

弗朗西斯菌分类鉴定与流行趋势的研究进展

顾全¹ 屈平华² 陈守义³ 朱庆义^{1*}

(1. 广州金域医学检验中心有限公司 广东 广州 510330)

(2. 广东省中医院 检验医学部 广东 广州 510120)

(3. 广州市疾病预防控制中心 广东 广州 510440)

摘要: 弗朗西斯菌是一类革兰氏阴性染色的苛养性细菌。该菌属的模式菌种——土拉热弗朗西斯菌是人畜共患病土拉热病的病原体。弗朗西斯菌广泛存在于土壤、草丛、沼泽等自然环境和被感染的动物宿主体内, 可以通过空气气溶胶、节肢动物叮咬以及直接接触受污染的环境、物品和饮食等多种方式传播。近年来, 世界各地有大量新型的弗朗西斯菌种的发现报道。我们课题组于2008年始, 从城市集中空调冷凝水系统中分离了多株弗朗西斯菌, 并初步发现了两个弗朗西斯菌属的新种, 其中广州弗朗西斯菌已获得正式命名。然而这些新细菌的鉴定方法, 流行病学特征均不十分明确。本文简要综述了弗朗西斯菌的分类现状、分离鉴定方法等最新的研究进展情况, 供国内学者参考。

关键词: 弗朗西斯菌, 分类鉴定, 流行趋势

Identification and epidemic trend of *Francisella*: a review

GU Quan¹ QU Ping-Hua² CHEN Shou-Yi³ ZHU Qing-Yi^{1*}

(1. Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou, Guangdong 510330, China)

(2. Department of Clinical Laboratory, The Traditional Chinese Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

(3. Center for Diseases Prevention and Control of Guangzhou, Guangzhou, Guangdong 510440, China)

Abstract: *Francisella* is a gram-negative fastidious bacteria. *F. tularensis*, the type species of *Francisella* genus, causes a zoonotic disease tularemia. *Francisella* was isolated from soil, grass, moor and infected animals. It can spread with aerosols, infected arthropod, contaminated water and food. In recent years, several species of *Francisella* were identified, including *F. guangzhouensis* and other potential pathogenic species, isolated from air-conditioning cooling water in Guangzhou. However, the identification and epidemic risks of these genus were unclear yet. This review summarized the recent advances in the classification, identification and epidemic of *Francisella*.

Keywords: *Francisella*, Identification, Epidemic

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300004)

*通讯作者: Tel: 86-20-29196077; 邮箱: zqy@kingmed.com.cn

收稿日期: 2014-06-12; 接受日期: 2014-07-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-24

弗朗西斯菌(*Francisella*)是一种苛养的、兼性细胞内寄生的革兰氏阴性杆菌,隶属于 γ -变形菌门^[1]。在自然界中弗朗西斯菌广泛存在于土壤、草丛、海洋和沼泽或小型哺乳动物、海洋鱼类、贝壳类等自然宿主体内,可通过空气气溶胶、蜱虫叮咬、接触疫水、家庭宠物的亲密接触等方式进行传播。该菌属代表菌种——土拉热弗朗西斯菌(*F. tularensis*)毒力强,感染病死率高,被认为是一种烈性传染性的生物恐怖菌^[2]。近年来,弗朗西斯菌增加了一些新的菌种,其中包括我们从集中空调系统中分离的广州弗朗西斯菌(*F. guangzhouensis*)^[3]。目前,广州弗朗西斯菌的临床意义还不明确,但从弗朗西斯菌与军团菌相类似的生命循环史来看,城市集中空调系统也可能成为弗朗西斯菌感染暴发的一个新的途径。然而,国内的临床实验室对于弗朗西斯菌的分类、特征等尚缺乏相应的研究与认识。本文主要对弗朗西斯菌的分类现状,病原学特征,流行情况,分离鉴定方法等做一综述。

