

论著

利用 *recA* 基因序列分析鉴定云南酵米面中伯克霍尔德菌属分离株

黄庭轩¹, 赵梦馨¹, 周帼萍¹, 许燕², 杨祖顺²

(1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 云南省疾病预防控制中心 食品安全与营养研究中心, 云南 昆明 650022)

摘要:目的 利用 *recA* 基因序列分析对云南省两起酵米面食物中毒案例中伯克霍尔德菌属病原菌进行分类鉴定。方法 对基于 16S rRNA 序列分析鉴定为伯克霍尔德菌属的 4 株分离菌株和 1 株唐菖蒲伯克霍尔德菌标准株 (CICC 10574), 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 *recA* 基因片段、测序, 将测序结果与 GenBank 中伯克霍尔德菌属中 73 个种的对应片段序列比对, 并构建系统发育树。结果 比较分析伯克霍尔德菌属中 73 个种的 *recA* 基因的亲缘关系, *recA* 基因可以准确地地区分鉴定伯克霍尔德菌属中包括食物中毒案例中 4 个分离株的不同的种, 特别是在区分唐菖蒲伯克霍尔德菌种内不同致病亚种时有参考价值。结论 *recA* 基因序列分析将酵米面食物中毒分离株鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌, 而且食物中毒案例中的 4 个分离株和植物病原菌及环境分离株的唐菖蒲伯克霍尔德菌的基因序列不同, 具有独特的单核苷酸多态性 (SNP), 建议鉴定结果采用唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种 (*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)。

关键词: 酵米面; *recA* 序列分析; 食物中毒; 唐菖蒲伯克霍尔德菌; 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种; 食源性致病菌

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)05-0526-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.05.002

Identification of isolates in fermented corn flour food poisoning case in China
by *recA* sequence analysis

HUANG Ting-xuan¹, ZHAO Meng-xin¹, ZHOU Guo-ping¹, XU Yan², YANG Zu-shun²

(1. School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Hubei Wuhan 430023, China; 2. Yunnan Center of Disease Control and Prevention, Yunnan Kunming 650022, China)

Abstract: **Objective** The four pathogens isolated from two outbreaks caused by fermented corn flour products in Yunnan Province were identified by *recA* partial sequence analysis. **Methods** The four isolates were already identified as *Burkholderia* spp. on the basis of 16S rRNA sequence analysis. They were amplified by *recA* specific primers in polymerase chain reaction together with *Burkholderia gladioli* (CICC 10574). The products were sequenced. The sequences were blasted with 73 species in *Burkholderia* genus and a phylogenetic tree was constructed. **Results** Comparative analysis of genetic relationship of *recA* gene could identify and classify the 73 species of *Burkholderia*, even subspecies of *B. gladioli*. **Conclusion** The four isolates from food poisoning cases could be identified as *B. gladioli* by *recA* sequence analysis. Their sequences were different from those of plant pathogens of *B. gladioli* with specific single nucleotide polymorphism (SNP), and was identified as *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*.

Key words: Fermented corn flour; *recA* sequence analysis; food poisoning; *Burkholderia gladioli*; *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*; foodborne pathogenic bacteria

变质银耳及自制淀粉类发酵食品引起的食物

中毒曾是我国病死率最高的细菌性食物中毒之一, 国标称其病原菌为椰毒假单胞菌 (*Pseudomonas cocovenenans*) 或椰毒假单胞菌酵米面亚种 (*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*)^[1-2]。2012 和 2014 年在云南省红河州和文山州发生的两起酵米面 (吊浆粿) 食物中毒死亡案例的流行病学特征和毒素分析均和椰毒假单胞菌食物中毒一致, 但 VITEK 全自动微生物分析系统鉴定

收稿日期: 2017-06-07

基金项目: 云南省卫生科技计划项目 (2014NS351); 武汉轻工大学大学生科研项目 (xsky2017008)

作者简介: 黄庭轩 男 本科生 研究方向为微生物
E-mail: htx0625@163.com

通信作者: 许燕 女 副主任技师 研究方向为卫生检验与食品安全
E-mail: 286392468@qq.com

其分离株为唐菖蒲伯克霍尔德菌 (*Burkholderia gladioli*), 并有 5 个生理生化指标与 GB/T 4789. 29—2003《食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验》不同^[3-4]。经典生理生化鉴定法有其局限性,故采用分子生物学方法对分离株进行 16S rRNA 序列分析,将其鉴定到伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia* spp.) 并与唐菖蒲伯克霍尔德菌最近源,但因该序列保守性鉴定到种存在争议^[3-5]。

