

浦东机场口岸蝇类携带病原菌种类 及 16S rRNA 鉴定

陈拓¹, 曹晓梅², 邓耀华³, 房健慧², 李飞¹

1 南京农业大学, 江苏 南京 210095; 2 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123; 3 上海出入境检验检疫局

摘要: **目的** 确定口岸蝇类携带病原菌种类及分布。**方法** 将蝇类体表、体内细菌分离培养, 单克隆菌株经 Vitek 2 Compact 微生物自动分析及 16S rRNA 基因序列比对。**结果** 在 7 种蝇体表检出 18 种菌, 其中致病菌 2 种, 条件致病菌 14 种, 包括 1 株国内未报道的条件致病菌株 *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*; 蝇体内检出 14 种菌, 其中致病菌 1 种, 条件致病菌 12 种; 携带菌种类最多的是酱麻蝇, 其次为亮绿蝇。**结论** 口岸蝇体携带病原菌的调查, 有利于对新型病原微生物入侵的鉴别及应对突发公共卫生事件。

关键词: 浦东机场; 口岸; 蝇类; 病原菌; 16S rRNA; 鉴定

中图分类号: R384.2; R372 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2012)06-0506-06

Species and 16S rRNA identification of fly-borne pathogens in Shanghai Pudong International Airport

CHEN Tuo¹, CAO Xiao-mei², DENG Yao-hua³, FANG Jian-hui², LI Fei¹

1 Nanjing Agricultural College, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China; 2 China Inspection and Quarantine Science Research Institute, Beijing 100123, China; 3 Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau

Corresponding authors: LI Fei, Email: lifei@njau.edu.cn; CAO Xiao-mei, Email: cxm910@126.com

Supported by the Science and Technology Projects of the State General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China (No. 2011HK153)

Abstract: Objective To investigate the species and distributions of fly-borne pathogens in Shanghai Pudong International Airport. **Methods** The bacteria on the body surfaces and inside the bodies of flies were isolated and cultured. The monoclonal strains were subject to automatic analysis using Vitek 2 Compact and 16S rRNA sequence alignment. **Results** Eighteen species of bacteria (2 pathogens and 14 opportunistic pathogens including *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* that had not been reported in China) were detected on the body surfaces of 7 species of flies, Fourteen species of bacteria (1 pathogens and 12 opportunistic pathogens) were detected inside the bodies of the flies. The fly that carried the most species of bacteria was *Sarcophaga misera*, followed by *Lucilia illustris*. **Conclusion** The investigation of fly-borne pathogens in port will be in favor of the identification of new pathogen species and response to public health emergencies.

Key words: Pudong International Airport; Port; Fly; Pathogen; 16S rRNA; Identification

蝇是一类重要医学昆虫,除骚扰人、污染食物和叮刺吸血(吸血蝇)外,更重要的是传播多种疾病和引起蝇蛆病。蝇类传播疾病包括机械性传播和生物性传播两种方式,蝇类通过体内外携带病原体以及蝇类特有的食性,将病原体传播扩散。蝇体表体内微生物的分离目前主要采取经典的细菌分离方法。对于分离细菌的鉴定,已经开发了很多微生物表型自动分析体系:包括 MicroScan(Dade Behring, West Sacramento, CA, USA)、

Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) 和 Crystal GP (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), 它们是基于微生物代谢或形态特征进行鉴定的。利用这些体系能比较准确、快速、方便地将细菌菌株鉴定到种的水平^[1]。然而这些体系在某些情况下不能对细菌准确鉴定:①种内不同菌株不能表现相同特征;②经较长时间培养或保存的菌株表现不同的生化类型;③从经过长时间抗生素治疗的宿主身上分离的菌株其生化特性发生改变;④相同菌株重复鉴定的结果不一致;⑤供分析的菌种数据库有限;⑥表型变异影响鉴定到种^[1-4]。因此经自动分析仪鉴定的菌种可作为一种粗筛或参比实验结果。近年来,以基因型方法进行细菌鉴定的新标准逐渐被认可并被广泛应用^[1-2, 5-10]。细菌的 16S 核糖体

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011HK153); 中国检验检疫科学研究院所基金(2011JK007)