1 弗朗西斯菌的分类现状

根据《国际微生物进化和分类杂志》的最新分类,截至2014年1月,弗朗西斯菌属包括6个有效命名种:土拉热弗朗西斯菌、蜃楼弗朗西斯菌(*F.*

philomiragia)、诺神弗朗西斯菌(*F. noatunensis*)、西班牙弗朗西斯菌(*F. hispaniensis*)、杀鲍鱼弗朗西斯菌(*F. halioticida*)和广州弗朗西斯菌(表1)。

目前,已明确与人类疾病相关的有土拉热弗朗西斯菌、蜃楼弗朗西斯菌和西班牙弗朗西斯菌。土拉热弗朗西斯菌有4个亚种:土拉亚种(*tularensis*)、全北美区亚种(*holartica*)、中亚亚种(*mediasiatica*)和新凶手亚种(*novicida*);其中土拉亚种主要存在于北美洲,对大多数哺乳动物具有强毒性,其宿主主要为松鼠和野兔,常由蜱传播;全北美区亚种主要存在于欧洲、亚洲和北美洲,可引起海狸、鼠类发病,毒力稍弱;新凶手亚种(*novicida*)即先前的新凶手弗朗西斯菌^[4],主要对免疫力低下人群引起感染;中亚亚种则主要存在于中亚细亚地区,较少引起人类感染。蜃楼弗朗西斯菌的感染较为少见,由现有的资料来看,其对于慢性肉芽肿性疾病、骨髓及外骨髓增殖紊乱者和有溺水经历患者易感,且大多数患者生活在咸水或咸淡水交接的河畔^[5-7]。西班牙弗朗西斯菌分离于人的血液,其引起的临床感染也较为少见。另外,Kugeler等2008年报道了一个新的弗朗西斯菌的临床感染,其分离于人的血液和脑脊液,其分类地位尚待确认^[8]。

表1 弗朗西斯菌属命名与相关信息
Table 1 List of *Francisella* spp. and relative information

种名 Specie names	命名时间 Time	分离来源 Source	疾病相关 Pathogenicity
<i>Francisella tularensis</i>			
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	1947	Soil, infected animal and human	++++
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holartica</i>	1983	Soil, infected animal and human	++
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i>	1983	Soil and infected animal	++
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	2010	Immunocompromised individuals	+
<i>Francisella philomiragia</i>	1989	Soil and water	+
<i>Francisella noatunensis</i>			
<i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>noatunensis</i>	2009	Seawater and infected marine fish	N/A
<i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i>	2009	Seawater and infected marine fish	N/A
<i>Francisella hispaniensis</i>	2010	Human blood	++
<i>Francisella halioticida</i>	2012	<i>Haliotis gigantea</i>	N/A
<i>Francisella guangzhouensis</i>	2013	Cooling water	N/A

Note: +: Positive (the number of + shows the levels of pathogenicity); N/A: Not tested.

需要指出的是,一些弗朗西斯菌种分类学地位还存在争议。例如,有研究发现,新凶手亚种与土拉亚种的全基因组进化路线完全不同,故认为仍应该保留“新凶手弗朗西斯菌”的种的地位、而不是土拉弗朗西斯菌的一个亚种^[9]。Mikalsen 基于智利分离株 PQ 1106 和日本分离株 Ehime-1 命名的亚洲弗朗西斯菌(*F. asiatica*),与 Ottem 命名的诺神弗朗西斯菌东方亚种(*F. noatunensis* subsp. *orientalis*)也存在矛盾^[10]。

2 病原学特性

2.1 形态与染色

弗朗西斯菌是一类革兰氏染色阴性的球杆菌,该菌镜下呈现沙粒状,无芽孢,无鞭毛,无抗酸性,菌体直径在 0.2–1.7 μm,长时间培养后呈多形性,球状、杆状和长丝状菌体均可见。弗朗西斯菌在半胱氨酸心浸液血平板(CHAB)上菌落圆形凸起,灰蓝色,光滑,湿润并有狭窄的 α 溶血环,从动物体内

