

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 sp.</i>	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

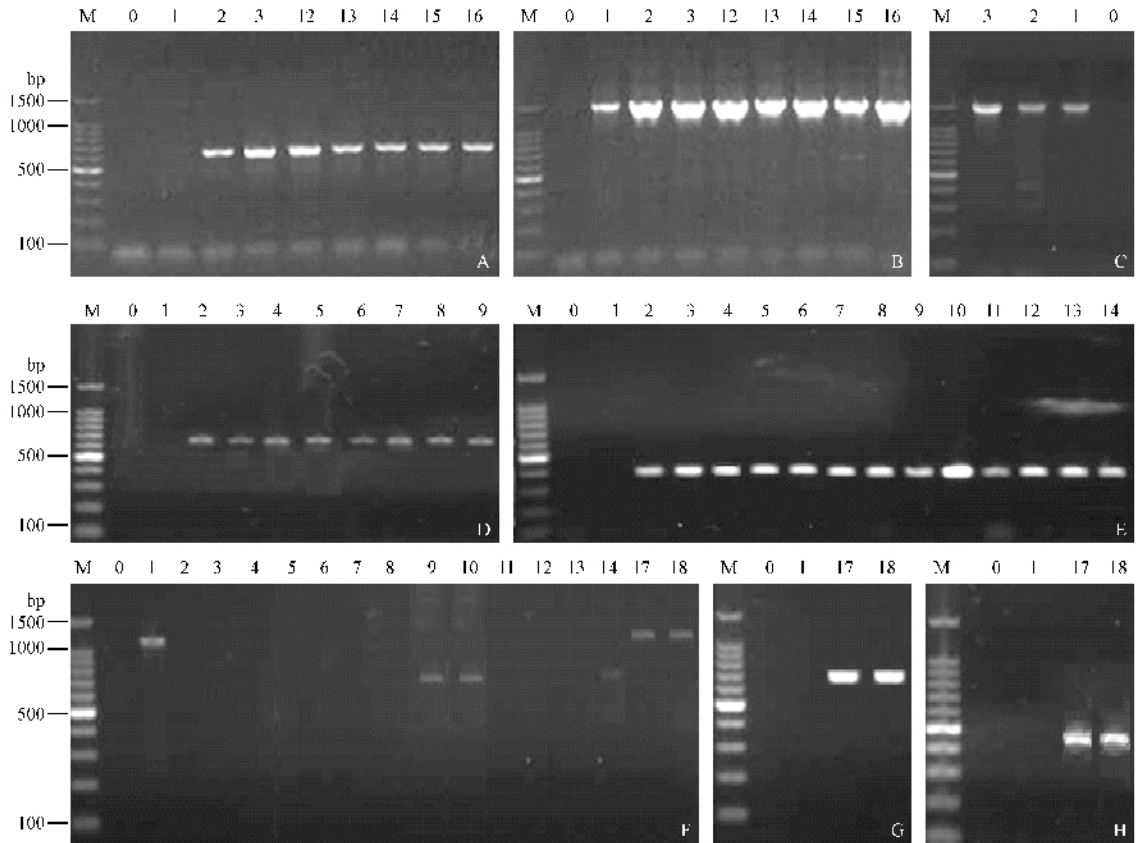
^a Test items of glucose fermentation, nitrate reaction, urea hydrolysis, gelatine Liquefaction, hippurate sodium hydrolysis were Zhongsheng *Legionella* biochemical kits. +, positive; -, negative; FP, false positive result for the delayed growth on the media without L-cysteine; FN, false negative result 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,但能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。