作者简介: 陈拓(1988-), 男, 在读硕士, 从事医学媒介病原研究。

Email: chentuo3@gmail.com

通讯作者: 李飞, Email: lifei@njau.edu.cn; 曹晓梅, Email: cxm910@126.com

RNA以其在进化上的特征性序列,现已作为细菌分类鉴定的分子指标。16S rRNA为细胞共有,其功能同源且最为古老,既含有保守序列又含可变序列,分子量大小适合操作(1500 bp左右,不同物种的长度略有差异),序列变化与进化距离相适应。16S rRNA可变区为V1~V9,包括了V1~V4共4个高变区,尤其是V2高变区,由于其进化速度相对较快,其中所包含的信息,足够用于物种属及属以上分类单位的比较分析,因此Jones和Francesconi^[11]、Noller和Hoang^[12]报道,测定16S rDNA基因的部分序列即可能达到分子鉴定的目的,比较16S rRNA部分序列或全长能区分不同种的细菌,甚至能区分到亚种水平^[6]。

本研究对上海浦东机场口岸地区捕获的蝇类进行分类鉴定后,对体内外所携带的细菌进行分离、纯化。结合Vitek 2表型鉴定和16S rRNA 1500 bp近全长序列的比对结果,对菌株进行鉴定,旨在了解口岸蝇类携带病原菌分布情况,为口岸蝇媒病监测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料 样本:2011年4月从浦东机场口岸采集7种蝇类,分别为酱麻蝇(*Sarcophaga misera*)、亮绿蝇(*Lucilia illustris*)、常齿股蝇(*Hydrotaea dentipes*)、巨尾阿丽蝇(*Aldrichina grahami*)、元厕蝇(*Chrysomya megacephala*)、家蝇(*Musca domestica*)、大头金蝇(*Chrysomya megacephala*)。试剂:碱性蛋白胨水(APW)、革兰阴性细菌增菌液(GN)、肠道增菌肉汤(EE)、亚硒酸盐胱氨酸(Sc)增菌液;TCBS平板,乙酰胺琼脂平板,SS琼脂平板,麦康凯平板,Baird-Parker平板;营养肉汤、营养琼脂平板干粉等均购自北京陆桥技术有限公司。仪器:Vitek 2 Compact微生物自动分析仪,阳性细菌鉴定卡(GPI),阴性细菌鉴定卡(GNI),均为法国梅里埃生物公司提供。引物合成与测序由华大基因公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 蝇体表细菌培养 每种蝇取25只,置于25 ml无菌生理盐水(0.9% NaCl)的玻璃三角瓶中反复振荡5 min,使蝇体表携带的细菌被充分洗下。分别吸取1 ml洗液注入到10 ml灭菌的APW、GN、EE、Sc增菌液中,37℃过夜孵育。用接种环取一环过夜孵育的APW增菌液接种(平板划线法)于TCBS平板,GN接种于乙酰胺琼脂平板和SS琼脂平板,EE接种于麦康凯平板和Baird-Parker平板,Sc接种于SS平板,37℃孵育。

1.2.2 蝇体内细菌培养 清洗过的蝇类置于培养皿中,各加入75%的乙醇25 ml,体表充分消毒5 min,除去体表细菌,然后用无菌生理盐水冲洗3次,洗去乙

醇。将蝇类腹部剪开,置于放有玻璃珠的三角瓶中,加入25 ml无菌生理盐水用力振荡5 min,使蝇内脏磨烂,其他细菌培养步骤同1.2.1。

1.2.3 细菌分离纯化 分别在上述接种后的平板上挑取相应的目标单菌落1~3个,接种于营养琼脂平板,纯化多代直到获得纯菌株,之后进行革兰染色。

1.2.4 细菌的生化鉴定 用配套的GPI、GNI,在法国生物梅里埃公司的Vitek 2 Compact微生物自动分析仪上进行,方法参照Vitek 2及鉴定卡说明书。