分离得到的菌株可以形成荚膜。

2.2 生化特性

弗朗西斯菌严格需氧,除西班牙弗朗西斯菌外均为触媒弱阳性。土拉热弗朗西斯菌、蜃楼弗朗西斯菌和西班牙弗朗西斯菌氧化酶阳性(Kovacs 改良法)^[11],诺神弗朗西斯菌氧化酶阴性^[10]。该菌属细菌的生化反应不活泼,能迟缓发酵葡萄糖。一般认为,该菌属能在含 L-半胱氨酸的 KIA 斜面产生 H₂S^[6],但 H₂S 产生实验的结果并不稳定,Kugeler 对多个弗朗西斯菌进行实验,结果仅蜃楼弗朗西斯菌为阳性;从理论上说,KIA 斜面的铁离子可能会与 L-半胱氨酸结合而产生假阳性结果;我们实验室采用不含 L-半胱氨酸的 KIA 斜面对蜃楼弗朗西斯菌 ATCC 25015 进行实验,发现其能在不含 L-半胱氨酸的 KIA 斜面斜面上生长,但并不产生 H₂S,因此,弗朗西斯菌属的这一生化特性可能还有待于修正。属内部分生化反应鉴别见表 2。

表 2 弗朗西斯菌属内生化特征						
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of <i>Francisella</i>						
生化表型 Biochemical phenotype	<i>F. tularensis</i>	<i>F. philomiragia</i>	<i>F. noatunensis</i>	<i>F. hispaniensis</i>	<i>F. halioticida</i>	<i>F. guangzhouensis</i>
氧化酶 Oxidase	+	+	–	+	–	–
触酶 Catalase	W	W	W	W	+	W
吡啶 Indole	N/A	+	+	–	–	–
脲酶 Urease	–	–	N/A	N/A	N/A	–
半胱氨酸依赖 Cysteine requirement	+	–	–	–	+	+
硫化氢 H ₂ S	N/A	+	+	–	–	–
明胶液化 Gelatin hydrolysis	–	+	–	–	+	W
硝酸盐还原 Nitrate reduction	–	–	N/A	–	N/A	–
葡萄糖 D-Glucose	+	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	– ^a	–	–	+	+	+
麦芽糖 Maltose	N/A	+	W	–	N/A	–
甘油 Glycerol	–	–	–	+	N/A	–
乳糖 Lactose	N/A	+	–	+	+	–
无 NaCl 生长 Growth without NaCl	–	–	–	N/A	–	+
6% NaCl 生长 Growth in 6% NaCl	– ^b	+	+	N/A	+	–

Note: +: Positive; –: Negative; W: Weak; N/A: Not tested. ^a: *Francisella tularensis* subsp. *novicida* acid production from sucrose weak positive; ^b: *Francisella tularensis* subsp. *novicida* can grow in 6% NaCl medium.

2.3 分离与培养

弗朗西斯菌属于苛养性细菌,专性需氧,对分离培养要求较高,培养时间较长。土拉热弗朗西斯菌和西班牙弗朗西斯菌最适宜生长温度为36–37 °C,而诺神弗朗西斯菌与杀鲍鱼弗朗西斯菌最适宜温度为20 °C^[4]。土拉热弗朗西斯菌的初次分离需在含有生长促进剂L-半胱氨酸的培养基^[12],而蜃楼弗朗西斯菌和诺神弗朗西斯菌在不含半胱氨酸的血平板上可以生长形成细小菌落^[13],杀鲍鱼弗朗西斯菌需要在培养基中添加海水成分^[14]。由于弗朗西斯菌有胞内寄生能力,除了人工培养基外,也可使用细胞培养,如鲑鱼头肾细胞(Salmon head-kidney cell, SHK-1)^[7]。