目前伯克霍尔德菌属有 90 个种,具有复杂多样性,既有人畜共患病原菌,也有植物病原菌及环境分离株。该属绝大多数种无致病力,其生态位与植物密切相关,属于根圈细菌或植物内生菌,甚至能促进植物生长或抗逆性。某些种能降解原油、除草剂和合成污染物等难降解化合物,但也包括部分重要植物致病菌,能感染多种植物宿主,造成重要农作物大幅减产,如水稻细菌性谷枯病菌 (*Burkholderia glumae*) 能感染水稻、番茄、芝麻、辣椒、茄子、紫苏等 20 多种植物导致枯萎病。该属中少数种是著名的人畜病原菌,如在澳大利亚和东南亚部分地区类鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia pseudomallei*) 通过土壤或水接触伤口、消化系统或呼吸系统引发人畜的类鼻疽病急性或慢性感染。而与其近源的鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia mallei*) 则可以导致马、驴或骡子的鼻疽病,偶尔也能通过这些动物传染给人类。两者都曾在战争中用做生物武器。而洋葱伯克霍尔德菌群 (*Burkholderia cepacia* complex) 对囊肿性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 患者可引起严重危及生命的肺部感染^[6]。

唐菖蒲伯克霍尔德菌种内多样性也非常复杂,国外研究^[6]显示其在自然界广泛分布于土壤、水体、根圈和多种动物等生态位,常常与植物和真菌共生。该种也是著名的植物病原菌,根据侵染宿主被分为 3 个病原变种/型 (pathovars): 唐菖蒲伯克霍尔德菌唐菖蒲致病变种 (*Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*)、唐菖蒲伯克霍尔德菌洋葱致病变种 (*Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola*) 和唐菖蒲伯克霍尔德菌蘑菇致病变种 (*Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*) 分别导致唐菖蒲、洋葱和蘑菇的腐烂病。近年来,有研究^[7]发现其与医院感染、囊性纤维化、角膜炎、骨髓炎肺部感染有关,尤其是在免疫力缺陷/受抑制人群中;2012 年又有研究^[8]发现它与新生儿的败血症和幼儿在医院感染的败血症有关;同时原椰毒假单胞菌也已并入唐菖蒲伯克霍尔德菌,有建议命名为唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种 (*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)^[9],所以该种内也包括人类食源性致病菌。

随着分子生物学鉴定手段的普及,研究者也曾试图用分子生物学方式鉴定、区分该食源性致病菌,但是唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种不仅和唐菖蒲伯克霍尔德菌的 3 个植物致病变种在 16S rRNA 全长序列上差异很小,就连临近的植物伯克霍尔德菌和水稻细菌性谷枯病菌也很难区分^[10]。所以本研究采用另一个管家基因 *recA* 序列分析对云南省酵米面食物中毒致死案例中 4 株分离株在伯克霍尔德菌属中的分类鉴定进行研究。*recA* 是原核生物同源重组的中心分子,在 DNA 重组和 DNA 损伤应急修复 (SOS) 过程中是一个关键的基因,常用于做细菌分型,经研究^[11-12]表明,*recA* 基因可用于包括根癌农杆菌属、紫色色杆菌属等多种细菌的分型,已经有两项研究^[13-14]证实其在整个伯克霍尔德菌属内以及在洋葱伯克霍尔德菌群的分型鉴定中有效。本研究试图采用 *recA* 序列分析来明确我国云南省近五年内两起酵米面食物中毒案例中分离株在目前微生物分类系统中的地位并探索该类食源性致病菌的新鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和序列来源

4 株酵米面食物中毒事件分离株由云南省疾病预防控制中心保存^[3-4],唐菖蒲伯克霍尔德菌标准株 (CICC 10574) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,其他参比序列下载于 GenBank 数据库,详见表 1。其中 4 个分离株经 16S rRNA 序列分析鉴定为伯克霍尔德菌属^[3]。

