

西藏口岸 2017 年蝇类携带病原体的检测分析

冯娟¹, 达拉¹, 董周立², 常春¹, 曹晓梅³, 杨朝春⁴

1 西藏国际旅行卫生保健中心,西藏 拉萨 850002; 2 拉萨市城关区疾病预防控制中心,西藏 拉萨 850000;

3 中国检验检疫科学研究院,北京 100123; 4 张家港海关,江苏 张家港 215600

摘要: 目的 了解西藏口岸蝇类携带病原体情况,为口岸卫生检疫执法工作提供技术支持。方法 对 2017 年 5—10 月在西藏自治区拉萨贡嘎国际机场口岸、吉隆口岸、亚东口岸采集到的蝇类进行病原体检测,利用微生物分离纯培养技术及细菌 16S rRNA 基因序列鉴定和生理生化鉴定技术对蝇类样本进行细菌学检测,利用 RT-PCR 技术检测蝇类携带病毒情况。结果 从蝇类样本中分离出粪肠球菌、蜂房哈夫尼菌、威斯康星米勒菌、大肠埃希菌、普通变形杆菌、耐久肠球菌等 37 种致病菌(条件致病菌)。病毒检测检出 1 例轮状病毒(A型)阳性,检出率为 2.0%(1/50)。结论 蝇类携带大量细菌,有些还携带肠道病毒,可导致疾病在国境口岸传播的风险,卫生检疫机构应加强对国境口岸蝇类检测,防止传染病扩散。

关键词: 口岸; 蝇类; 病原体; 16S rRNA; 细菌; 病毒

中图分类号:R384.2; R378 文献标志码:A 文章编号:1003-8280(2019)02-0194-04

DOI:10.11853/j.issn.1003.8280.2019.02.018

Detection and analysis of pathogens carried by flies at Tibetan ports in 2017

FENG Juan¹, DA La¹, DONG Zhou-li², CHANG Chun¹, CAO Xiao-mei³, YANG Chao-chun⁴

1 Tibet International Travel Health Care Center, Lhasa 850002, Xizang (Tibet) Autonomous Region, China; 2 Chengguan

District Center for Disease Control and Prevention of Lhasa; 3 Chinese Academy of Inspection and Quarantine;

4 Zhangjiagang Customs

Supported by the Science and Technology Program Project of the State Quality Inspection Administration (No.2016IK259)

Abstract: Objective To investigate the pathogens carried by flies at Tibetan ports, and to provide a technical support for the health quarantine and law enforcement at ports. **Methods** From May to October, 2017, pathogen detection was performed for flies collected at Lhasa Gonggar International Airport, Jilong port, and Yadong port. Bacterial detection was performed for fly samples using the microbiological isolation and pure culture technology, 16S rRNA gene sequence identification, and physiological and biochemical identification techniques, and RT-PCR was used to detect the virus carried by flies. **Results** A total of 37 pathogenic bacteria (conditioned pathogens) were isolated from flies, including *Enterococcus faecalis*, *Hafnia alvei*, *Moellerella wisconsensis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, and *Enterococcus durans*. Virus detection found one case of rotavirus (group A), resulting in a detection rate of 2.0% (1/50). **Conclusion** Flies carry a large number of bacteria, and some of them may also carry enterovirus, which may lead to the risk of disease spread at frontier ports. Health quarantine departments should strengthen the monitoring and detection of flies at frontier ports to prevent the spread of infectious diseases.

Key words: Port; Fly; Pathogen; 16S rRNA; Bacteria; Virus

蝇类是一类常见的医学媒介生物,夏秋季节繁殖旺盛,主要在垃圾堆、食堂、厨房、起居室等区域活动,与人类的生活密切相关。有文献报道,蝇类携带多种细菌、病毒、寄生虫卵等^[1-2],取食频繁,其粪便可污染食物,其习性在蝇类机械性传播疾病方面

具有重要意义^[3]。随着我国对外开放和国际贸易的增加,人口流动和出入境需求日益增多,蝇类可以通过交通工具及行李物品实现短时间内跨地区甚至跨国转移,增加了疾病传播的风险。为此,我们于 2017 年 5—10 月在西藏口岸地区对蝇类携带病原体进行

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2016IK259)

作者简介:冯娟,女,主管医师,主要从事临床检验及病媒生物病原体检测工作,Email: crystal8805@163.com

网络出版时间:2018-12-06 20:18 网络出版地址:<http://navi.cnki.net/navi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

了检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 于2017年5—10月在西藏自治区拉萨贡嘎国际机场口岸、吉隆口岸、亚东口岸采集蝇类样本。