目前尚无弗朗西斯菌分离培养的标准方法,较为常用的人工培养基有CHAB^[15]、巧克力平板、TM平板(Tyayer-Martin agar)^[5]、缓冲活性碳酵母平板(BCYE)^[16]。弗朗西斯在分离过程中容易被其他微生物覆盖。培养基中可以根据环境样品分离需要添加不同的抗生素制作成选择培养基,可提高环境样品中弗朗西斯的分离效率,如CHAB-A平板^[17]、CHAB-PACCV平板^[15]、BCYE-GVPC平板等。除了添加抗生素之外,在接种前对样品进行酸处理和热处理也可抑制样品中其他微生物的生长^[18]。

3 实验室鉴定

(1) 生化鉴定: 弗朗西斯菌生长缓慢,生化反应不活泼,部分生化反应可见表2。利用梅里埃Vetrik系统GN鉴定卡可鉴定土拉热弗朗西斯菌,其他弗朗西斯菌种尚无商品化鉴定产品也无特异性生化指标。

(2) 细胞脂肪酸成分分析: 弗朗西斯菌属有独特的脂肪酸谱,其主要的脂肪酸成分是C_{10:0}(22%)、C_{14:0}(15%)、C_{16:0}(18%)、3-OH-C_{18:0}(17%),以及一些不常见的C_{22:0}、C_{24:0}和C_{24:10},其采用细胞脂肪酸分析可准确鉴定到“属”的水平。Clarridge等对一些土拉热弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌的标准菌株和临床分离株进行脂肪酸分析发现,所有实验菌

株通过MIDI数据库分析均鉴定为土拉热弗朗西斯菌,但脂肪酸谱却将这些实验菌株分为3个密切相关的菌群^[19]。脂肪酸组成可作为该菌的鉴定依据。

(3) 免疫学检测: 血清凝集试验和酶联免疫吸附试验是诊断*F. tularensis*感染的主要手段,病人通常在感染后的10–20 d内产生抗体,外膜蛋白FopA、LPS、外膜糖蛋白片段(Outer membrane carbohydrate-protein fraction, OMP)以及灭活的细菌均可用于抗体检测。此外抗原检测可直接鉴定标本和培养物中的弗朗西斯菌。如Petersen采用直接免疫荧光染色,以FITC标记的兔抗直接检测临床标本中的*F. tularensis*^[20]。免疫组化染色可直接检测固定组织中的*F. tularensis*^[21]。

(4) PCR和测序鉴定: 根据弗朗西斯菌种的16S rDNA序列,设计了属特异性引物F1-R13、土拉热弗朗西斯菌特异性引物FTS8-FTS12, FTL8-FTL12和蜃楼弗朗西斯菌特异性引物FP5-FP8^[22–23]。利用16S rDNA序列相似度分析,能将大部分弗朗西斯菌鉴定到亚种水平。23S rDNA、5S rDNA等rRNA基因序列也可用于弗朗西斯菌的鉴定^[24]。*fopA*与*tul4*基因分别编码17 kD与24 kD的外膜蛋白,是鉴定土拉热弗朗西斯菌的重要靶位基因,根据其序列设计的荧光TaqMan PCR方法可直接检测样品中的土拉热弗朗西斯菌^[25–26]。一些管家基因,如*rpoB*、*shdA*、*mdh*、*groEL*、*rpoA*、*pgm*和*atpA*是鉴定弗朗西斯菌的辅助鉴定靶位,对某些种间16S rDNA具有较高一致性的弗朗西斯菌,根据管家基因序列相似度与重建的系统发育树能将弗朗西斯菌准确鉴定到种。诺神弗朗西斯菌与蜃楼弗朗西斯菌16S rDNA相似度高达99.3%,曾命名为蜃楼弗朗西斯菌诺神亚种, Ottem利用多个管家基因序列确定诺神弗朗西斯菌为独立的种^[27]。但需注意的是,弗朗西斯菌属内变异较大,目前现有的管家基因引物不能扩增出所有弗朗西斯菌种。根据我们对广州弗朗西斯菌的研究,除16S rRNA之外,仅*rpoB*、*shdA*和*mdh*能满足目前所有弗朗西斯菌种的鉴定。