1.2.5 16S rRNA鉴定 以纯化的菌体基因组DNA为模板,PCR扩增16S rRNA基因。上游引物27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';下游引物1492R:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(通用引物)^[13]。PCR体系(50 μl):引物27F和1492R各1 μl,2×TaKaRa Premix Taq Version 2.0(Loading dye mix)25 μl,无菌去离子水23 μl,灭菌枪头挑取适量菌体加入体系。94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环。预变性10 min,72℃10 min,冷却至4℃。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送至华大基因公司测序,测得序列与NCBI数据库进行BLAST比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),数据库选择16S ribosomal RNA sequences(Bacteria and Archaea)。取相似度、得分最高的作为鉴定结果。

2 结果

2.1 Vitek 2 Compact微生物自动分析仪鉴定及16S rRNA比对结果 按照上述分离纯化方法,得到154株纯化细菌,其中Vitek 2微生物全自动分析仪明确鉴定出102株。16S rRNA序列比对测得119株,序列>95%相似度可认定为相同属,>97%可认定为相同种,>99%可认定为同一菌株^[14-15]。结果见表1。

1株Vitek 2鉴定为缓慢葡萄球菌(*Staphylococcus lentus*),16S rRNA序列比对与肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)相似度为99%,此处认定为肺炎克雷伯菌。1株Vitek 2鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),16S rRNA序列与多个属的细菌16S rRNA序列相似度都达到了98%,且分值十分接近,包括柠檬酸杆菌属、沙雷菌属、沙门菌属、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、肠杆菌属、克吕沃尔氏菌属,原因可能是这几个属都属于肠杆菌科,他们在亲缘关系上较为接近,16S rRNA序列也表现较高的相似性。1株Vitek 2鉴定为蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*),16S rRNA序列比对与变形肥杆菌(*Obesumbacterium proteus*)相似度为99%,与蜂房哈夫尼亚菌相似度为

表 1 Vitek 2 与 16S rRNA 鉴定结果对比
Table 1 Comparison between Vitek 2 and 16S rRNA identification results

蝇种	分离部位	Vitek 2 鉴定结果	16S rRNA 比对结果	16S rRNA 相似度	
巨尾阿丽蝇	体表	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1422/1425)	
	体表 ^a	放射根瘤菌	<i>Enterococcus</i>	97%(1195/1228)	
	体表 ^a	大肠埃希菌	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia</i>	99%(1419/1438)、99%(1416/1437)	
	体表	布氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter</i>	99%(1415/1423)	
	体表	雷氏普罗威登斯菌	<i>Providencia rettgeri</i>	99%(1419/1421)	
	体内	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella</i> sp.	99%(1411/1412)	
	体内	蜂房哈夫尼亚菌	<i>Hafnia alvei</i>	99%(1401/1417)	
	体内	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	99%(1412/1414)	
	体内	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1421/1429)	
	体内 ^a	粪产碱菌	-	-	
元厕蝇	体表 ^a	大肠埃希菌	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia</i>	99%(1416/1422)、99%(1413/1421)	
	体表 ^a	<<Slashline>>	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1405/1421)	
	体表 ^a	布氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	99%(1426/1436)	
	体表	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%(1447/1457)	
	体表	产酸克雷伯菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99%(1391/1400)	
	体内	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	97%(1223/1257)	
	体内	摩氏摩根菌摩根亚种	<i>Morganella morganii</i>	99%(1413/1420)	
	体内	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1423/1428)	
	常齿股蝇	体表	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	99%(1041/1045)
		体表	蜂房哈夫尼亚菌	<i>Hafnia alvei</i>	99%(982/995)
体表		肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1410/1418)	
体表 ^a		大肠埃希菌	<i>Escherichia</i>	99%(1415/1425)	
体内 ^a		<<Slashline>>	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1408/1424)	
体内		摩氏摩根菌摩根亚种	<i>Morganella morganii</i>	99%(1420/1438)	
体内		粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%(1439/1451)	
大头金蝇		体表 ^a	蜂房哈夫尼亚菌	<i>Obesumbacterium proteus</i> or <i>Hafnia alvei</i>	99%(1420/1441)、98%(1417/1442)
		体表 ^a	Undefined	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	99%(1403/1419)
		体表	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1419/1425)
	体表	摩氏摩根菌摩根亚种	<i>Morganella morganii</i>	99%(1411/1424)	
	体表	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1421/1429)	
	体内 ^a	Undefined	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1410/1417)	
	体内	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	99%(1427/1435)	
	体内	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1413/1419)	
	体内 ^a	Undefined	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%(1442/1451)	
	酱麻蝇	体表 ^a	大肠埃希菌	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia fergusonii</i>	99%(1426/1442)、99%(1411/1424)
体表		肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1423/1429)	
体表		弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	99%(1424/1434)	
体表 ^a		阴沟肠杆菌	<i>Esch. , Citro. , Ser. , Salmonella. , Enterobacter. , Kluyvera</i>	98%	
体表		松鼠葡萄球菌	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99%(1439/1444)	
体表 ^a		奇异变形菌	-	-	
体表 ^a		粘质沙雷菌	-	-	
体内 ^a		<<Low Discrim>>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99%(1411/1418)	
体内		奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1417/1424)	
体内		摩氏摩根菌摩根亚种	<i>Morganella morganii</i>	99%(1406/1422)	
体内		产碱普罗威登斯菌	<i>Providencia rustigianii</i>	99%(1414/1417)	
体内		斯氏普罗威登斯菌	<i>Providencia vermicola</i>	99%(1416/1430)	
体内 ^a		Undefined	<i>Enterococcus</i>	99%(1441/1449)	
体内 ^a		大肠埃希菌	<i>Escherichia</i>	99%(1424/1442)	
体内 ^a		少动鞘氨醇单胞菌	-	-	
体内 ^a		乳房链球菌 ^a	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia fergusonii</i>	99%(1410/1419)、99%(1408/1419)	
亮绿蝇		体表	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1427/1436)
		体表 ^a	Undefined	<i>Escherichia</i>	99%(1413/1421)
		体表	雷氏普罗威登斯菌	<i>Providencia rettgeri</i>	99%(1425/1430)
		体表	松鼠葡萄球菌	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99%(1443/1447)