1.1.2 细菌检测试剂 GN增菌液、7.5%氯化钠肉汤、碱性蛋白胨水、亚硒酸盐胱氨酸增菌液、肠道增菌肉汤、乙酰胺琼脂平板、TCBS琼脂平板、SS琼脂平板、Baird-Parker平板、肠球菌琼脂平板、营养琼脂粉等购自北京陆桥技术股份有限公司。微生物鉴定卡购自生物梅里埃中国有限公司。分子试剂购于Thermo Fisher scientific公司。细菌目标片段基因测序委托北京擎科新业生物技术有限公司进行。

1.1.3 病毒检测试剂 甲型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、柯萨奇病毒(A16型)、肠道病毒(通用型)、轮状病毒(A型)采用RT-PCR检测方法,核酸检测试剂盒购于中山大学达安基因股份有限公司和上海之江生物科技股份有限公司,核酸提取试剂为西安天隆科技有限公司提供的DNA/RNA共提取试剂盒。

1.2 细菌检测方法

1.2.1 增菌培养 蝇类样本分类鉴定后进行适当分组(每组1~20只)。将分组后的样本置于灭菌离心管中,加入5颗灭菌氧化锆珠,适量(500~1 000 μl)灭菌生理盐水,研磨匀浆。吸取适量匀浆液(100~200 μl),接种到5 ml GN增菌液、碱性蛋白胨水、7.5%氯化钠肉汤、亚硒酸盐胱氨酸增菌液及肠道增菌肉汤中,于37℃摇床中振荡8~24 h(视不同增菌培养基而定),进行增菌培养。根据细菌培养物浑浊程度对增菌液进行适当稀释,取10 μl稀释液均匀涂布到相应的SS琼脂平板、乙酰胺琼脂平板、TCBS琼脂平板、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂基础平板、山梨醇麦康凯琼脂平板上,置于培养箱中37℃培养17~20 h。挑取不同形态、不同大小的单菌落分别接种于营养琼脂平板进行分离纯培养,直至得到纯菌为止。

1.2.2 细菌鉴定 以纯化的菌体基因组DNA为模板,PCR扩增16S rRNA基因,通用引物为正向引物27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';反向引物1490R:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。目标基因片段约1 500 bp。用灭菌枪头挑取纯菌溶于10 μl DEPC H₂O,99℃10 min,获得目标菌群核酸产物。反应体系(50 μl)为:Thermo Master mix 25 μl,27F 1 μl,1490R 1 μl,ddH₂O 20 μl,DNA 3 μl混合,反应条件为95℃变性1 min;95℃30 s,55℃退火45 s,

72℃延伸60 s,35个循环;72℃10 min,冷却至4℃。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,对条带清晰的产物送北京擎科新业技术有限公司测序,获得序列与美国国立生物技术信息中心(NCBI)已知数据库进行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(≥98%)最高的作为鉴定结果。

对于细菌基因鉴定不能获取确切结果的种类进行细菌生理生化鉴定:用灭菌棉签(接种环)沾取(挑取)新鲜纯菌落,置于事先准备好的比浊管(含0.45%盐水3 ml)中,直到浊度达0.5~0.6麦氏单位。将预先平衡到室温的细菌鉴定卡放入与比浊管对应的载卡架上,将载卡架移入到全自动微生物鉴定系统中,进行细菌生理生化鉴定。

1.3 病毒检测方法

1.3.1 样本处理 将蝇类样本按照鉴定的结果分类,根据样本数量随机抽取乌拉尔丽蝇(*Calliphora uralensis*)、新陆原伏蝇(*Protophormia terraenovae*)、丝光绿蝇(*Lucilia sericata*)、巨尾阿丽蝇(*Aldrichina grahami*)、厩腐蝇(*Muscina stabulans*)和家蝇(*Musca domestica*),每种5~10只,加入PBS溶液研碎,共50份样本。

1.3.2 核酸提取 使用西安天隆科技有限公司提供的DNA/RNA共提取试剂盒提取核酸,按照说明书操作。

1.3.3 病毒检测 使用中山大学达安基因股份有限公司提供的相应病毒检测RT-PCR试剂盒进行检测,按说明书进行操作。阳性样本使用上海之江生物科技股份有限公司试剂盒进行复核。