全基因组测序: 目前 NCBI 数据库中已有 *F. tularensis*、*F. philomiragia*、*F. noatunensis* 的全基因组序列。93%–94% 的全基因组平均核苷酸同源性 (Average nucleotide identity, ANI) 相当于 70% 的 DNA-DNA 杂交同源性, 可准确鉴定原核生物新种。此外全基因组信息可用于研究土拉热弗朗西斯菌亚种的致病性、分型与遗传进化关系^[28]。目前广州弗朗西斯菌已完成全基因组测序草图。

对于弗朗西斯菌新种的鉴定, 运用多相分类技术能最接近真实的反映弗朗西斯菌的分类地位。以广州弗朗西斯菌鉴定为例, 其生化反应、主要脂肪酸构与弗朗西斯菌属相符, 16S rDNA 与 23S rDNA 序列与 *F. philomiragia* 相近, 管家基因 *recA*、*gyrB*、*groEL*、*dnaK*、*rpoA*、*rpoB*、*rpoD*、*rpoH*、*fopA* 以及 *sdhA* 同源性分析提示其为未知种, 最终综合多相分类信息确定其为广州弗朗西斯菌。

4 流行情况

土拉热弗朗西斯菌广泛分布于自然界中, 已从数百种动物中分离, 包括哺乳动物、鸟类、鱼类和节肢动物。被污染的水、土壤、植物和动物的粪便也是病原体的主要来源^[29], 可借助阿米巴及生物膜结构进行繁殖和扩散^[30-31]。土拉热弗朗西斯菌为高致病性的二类病原微生物。据美国疾病预防控制中心监测, 1991–2010 年期间, 共有 2 429 例病例报道, 大多集中在美国中西部地区^[32-33]。在我国土拉热并非法定报告传染病, 因此病例报道较少, 但在青海、黑龙江、西藏、山东、河北有 5 次暴发的报道^[34]。蜃楼弗朗西斯菌通常存在于咸水或咸淡水交界的河畔或沼泽, 可感染松鼠等小型哺乳动物, 对人致病性较弱, 易感染免疫缺陷病人。诺神弗朗西斯菌与杀鲍鱼弗朗西斯菌生长温度低, 主要感染鱼类、贝类造成经济损失, 尚无人感染报道。西班牙弗朗西斯菌分离自病人血液, 广州弗朗西斯菌分离自集中空调冷却水, 与人类健康密切相关。

弗朗西斯菌的传播主要通过自然环境或宿主感染人类, 人与人传播证据不足。主要的传播途径

有: 带菌节肢动物的叮咬是目前人感染兔热病的主要途径; 空气气溶胶传播, 这是实验室感染的主要原因, 也是可能引起人群中弗朗西斯菌大范围暴发的危险因素之一; 接触受污染的土壤、水或食物。

人群不分年龄性别对土拉热弗朗西斯菌普遍易感。病例主要出现在乡村, 城镇少有发生, 这可能与它的自然宿主和传播途径主要存在于乡村有关。猎人、屠宰人员、农夫以及实验室工作人员因为职业因素接触土拉热弗朗西斯菌的机会较多, 属于高危人群。土拉热的大多数病例发生在 6–9 月之间, 这可能与传播土拉热弗朗西斯菌的节肢动物的主要活动时间在夏季有关。

土拉热早期常表现为发热、寒战、头痛等一些非特异的症状。根据美国疾病预防控制中心的定义, 该菌临床表现可分为: 溃疡腺型、腺型、眼腺型、脑膜炎型、胃肠炎型、肺炎型、伤寒型^[35]。在美国, 最常见的土拉热病为溃疡腺型, 主要由蜱咬伤或与受染动物密切接触引起。感染后, 皮肤被咬部位先出现红色疹, 随后坏死形成浅表溃疡, 通过淋巴系统扩散造成局部淋巴结炎, 同时还可形成菌血症。目前比较成熟的诊断方法局限于血清学的诊断, 可通过酶联免疫吸附法和血凝实验等诊断土拉热, 但病原体分离率低。近年来新兴的分子诊断技术是诊断土拉热弗朗西斯菌的感染重要辅助方法。