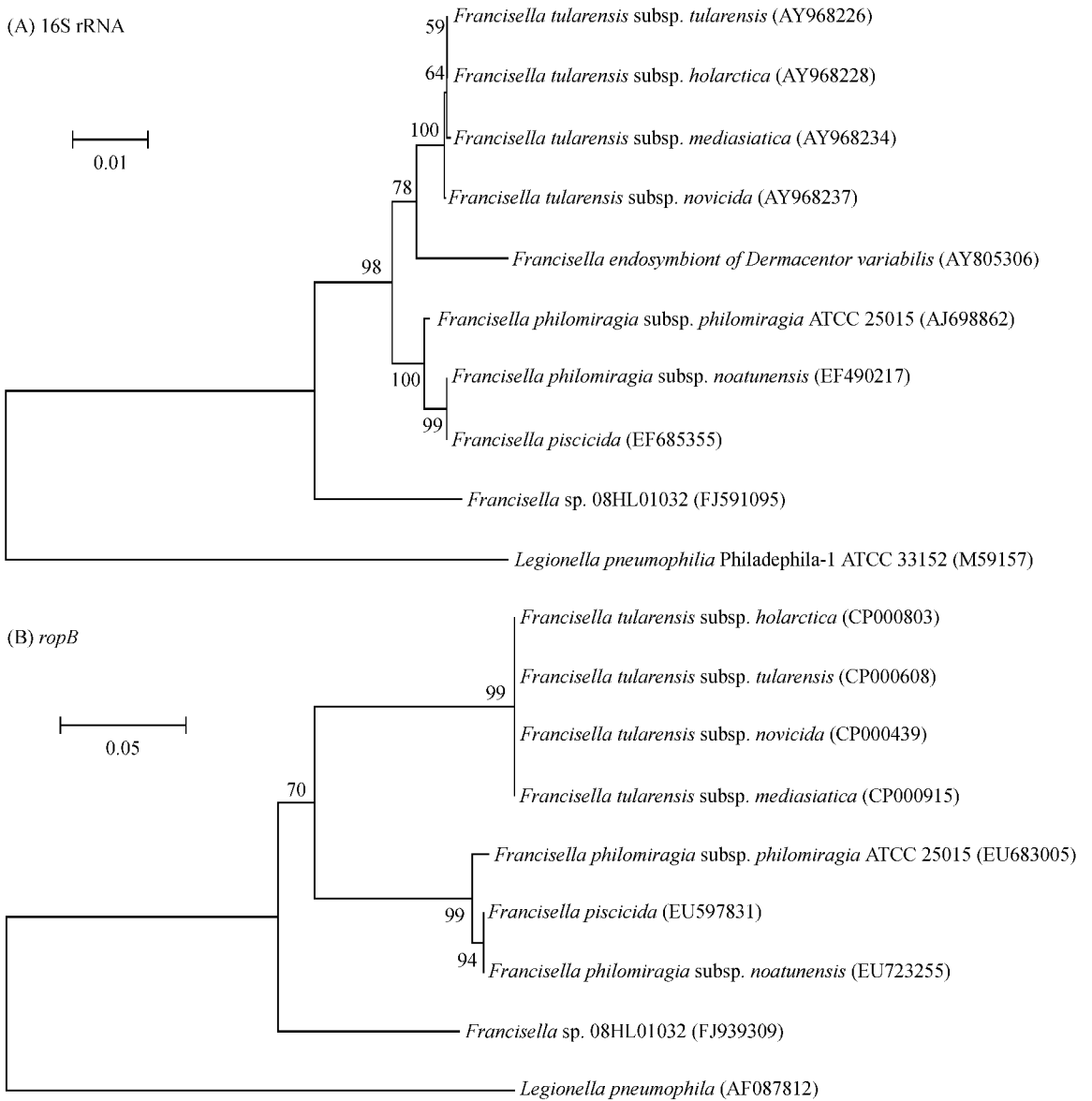


图 2 菌株 08HL01032 系统发育树

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.

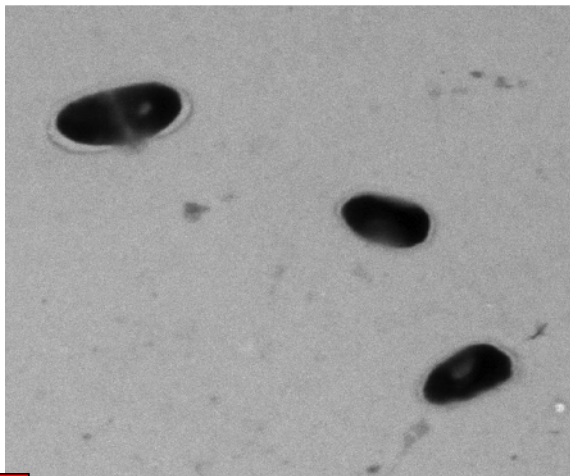


图 3 菌株 HL01032 的透射电镜照片

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^[14]。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* (Gammmaproteobacteria; 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