2 结果

2.1 蝇类携带致病菌情况 检测蝇类样本100份,包括4科19属30种。共检出细菌37种。乌拉尔丽蝇、新陆原伏蝇、丝光绿蝇和巨尾阿丽蝇携带细菌种类最多,分别为15、13、13和12种。其中革兰阳性菌中粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、耐久肠球菌(*E. durans*)、漫游球菌属(*Vagococcus* sp.)是感染较多的细菌,革兰阴性菌中大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)、威斯康星米勒菌(*Moellerella wisconsensis*)等是感染较多的细菌,这些细菌均为条件致病菌,见表1。

2.2 蝇类携带病毒情况 对西藏口岸捕获的蝇类检测甲型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、柯萨奇病毒(A16型)、肠道病毒(通用型)和轮状病毒(A型),检出1例轮状病毒阳性,检出率为2.0%(1/50),携带病

表1 西藏口岸不同蝇类携带细菌情况

序号	蝇种	细菌种类	
		革兰阳性菌	革兰阴性菌
1	乌拉尔丽蝇	粪肠球菌、屎肠球菌、嗜气芽孢杆菌、病臭肠球菌、耐久肠球菌、乳酸乳球菌、漫游球菌属	威斯康星米勒菌、羽状变形菌、肠杆菌、鲍氏不动杆菌、奇异变形杆菌、植生拉乌尔菌、蜂房哈夫尼菌、大肠埃希菌
2	反吐丽蝇	粪肠球菌	大肠埃希菌、阪崎氏肠杆菌、霍氏肠杆菌
3	红头丽蝇	粪肠球菌、耐久肠球菌、乳酸乳球菌、病臭肠球菌	大肠埃希菌、普通变性杆菌
4	青海丽蝇	粪肠球菌	大肠埃希菌、蜂房哈夫尼菌、副蜂房哈夫尼菌、海雀假单胞菌
5	巨尾阿丽蝇	乳酸乳球菌、粪肠球菌、病臭肠球菌、漫游球菌属	大肠埃希菌、摩根摩根菌斯波尼牙种、产酸克雷伯菌、蜂房哈夫尼菌、蒙氏变形杆菌、弗罗因德氏枸橼酸杆菌、威斯康星米勒菌、布氏柠檬酸杆菌
6	新陆原伏蝇	耐久肠球菌、粪肠球菌、病臭肠球菌	羽状变形菌、蜂房哈夫尼菌、弗累克斯讷杆菌、阪崎肠杆菌、奇异变形杆菌、威斯康星米勒菌、副蜂房哈夫尼菌、费格森埃希菌、大肠埃希菌、微小魏斯菌
7	丝光绿蝇	耐久肠球菌、粪肠球菌、希氏肠球菌	肠杆菌科、斯尼比普罗威登斯菌、威斯康星米勒菌、海雀假单胞菌、微小魏斯菌、普通变形杆菌、蜂房哈夫尼菌、鲍氏不动杆菌、弗罗因德氏枸橼酸杆菌、专性嗜碱芽孢杆菌
8	亮绿蝇	粪肠球菌	大肠埃希菌、奇异变形杆菌、微小魏斯菌、鲍氏不动杆菌
9	紫绿蝇	粪肠球菌	大肠埃希菌、雷氏普罗威登斯菌
10	铜绿蝇	粪肠球菌	大肠埃希菌、蜂房哈夫尼菌
11	粗足裸金蝇		蜂房哈夫尼菌、威斯康星米勒菌、弗罗因德氏枸橼酸杆菌、大肠埃希菌
12	肥躯金蝇	粪肠球菌、耐久肠球菌、乳酸乳球菌、病臭肠球菌	大肠埃希菌、普通变性杆菌、微小魏斯菌
13	广额金蝇	粪肠球菌	蜂房哈夫尼菌、微小魏斯菌
14	巧亚麻蝇	漫游球菌属、粪肠球菌	费格森埃希菌、威斯康星米勒菌、副蜂房哈夫尼菌
15	红尾拉麻蝇	粪肠球菌	
16	红尾粪麻蝇	粪肠球菌、病臭肠球菌、耐久肠球菌	肠杆菌、威斯康星米勒菌、副蜂房哈夫尼菌、莓实假单胞菌
17	黄端泉蝇	粪肠球菌	肠杆菌、副蜂房哈夫尼菌、肠杆菌属、产气克雷白(氏)杆菌、威斯康星米勒菌
18	毛笄泉蝇	粪肠球菌	副蜂房哈夫尼菌、肠杆菌属、威斯康星米勒菌
19	灰地种蝇	粪肠球菌	大肠埃希菌、蜂房哈夫尼菌、微小魏斯氏菌
20	家蝇	粪肠球菌	普通的变形杆菌、阴沟肠杆菌、产氢菌(肠杆菌属)、奇异变形杆菌、蜂房哈夫尼菌、霍氏肠杆菌、大肠埃希菌
21	黑边家蝇	粪肠球菌、乳酸乳球菌	大肠埃希菌、普通变性杆菌
22	厩腐蝇	漫游球菌属、粪肠球菌	解鸟氨酸拉乌尔菌、雷氏普罗威登斯菌、蜂房哈夫尼菌、威斯康星米勒菌、阴沟肠杆菌、雷氏普罗威登斯菌
23	肖腐蝇	粪肠球菌	蜂房哈夫尼菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌
24	绯瓣异突蝇	粪肠球菌	威斯康星米勒菌、普通变形杆菌、鲍氏不动杆菌、蜂房哈夫尼菌、大肠埃希菌
25	拟双斑齿股蝇	粪肠球菌	威斯康星米勒菌、普罗威登斯菌、普通变形杆菌、阪崎肠杆菌、蜂房哈夫尼菌
26	常股齿蝇	漫游球菌属、粪肠球菌	威斯康星米勒菌、普罗威登斯菌、普通变形杆菌、阪崎肠杆菌、蜂房哈夫尼菌、雷氏普罗威登斯菌
27	拟变色毛蝇	粪肠球菌	威斯康星米勒菌、大肠埃希菌
28	紫蓝优毛蝇	粪肠球菌	普罗威登斯菌、普通变形杆菌、蜂房哈夫尼菌、雷氏普罗威登斯菌
29	绿翠蝇	粪肠球菌	威斯康星米勒菌、阪崎肠杆菌、蜂房哈夫尼菌
30	棕跗妙蝇	粪肠球菌	