续表1 Vitek 2与16S rRNA鉴定结果对比

Table 1 The comparison between the identification results of Vitek 2 and 16S rRNA

蝇种	分离部位	Vitek 2鉴定结果	16S rRNA 比对结果	16S rRNA 相似度	
亮绿蝇	体表 ^a	溶血不动杆菌	-	-	
	体表	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%(1416/1421)	
	体内 ^a	大肠埃希菌	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia fergusonii</i>	99%(1419/1433)、99%(1418/1433)	
	体内	摩氏摩根菌塞氏亚种	<i>Morganella morgani</i>	98%(1411/1436)	
	体内 ^a	Undefined	<i>Citrobacter</i>	99%(1426/1434)	
	体内	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1417/1422)	
	体内	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1414/1420)	
	体内 ^a	Undefined	<i>Vagococcus lutrae</i>	99%(1434/1437)	
	家蝇	体表 ^a	大肠埃希菌	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia fergusonii</i>	99%(1412/1421)、99%(1410/1421)
		体表	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%(1412/1417)
体表 ^a		Undefined	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%(1449/1460)	
体表 ^a		奇异变形菌	-	-	
体内		蜂房哈夫尼亚菌	<i>Hafnia alvei</i>	98%(1424/1448)	
体内		奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	99%(1416/1423)	
体内 ^a		Undefined	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%(1441/1448)	
体内 ^a		大肠埃希菌	<i>Shigella flexneri</i> or <i>Escherichia fergusonii</i>	99%(1421/1434)、99%(1418/1433)	

注:a. 为Vitek 2与16S rRNA鉴定结果不一致,或其中一种方法未能鉴定出结果。

98%,此处认定为变形肥杆菌。1株Vitek 2鉴定为乳房链球菌(*Streptococcus uberis*),16S rRNA序列比对与福氏志贺菌(*Shigella flexneri*,1410/1419)、弗格森埃希菌(*Escherichia fergusonii*,1408/1419)相似度均为99%,需借助其他方法鉴定。

屡次出现Vitek 2鉴定为大肠埃希菌,但其16S rRNA序列同时与志贺菌属细菌和大肠埃希菌有99%的相似性,虽然大肠埃希菌和志贺菌表型分类上属于不同的种,但其亲缘关系较同属内其他种要高得多,因此认定该菌为大肠埃希菌。

值得注意的是,从大头金蝇体表分离得到1株细菌,未被Vitek 2鉴定出,其16S rRNA序列与*Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* S5 strain的16S rRNA序列(GeneBank Accession No.:NR_042554)有99%的相似度(第二高相似度为93%)。