随着社会进步与生活习惯改变, 弗朗西斯菌的流行呈现新趋势。传统的弗朗西斯菌病多发于北方草原, 主要由狩猎野生动物、接触土拉热弗朗西斯菌污染的自然环境引起。近年来, 由于乡村人口减少, 卫生条件提高, 狩猎市场逐步消失, 无形中切断了土拉热弗朗西斯菌的传播条件。户外游玩可能是土拉热弗朗西斯菌新的传播途径, 美国 Martha's Vineyard 景区连续 8 年报道土拉热病例^[36]。家庭饲养宠物的增多, 使弗朗西斯菌的威胁也正在增加^[37]。另外, 新发弗朗西斯菌的致病性与传播途径不明, 实验室内感染, 恐怖分子利用土拉热弗朗西斯菌作为生物战剂, 这些潜在危害依然存在。

5 结论与展望

土拉热弗朗西斯菌具有烈性传染性,对人类致病性强。其他弗朗西斯菌多为近年新发现的新种,其临床致病能力、致病机制、流行情况均尚待深入研究。弗朗西斯菌为一种苛养性细菌,培养难度大,生化反应不活泼,缺乏商品化的鉴定产品,均会导致其临床分离率低,鉴定错误,造成该菌流行情况与致病能力的低估。近年来,随着生活习惯的改变,弗朗西斯菌的流行也出现新的趋势值得人们注意。特别是空调系统中发现的广州弗朗西斯菌预示着弗朗西斯菌可存在于更广阔的自然环境中,突破了原来的认识局限。这是第一次从人工水系统中分离到弗朗西斯菌。由此推测弗朗西斯菌可由污染的湖泊、河流以生活用水的形式流入到人工供水系统,或通过老鼠、蜚虫等中间宿主进入集中空调系统或城市二次供水系统。由于弗朗西斯菌不仅具有在阿米巴胞内寄生和繁殖扩散能力,而且在适应宿主阿米巴吞噬体-溶酶体消化的过程中,形成“细胞内循环”机制^[9]。因此,就弗朗西斯菌与军团菌的相似性来看,输水管道内可能存在的阿米巴原虫、以及长期使用后的“生物膜”结构将有利于该菌逃避氯离子等消毒剂的杀菌作用长期定殖存活^[30],并通过空调系统和二次供水系统快速大范围传播。弗朗西斯菌长期定殖空调系统将对城市公共健康造成巨大威胁。美国疾病预防控制中心将弗朗西斯菌作为潜在的生物战剂长期监控。在我国积极开展弗朗西斯菌的检测与筛查工作可有效预防与控制该病原体的流行与暴发。

参考文献

- [1] Allen LA. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(14): 1329-1335
- [2] Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73(4): 684-711
- [3] Qu PH, Chen SY, Scholz HC, et al. *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt10): 3628-3635
- [4] Huber B, Escudero R, Busse HJ, et al. Description of

- Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt8): 1887-1896
- [5] 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[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(7): 1601-1608
 - [6] Mailman TL, Schmidt MH. *Francisella philomiragia* adenitis and pulmonary nodules in a child with chronic granulomatous disease[J]. *The Canadian Journal of Infectious Diseases Medical Microbiology*, 2005, 16(4): 245-248
 - [7] Nylund A, Ottem KF, Watanabe K, et al. *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming[J]. *Archives of Microbiology*, 2006, 185(5): 383-392
 - [8] Kugeler KJ, Mead PS, McGowan KL, et al. Isolation and characterization of a novel *Francisella* sp. from human cerebrospinal fluid and blood[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(7): 2428-2431
 - [9] Larsson P, Elfsmark D, Svensson K, et al. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(6): e1000472
 - [10] Mikalsen J, Colquhoun DJ. *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, (Epub ahead of print)
 - [11] Jensen WI, Owen CR, Jellison WL. *Yersinia philomiragia* sp. n., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra zibethica*)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1969, 100(3): 1237-1241
 - [12] Colquhoun DJ, Duodu S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms[J]. *Veterinary Research*, 2011, 42: 47
 - [13] Birkbeck TH, Feist SW, Verner-Jeffreys DW. *Francisella* infections in fish and shellfish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(3): 173-187
 - [14] Brevik OJ, Ottem KF, Kamaishi T, et al. *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(5): 1044-1056
 - [15] Petersen JM, Carlson J, Yockey B, et al. Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(6): 663-667
 - [16] Mitchell JL, Chatwell N, Christensen D, et al. Development of real-time PCR assays for the specific detection of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis*, *holarctica* and *mediaasiatica*[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 24(2): 72-76
 - [17] Petersen JM, Schrieffer ME, Gage KL, et al. Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3733-3735
 - [18] Qu P, Deng X, Zhang J, et al. Identification and characterization of the *Francisella* sp. strain 08HL01032 isolated in air condition systems[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(8): 1003-1010 (in Chinese)
 - [19] 屈平华, 邓小玲, 张健, 等. 一株弗兰西斯菌的鉴定及其微生物学特性研究[J]. *微生物学报*, 2009, 49(8): 1003-1010
 - [19] Clarridge JE 3rd, Raich TJ, Sjøsted A, et al. Characterization of

- two unusual clinically significant *Francisella* strains[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(8): 1995-2000
- [20] Petersen JM, Schrieffer ME, Carter LG, et al. Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002[J]. Emerging Infectious Diseases, 2004, 10(3): 419-425
- [21] Zeidner NS, Carter LG, Monteneiri JA, et al. An outbreak of *Francisella tularensis* in captive prairie dogs: an immunohistochemical analysis[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2004, 16(2): 150-152
- [22] Forsman M, Sandstrom G, Sjostedt 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[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(1): 38-46
- [23] Sjostedt A, Eriksson U, Berglund L, et al. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(5): 1045-1048
- [24] Ottem KF, Nylund A, Karlsbakk E, et al. Characterization of *Francisella* sp., GM2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. Archives of Microbiology, 2007, 187(5): 343-350
- [25] Sjostedt A, Sandstrom G, Tarnvik A, et al. Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*[J]. Journal of Immunology, 1990, 145(1): 311-317
- [26] Versage JL, Severin DD, Chu MC, et al. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12): 5492-5499
- [27] 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[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4): 1231-1243
- [28] Rohmer L, Fong C, Abmayr S, et al. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains[J]. Genome Biology, 2007, 8(6): R102
- [29] Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, et al. Tularemia: a 30-year experience with 88 cases[J]. Medicine (Baltimore), 1985, 64(4): 251-269
- [30] Abd H, Johansson T, Golovliov I, et al. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 600-606
- [31] Durham-Colleran MW, Verhoeven AB, van Hoek ML. *Francisella novicida* forms *in vitro* biofilms mediated by an orphan response regulator[J]. Microbial Ecology, 2010, 59(3): 457-465
- [32] Centers for Disease Control and Prevention. Tularemia—United States, 1990–2000[J]. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2002, 51(9): 181
- [33] Centers for Disease Control and Prevention. Tularemia—United States, 2001–2010[J]. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2013, 62(47): 963
- [34] Zhang F, Liu W, Chu MC, et al. *Francisella tularensis* in rodents, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6): 994
- [35] Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance[J]. MMWR. Recommendations and Reports, 1997, 46(RR-10): 1-55
- [36] Berrada ZL, Telford SR 3rd. Diversity of *Francisella* species in environmental samples from Martha's Vineyard, Massachusetts[J]. Microbial Ecology, 2010, 59(2): 277-283
- [37] Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(12): 967-978