毒的蝇种为新陆原伏蝇,见表2。

3 讨论

蝇类在自然界中分布广泛,也是国境口岸重点监测病媒生物中的一个重要种类,因其生活习性,极易污染食物和水源,对居民健康造成威胁。通过对西藏口岸捕获蝇类进行细菌、病毒等检测,基本了解了西藏口岸蝇类携带病原体情况。本研究的细菌鉴定采用16S rRNA测序和全自动微生物鉴定仪生理生化鉴定相结合的方法进行,2种方法相互补充,弥补了使用其中一种方法不能得到鉴定结果的不足。

表2 西藏口岸不同蝇类携带病毒情况

蝇种类	甲型肝炎	戊型肝炎	柯萨奇病毒	肠道病毒	轮状病毒
	病毒	病毒	(A16型)	通用型	(A型)
乌拉尔丽蝇	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
新陆原伏蝇	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
丝光绿蝇	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
巨尾阿丽蝇	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
厩腐蝇	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
家蝇	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
合计	0/50	0/50	0/50	0/50	1/50
检出率(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0

注:表中数据为阳性数(份)/检测数(份)

从西藏口岸捕获的30种蝇类中共检出37种致病菌,均为条件致病菌,其中粪 (下转第199页)

对患有布病的动物不能及时进行疫病净化工作,不能消除传染源^[7],因此容易发生人间布病疫情^[8]。

达日县是藏族为主的牧业县,牧民严重缺乏布病防治知识,在生产和生活过程中自我防护意识欠缺,未采取任何安全有效的自我防护措施,经常徒手直接接触病畜的分娩物、血液、乳汁等分泌物,增加了感染布病的机会^[6],布病病例集中在饲养和屠宰牲畜地^[9]。感染方式呈现多元化特点,除传统的饲养、屠宰、贩卖、接生为主的传播方式外,通过饮用未经消毒的牛奶、食用胎盘、吃羊肉等食源性传播途径感染所占比例有上升趋势^[10],病例中有1例因食用未煮熟的羊肉而感染布病。在14例新发病例中,布病防治知识知晓率为7.14%,偏远牧区仍然是布病防治知识宣传盲区,牧民的游牧式生活使得疾病宣传得不到普及,牧民在养殖行为和接触牛、羊过程中均不能采取个人防护措施。因此,健康教育不仅要在高危人群中针对性开展,也应该持续性扩大布病防治知识的宣传范围。

参考文献

- [1] 卫生部疾病预防控制局. 布鲁氏菌病防治手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:1.