2.2 不同蝇种体表携带细菌种类 从7种蝇体表检出18种菌(表2),其中致病菌2种,分别为大肠埃希菌和松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*);非致病菌2种,即弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)和变形肥杆菌;条件致病菌14种,其中7种与蝇体内分离出的菌株一致:包括奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、溶血不动杆菌(*Acinetobacter haemolyticus*)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)、肺炎克雷伯菌肺炎亚种(*Klebsiella pneumoniae pneumoniae*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、蜂房哈夫尼亚菌、摩氏摩根菌摩氏亚种(*Morg. morg. morgani*);另外7种为阴沟肠杆菌、放射根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)、雷氏普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*)、布氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、粘质沙雷

菌(*Serratia marcescens*)、*Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*(该菌为新发现菌,尚无中文名)。

蝇体表携带细菌种类均在4种以上,最多的是酱麻蝇为7种。酱麻蝇和亮绿蝇体表各携带2种致病菌。2.3 不同蝇种体内携带细菌种类 从蝇体内检出14种菌(表2),其中致病菌1种,为大肠埃希菌,与蝇体表检出一致;非致病菌1种为弗氏柠檬酸杆菌;条件致病菌12种,除7种与体表检出菌一致外,还检出5种:粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、漫游球菌(*Vagococcus lutrae*)、产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)、斯氏普罗威登斯菌(*Providencia stuartii*)和少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)。

3 讨论

Vitek 2和16S rRNA测序方法各有优缺点。Vitek 2方法能获得菌株大量的生理生化信息,一般都能鉴定到种,缺点是数据库有限,某些菌不能被“识别”;其次,鉴定某些属菌时正确率低。Sönksen等^[16]在使用Vitek 2 NH鉴定卡时,75株菌中只有64%被正确鉴定,Zbinden等^[17]用Vitek 2色度法鉴定卡鉴定非发酵革兰阴性杆菌时,90株菌中59%和10%分别被正确鉴定到种和属。另外,微生物药敏特性的改变(例如从抗生素使用者身上所取的样本)以及培养条件的不同可能导致结果正确率和重复性不好。16S rRNA序列比对优点在于较为准确和稳定,能鉴定不可培养的细菌,能很好地应用于环境基因组学的研究。其缺点在于对于某些种属细菌,所比对的16S序列与两种或以上的同属不同种的细菌同时有100%的相似度,或者它们之间的差别<0.5%,不能得到十分确定的鉴定结果。虽然两

表 2 不同蝇种体表和体内细菌分布

Table 2 Distributions of bacteria on the body surfaces and inside the bodies of different fly species

检测部位	序号	菌种	致病性	巨尾阿丽蝇	元厕蝇	常齿股蝇	大头金蝇	酱麻蝇	亮绿蝇	家蝇
体表	1	大肠埃希菌	少数型致病	+	+	+		+	+	+
	2	阴沟肠杆菌	条件致病					+		
	3	松鼠葡萄球菌	致病					+	+	
	4	放射根瘤菌	条件致病	+						
	5	雷氏普罗威登斯菌	条件致病	+					+	
	6	布氏柠檬酸杆菌	条件致病	+	+					
	7	弗氏柠檬酸杆菌	非致病			+		+		
	8	奇异变形杆菌	条件致病		+	+	+	+	+	+
	9	溶血不动杆菌	条件致病						+	
	10	产酸克雷伯菌	条件致病		+					
	11	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	条件致病	+			+	+		+
	12	粪肠球菌	条件致病		+					+
	13	产气肠杆菌	条件致病						+	
	14	粘质沙雷菌	条件致病						+	
	15	蜂房哈夫尼亚菌	条件致病				+			
	16	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	条件致病					+		
	17	变形肥杆菌	非致病					+		
	18	摩氏摩根菌摩根亚种	条件致病					+		
体内	1	大肠埃希菌	少数型致病					+	+	+
	2	粪产碱菌	条件致病	+						
	3	粪肠球菌	条件致病				+	+	+	+
	4	奇异变形杆菌	条件致病	+	+	+	+	+	+	+
	5	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	条件致病	+			+		+	
	6	产酸克雷伯菌	条件致病					+		
	7	蜂房哈夫尼亚菌	条件致病	+					+	
	8	弗氏柠檬酸杆菌	非致病	+	+		+			
	9	溶血不动杆菌	条件致病						+	
	10	摩氏摩根菌摩根亚种	条件致病		+	+		+	+	
	11	漫游球菌	条件致病				+		+	
	12	产碱普罗威登斯菌	条件致病						+	
	13	斯氏普罗威登斯菌	条件致病						+	
	14	少动鞘氨醇单胞菌	条件致病						+	