1.1.2 主要仪器与试剂

Cycler PCR 仪 (美国 Bio-Rad)、凝胶图像分析系统 (英国 SYNGENE)、DYY8B 型稳压电泳仪、离心机、Nanopure 纯水机。

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基 (英国 OXOID), Premix Taq、DL2000 DNA Marker 和核酸染料 Goldview 均购自日本 TaKaRa, 琼脂糖 (西班牙 Biowest), 聚合酶链式反应 (PCR) 引物合成以及产物测序由金唯智科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 分离株的 *recA* 基因 PCR 扩增及测序

用 PDA 平板划线分离菌株,于 30 ℃ 培养 24 h,选取单菌落至装有 50 μl 无菌 MiliQ 水的 PCR 管中,轻振管壁使菌体在水中混匀,于 98 ℃ 下高温裂解 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,所得上清液即为细菌 DNA,转移至无菌 EP 管中,4 ℃ 保存备用。以 *recA* 为引物进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系:

表 1 选用菌株和序列的信息
Table 1 Information of selected strains and sequences

菌株名称	菌株来源	菌株特性	GenBank 登录号
<i>B. gladioli</i> YD-1	2014 年 6 月文山州酵米面食物中毒事件	人类致病株;产米酵菌酸毒素	KY312856
<i>B. gladioli</i> YD-2	2014 年 6 月文山州酵米面食物中毒事件	人类致病株;产米酵菌酸毒素	KY312857
<i>B. gladioli</i> YD-4	2014 年 6 月文山州酵米面食物中毒事件	人类致病株;产米酵菌酸毒素	KY312858
<i>B. gladioli</i> YD-HH	2012 年 7 月红河州酵米面食物中毒事件	人类致病株;产米酵菌酸毒素	KY312859
<i>B. gladioli</i> CICC 10574	中国-野生诺尼果内	环境分离株	KY312860
<i>B. gladioli</i> pv. <i>cocovenenans</i> LMG 11626 [#]	印尼爪哇食物中毒事件- 原椰毒假单胞菌典型株	产米酵菌酸和 黄丝菌素(xanthothricin)	HQ849139. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> LMG 2216 [#]	美国-唐菖蒲	植物致病株	AY619665. 1
<i>B. gladioli</i> BSR 3 ^{&}	韩国-水稻病原菌	植物致病株	NC_015381. 1
<i>B. gladioli</i> UAPS 07070	墨西哥-菠萝	环境分离株(生物防治菌株)	JN104387. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 514	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857535. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 500	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857534. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 499	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857533. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 467	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857532. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 469	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857531. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 435	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857530. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 295	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857529. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 294	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857528. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 261	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857527. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 260	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857526. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> 259	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857525. 1
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> LMG 6979	波兰-洋葱球茎软腐病	植物致病株	KF857524. 1
<i>B. acidipaludis</i> NBRC 101816 ^{&#}	越南-荸荠	环境分离株(铝耐受)	NZ_BAXZ01000005. 1
