
- [22] Roy TM , Fleming D , Anderson WH. Tularemic pneumonia mimicking Legionnaires ' disease with false-positive direct fluorescent antibody stains for *Legionella* . *Southern Medical Journal* , 1989 , 82(11) : 1429 – 1431 .
- [23] 杨瑞馥 , 汪晓辉 , 李崇辉 , 等 . 橡树岭军团菌的分离及用 16S rRNA 测序法的鉴定 . 微生物学免疫学进展 (*Progress in Microbiology and Immunology*) , 1999 , 27(1) : 1 – 5 .

Identification and characterization of the *Francisella* sp. strain 08HL01032 isolated in air condition systems

Pinghua Qu¹ , Xiaoling Deng² , Jian Zhang¹ , Jingdiao Chen² , Jing Zhang¹ , Quanxin Zhang¹ , Yang Xiao¹ , Shouyi Chen¹

(¹ Guangzhou Center for Diseases Control and Prevention , Guangzhou 510880 , China)

(² Deputy Director of Institute of Microbiology , Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province , Guangzhou 510300 , China)

Abstract [Objective] To identify and characterize the strain 08HL01032 was isolated from air condition systems in the routine investigations of *Legionella* in Guangzhou , China , in 2008. **[Methods]** We adopted several phenotypic and genotypical methods , such as the growth status on various media , morphological , physical and biochemical characteristics , animal test , antibiotic susceptivities , PCR identification , sequence analysis of 16S RNA and RNA polymerase β -subunit (*ropB*) gene etc , to determinate the phylogenetic position and outline the basic biological characteristics. **[Results]** Strain 08HL01032 was Gram-negative with polymorphic short rods or coccobacillus ; with no flagella ; devoid of spores ; well growth on buffered charcoal yeast extraction (BCYE) agar and BCYE supplemented with glycine (3 g/L) , polymyxin B sulfate (80000 iu/L) , vancomycin (1 mg/L) and cycloheximide (80 mg/L) (GVPC medium) within 2 days , but delayed growth on ordinary sheep blood agar until 5 – 7 days ; catalase positive ; oxidase negative ; no reduction of nitrate ; no hydrolysis of urea ; delayed fermentation of glucose to produce acid ; which was primarily considered as *Legeionella* . It was lastly identified to the genus *Francisella* , characterized by a variety of biochemical and molecular phylogenetic tests , which shared the highest similarities to *F. Philomiragia* with 95.3% to 16S rRNA gene of 1377 oligo nucleotides and 87.3% to *ropB* gene of 367 oligo nucleotides (GenBank accession number : FJ591095 , FJ939309). Growth were observed after a treatment for 10 minutes with the KCl-HCl buffer of pH 2.2 , 20°C , and at 25°C , 37°C (optimum 25°C – 28°C) , but not at 42°C . The cells had capsule-like construction by transmission electron microscopy , however no virulence found to mice. **[Conclusions]** Strain 08HL01032 was a potential new species of the genus *Francisella* with a typical characteristic of L-cysteine growth stimulating activity , distinguishingly to *Legionella* with L-cysteine growth dependent activity.

Keywords : L-cysteine growth stimulating activity ; *Francisella* ; identification ; characterization

(本文责编 : 张晓丽 , 谷志静)

Supported by the the Major Project of Public Health Bureau of Guangzhou (2006-zdi-11) and Projects of Science and Technology Development of Guangdong Province (2008B030301358)

* Corresponding author. Tel : + 86-20-83824103 ; Fax : + 86-20-83824103 ; E-mail : shouyi_chen@163.com

Received : 12 February 2009 / Revised : 20 May 2009