注: *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* 为新现条件致病菌,能引起暴发性脓毒症,尚无中文命名。

种方法都不能 100% 正确鉴定细菌种属,但如果取二者相同的结果,其结果可信度是非常高的。

由于 Vitek 2 鉴定卡不能分辨某些菌,如果样品为这些菌, Vitek 2 就会给出 <<Slashline>> (杠掉) 的结果,需要手动进行下一步生化反应或其他鉴定方法来确定。本实验中,本应被 Vitek 2 鉴定出的菌如变形杆菌、克雷伯菌、粪肠球菌、柠檬酸杆菌偶尔出现 << Slashline>> 和 Undefined 的结果,可能是因为上机检验前制备样品过程中受到污染,也可能被检菌是某种生化反应或药敏特性发生变化的变种,此时均以 16S rRNA 序列比对结果为准。当未能扩增出 16S rRNA 序列时,或未能测出序列时以 Vitek 2 鉴定结果

为准。

本研究从上海浦东机场捕获的蝇类分离出 2 种致病菌,分离出 19 种条件致病菌, 16S rRNA 序列相似度均为 99%。有 85 株细菌经两种鉴定方法都给出了结果,其中 7 株两种方法的结果中细菌的属不一致,正确率为 91.76%,说明本研究采用的细菌分离方法和 Vitek 2 与 16S rRNA 序列分析相结合的鉴定方法较为可取,比较可靠。检出细菌中包括常见的条件致病菌,如大肠埃希菌、变形杆菌、肺炎克雷伯菌、哈夫尼亚菌,也检出了能引起妇科、尿路感染及血液感染的松鼠葡萄球菌,该结果与以往调查结果基本一致^[18],未检测出沙门菌、霍乱弧菌等强致病菌。

虽未检出强致病菌,但分离出的粪肠球菌近年发现引起院内感染较多,可能引发危及人生命的腹腔感染和败血症等。在我国最常见的食物中毒是由变形杆菌引起的。分离出的细菌还包括 1 株疑似国内新菌,不能排除由境外传入的可能性,此菌株与 Toth 等^[19]发现的 *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* S5 strain 16S rRNA 序列相似性为 98.9%, *W. chitiniclastica* 造成了法国东南部个体菌血症^[20]与南美洲阿根廷个体的暴发性脓毒症^[21]。

7 种蝇类中,酱麻蝇、亮绿蝇和常齿股蝇携带的病菌种类较多,与它们的孳生环境有关,酱麻蝇多寄生于酱制品的下脚或酱缸中;亮绿蝇孳生场所是腐败动物质、人粪和垃圾等。蝇类作为出入境口岸媒介生物控制中的一种,摸清其携带病原生物种类以及不同病原体在蝇种中的分布,对于应对口岸突发公共卫生事件,新型病原微生物入侵的鉴别有重要意义。

参考文献

- [1] Becker K, Harmsen D, Mellmann A, et al. Development and evaluation of quality - controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 4988-4995.
- [2] Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, et al. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE System and the Vitek 2 ID -GNB Card for identification of nonfermenting gram - negative bacteria in the clinical laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1359-1366.
- [3] von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept—the role of staphylococcal SCVs in persistent infections [J]. Injury, 2006, 37 Suppl 2: S26-33.
- [4] von Eiff C, Vaudaux P, Kahl BC, et al. Bloodstream infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker implantation [J]. Clin Infect Dis, 1999, 29(4): 932-934.
- [5] Heikens E, Fleer A, Paauw A, et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species - level identification of clinical isolates of coagulase - negative staphylococci [J]. J Clin Microbiol,