(上接第196页)

肠球菌在不同种类的蝇中携带率最高,除粗足裸金蝇(*Achoetandrus villeneuvii*)外其他蝇种均有携带。有研究表明,粪肠球菌可引起严重的院内感染,可能引发危及生命的腹腔感染和败血症等^[4-5]。蝇类中细菌携带率较高的是乌拉尔丽蝇、巨尾阿丽蝇、新陆原伏蝇和丝光绿蝇,可能与不同蝇种的孳生环境有关,以上几种蝇类均孳生于粪便、垃圾、腐败动植物中,成虫喜在腥臭环境活动,繁殖期常飞入室内、食品店、菜市场等,给人类的生产生活环境造成反复污染。

西藏口岸蝇类感染率最高的细菌是粪肠球菌,其次是蜂房哈夫尼亚菌、威斯康星米勒菌、大肠埃希菌、普通变形杆菌、耐久肠球菌等。该结果与其他口岸的检测结果有一定的相似性^[6-7]。西藏口岸蝇类的病毒检测检出1例轮状病毒阳性(A型),为新陆原伏蝇携带,检出率为2.0%。轮状病毒是引起婴幼儿秋季腹泻的一个重要病原体^[8],由蝇类活动导致的食物水源污染应引起高度重视。

通过对西藏口岸蝇类病原体的检测,掌握西藏口岸蝇类携带病原体的基础数据,为下一步开展口岸蝇类监测及重点灭蝇、防蝇措施提供科学依据。加强国境口岸蝇类监测及消杀,是有效地防止疾病

- [2] 韦炳辉. 2010年青海省达日县人间布鲁杆菌病调查分析[J]. 中国地方病学杂志, 2011, 30(4): 419. DOI: 10.3760/cma.j. issn.1000-4955.2011.04.019.
- [3] 薛红梅, 徐立青, 崔步云, 等. 3株布氏菌的流行病学调查[J]. 现代预防医学, 2014, 41(23): 4225-4226, 4229.
- [4] 王云平, 王生祥, 傅义娟, 等. 青海省牛羊布病疫情形势及防治策略[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2015, 45(2): 42-43. DOI: 10.3969/j. issn.1003-7950.2015.02.020.
- [5] 杨旭欣, 秦豫民, 马丽, 等. 青海省2009—2014年人间布鲁氏菌病调查结果分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2016, 27(4): 378-380. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2016.04.016.
- [6] 敏晓花. 浅谈青海省牛羊布病疫情形势及防治策略[J]. 南方农机, 2018, 49(2): 195. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3872.2018.02. 168.
- [7] 李涛. 牛羊布病疫情形势及防治分析[J]. 畜牧兽医科学:电子版, 2017(8): 40. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3637.2017.08.034.
- [8] 刘东立, 孙亮, 杨海, 等. 西安市职业人群布鲁杆菌病爆发的流行病学分析[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(5): 589. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2007.05.045.
- [9] 赵爱珠, 侯兴佑, 刘玮, 等. 陕西省渭南市20例布鲁杆菌病病例流行病学调查结果分析[J]. 医学动物防制, 2017, 33(2): 157-159. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4255.2018.06.013.
- [10] 王凯, 张志宇, 刘祥宁, 等. 88例布鲁氏菌病病例流行病学特征及临床特点分析[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(4): 97-100. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2014.04.020.

收稿日期:2018-10-09 (编辑:卢亮平)

传入传出的一个重要手段。

参考文献

- [1] 高玉峰, 程晓兰, 孙时, 等. 辽宁口岸蝇类、蜚蠊携带致病菌的检测分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2015, 38 Suppl1: S22-25. DOI: 10.16408/j.1004-9770.2015.S1.008.
- [2] 高思维, 周天喜, 高博, 等. 福州海港口岸蝇类携带病毒状况的监测分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(1): 31-34. DOI: 10.16408/j.1004-9770.2011.01.014.
- [3] 黄建可, 杨寿旺. 中国主要蝇类携带致病菌情况与防制原则[J]. 口岸卫生控制, 2009, 14(2): 52-55. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5777.2009.02.020.
- [4] 张洋洋, 梁丽玲. 医院获得性肠球菌属细菌感染的分布特征及耐药性分析[J]. 承德医学院学报, 2018, 35(2): 101-104. DOI: 10.15921/j.cnki.cyxb.2018.02.005.
- [5] 张欣, 田素飞, 陈佰义, 等. 某院感染科病房住院患者常见病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(2): 168-171. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201802011.
- [6] 孙立新, 丁永键, 朱临, 等. 江苏口岸输入性蝇类携带细菌监测研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2011, 17(3): 190-194.
- [7] 陈拓, 曹晓梅, 邓耀华, 等. 浦东机场口岸蝇类携带病原菌种类及16S rRNA鉴定[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(6): 506-511.
- [8] 王卫平. 儿科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 150-159.

收稿日期:2018-11-26 (编辑:陈秀丽)