- 2005, 43(5):2286-2290.
- [6] Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4):840-862.
- [7] Woo PC, Ng KH, Lau SK, et al. Usefulness of MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5):1996-2001.
- [8] Fontana C, Favaro M, Pelliccioni M, et al. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2):615-619.
- [9] Carretto E, Barbarini D, Couto I, et al. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping [J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(3):177-184.
- [10] Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, et al. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens[J]. Clin Microbiol, 2006, 44(8):2824-2830.
- [11] Jones SW, Francesconi SC. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms[J]. Croat Med J, 2005, 46(4):522-529.
- [12] Noller HF, Hoang L. The 30S ribosomal P site: a function of 16S rRNA[J]. FEBS Lett, 2005, 579(4):855-858.
- [13] Kibe R, Sakamoto M, Hayashi H, et al. Maturation of the murine cecal microbiota as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism and 16S rRNA gene clone libraries [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 235(1):139-146.
- [14] Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification [J]. Clin Chem, 2009, 55(5):856-866.
- [15] Peterson DA, Frank DN, Pace NR, et al. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases [J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(6):417-427.
- [16] Sönksen UW, Christensen JJ, Nielsen L, et al. Fastidious Gram-Negatives: identification by the Vitek 2 Neisseria - Haemophilus card and by partial 16S rRNA gene sequencing analysis [J]. Open Microbiol J, 2010, 4:123-131.
- [17] Zbinden A, Böttger EC, Bosshard PP, et al. Evaluation of the colorimetric Vitek 2 card for identification of gram - negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(7):2270-2273.
- [18] 陈佳木, 李亚伦, 高思维, 等. 马尾口岸蝇类生物多样性和携带病原微生物情况的研究[J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(6):21-27.
- [19] Tóth EM, Schumann P, Borsodi AK, et al. *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* gen. nov., sp. nov., a new gammaproteobacterium isolated from *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(4):976-981.
- [20] Rebaudet S, Genot S, Renvoise A, et al. *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* bacteremia in homeless woman [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(6):985-986.
- [21] Almuzara MN, Palombarani S, Tuduri A, et al. First case of fulminant sepsis due to *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6):2333-2335.

收稿日期:2012-07-16

(上接第505页)

抽样和统计分析,以求得到RBS在鼠疫菌中与基因翻译起始更加明确的关系。并且核糖体结合部位的识别是一种复杂的受多因素影响的过程,对其进行准确可靠的预测,仍需不断纳入新方法,不断提高预测模型的精度,使预测核糖体结合部位、基因识别更加准确。

参考文献

- [1] Salzberg SL, Delcher AL, Kasif S, et al. Microbial gene identification using interpolated Markov models [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(2):544-548.
- [2] Korostelev A, Trakhanov S, Asahara H, et al. Interactions and dynamics of the Shine-Dalgarno helix in the 70S ribosome [J]. PNAS, 2007, 104(43):16840-16843.
- [3] Haentjens-Sitri J, Allemand F, Springer M, et al. A competition mechanism regulates the translation of the *Escherichia coli* operon encoding ribosomal proteins L35 and L20 [J]. J Mol Biol, 2008, 375(3):612-625.
- [4] Winkler WC, Breaker RR. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches [J]. Annu Rev Microbiol, 2005, 59:487-517.
- [5] Yusupova G, Jenner L, Rees B, et al. Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome [J]. Nature, 2006, 444(7117):391-394.
- [6] Hayes WS, Borodovsky M. Deriving ribosomal site (RBS) statistical models from unannotated DNA sequences and the use of RBS model for N-terminal prediction [J]. Pac Symp Biocomput, 1998:279-290.
- [7] Parkhill JBW, Wren NR, Thomson RW, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague [J]. Nature, 2001, 413(6855):523-527.
- [9] Ma J, Campbell A, Karlin S. Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures [J]. J Bacteriol, 2002, 184(20):5733-5745.
- [8] 申小娜, 海荣, 俞东征. 鼠疫菌基因组学研究进展 [J]. 疾病监测, 2009, 24(6):440-445.
- [10] Deng W, Burland V, Plunkett G, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM [J]. J Bacteriol, 2002, 184(16):4601-4611.

收稿日期:2012-04-29