<i>B. ambifaria</i> ATCC 51671	田菁(<i>Sesbaniaexaltata</i>)叶子	环境分离株(生物防治菌株)	AF456006. 1
<i>B. anthina</i> YQP 27	中国-桑树根围	环境分离株	JF806422. 1
<i>B. arboris</i> FC 10	囊性纤维化患者	条件致病菌	FJ555025. 1
<i>B. aspalathi</i> VG1C [#]	南非-豆类植物根瘤	环境分离株	KF356197. 1
<i>P. bannensis</i> NBRC 103871 ^{&#}	泰国-铺地黍(<i>Panicum repens</i>)	环境分离株(耐酸,产氨)	NZ_BAYA01000012. 1
<i>B. bryophila</i> LMG 23644 [#]	德国-红色泥炭苔藓(<i>Sphagnum rubellum</i>)	环境分离株(促进植物生长)	HQ398574. 1
<i>P. caballeronis</i> LMG 26416 ^{&#}	墨西哥-土豆根际	环境分离株	FOAJ01000007. 1
<i>B. caledonica</i> LMG 19076 [#]	英国-土壤根际	环境分离株	HQ398575. 1
<i>B. caribensis</i> LMG 18531 [#]	法国-砂姜黑土	环境分离株	AY644639. 1
<i>B. caryophylli</i> LMG 2155	香石竹枯萎病	植物致病株	AY619663. 1
<i>B. cenocepacia</i> D584	美国-临床标本	人类致病株	EF427796. 1
<i>B. cepacia</i> LMG 14291	比利时-囊性纤维化患者	人类致病株	AF143790. 1
<i>B. choica</i> LMG 22940 ^{&#}	荷兰-草地根际土壤	环境分离株	FCON02000005. 1
<i>B. contaminans</i> LMG 23361 ^{&}	乳腺发炎的绵羊所产的奶	动物致病株	NZ_LASD01000002. 1
<i>B. cordobensis</i> LMG 27620 ^{&}	阿根廷-土壤	环境分离株(生物防治菌株)	NZ_LGRC01000001. 1
<i>B. diazotrophica</i> DPU-3	含羞草属固氮根瘤中分离	环境分离株	EU294395. 1
<i>B. diffusa</i> YQP8	土壤	环境分离株	JF806424. 1
<i>P. dilworthii</i> WSM 3556 ^{&}	南非-植物(<i>Lebeckiaambigua</i>)根瘤	环境分离株	NZ_AWZT01000011. 1
<i>B. dolosa</i> LMG 21443	塞内加尔-颖状链荚豆(<i>Alysicarpus glumaceus</i>)根瘤	环境分离株	AY324808. 1
<i>B. ferrariae</i> FeG1 01 [#]	巴西-铁矿	环境分离株	HQ398577. 1
<i>B. fungorum</i> LMG 16225 ^{&#}	法国-白腐菌(<i>Phanerochaetechrysosporium</i>)	环境分离株	AY619664. 1
<i>B. ginsengisoli</i> LMG 24044 [#]	韩国-土壤	环境分离株	HQ398579. 1
<i>B. glathei</i> LMG 14190 [#]	德国-红土	环境分离株	AY619666. 1
<i>B. glumae</i> LMG 2196 [#]	日本-水稻(<i>oryza sativa</i>)	植物致病株	AJ551324. 1
<i>B. graminis</i> LMG 18924 [#]	法国-玉米衰老的根系	环境分离株	AY619653. 1
<i>P. grimmiae</i> R27 ^{&}	中国-旱生苔藓	环境分离株	NZ_JFHE01000004. 1
<i>P. heleia</i> NBRC 101817 ^{&#}	越南-荸荠	环境分离株	NZ_BBJH01000021. 1
<i>B. hospit</i> LMG 20598 [#]	比利时-30 ~60 cm 深度的土壤中分离	环境分离株(降解二氯苯氧基乙酸)	FJ958192. 1
<i>B. hum</i> LMG 22934 [#]	荷兰-草地根际土壤	环境分离株	FCNW02000026. 1
<i>B. kururiensis</i> LMG 19447 [#]	日本-三氯乙烯污染的含水区	环境分离株(降解三氯乙烯)	AY619654. 1
<i>B. lata</i> FFI-20	阿根廷-地板清洁剂	环境分离株	GU938655. 1
<i>B. latens</i> LMG 24064 ^{&#}	意大利-囊性纤维化患者	人类致病株	HQ398566. 1
<i>B. mallei</i> 11 ^{&}	土耳其-人体	人类致病株	NZ_CP009587. 1
<i>B. mallei</i> 2002734299 ^{&}	匈牙利-豚鼠	动物致病株	NZ_CP009337. 1

续表 1

菌株名称	菌株来源	菌株特性	GenBank 登录号
<i>B. maliei</i> 23344 ^{&}	缅甸-膝关节液	人类致病株	NZ_CP008704. 1
<i>B. megalochromosomata</i> JC2949	韩国-草地土壤	环境分离株	LRBF01000226. 1
<i>B. megapolitana</i> LMG 23650 ^{&#}	德国-苔藓(<i>Aulacomniumpalustre</i>)	环境分离株	HQ398583. 1
<i>B. metallica</i> 24068T [#]	美国-囊性纤维化患者	人类致病株	HE981733. 1
<i>B. mimosarum</i> PAS44 [#]	中国-含羞草属(<i>Mimosa pigra</i>)的根瘤	环境分离株	HQ398584. 1
<i>B. monticola</i> JC2948 ^{&}	韩国-山上土壤	环境分离株	LRBG01000003. 1
<i>B. multivorans</i> S353 [#]	比利时-囊性纤维化患者	人类致病株	EF427838. 1
<i>B. nodosa</i> STM7353	巴西-南美豆	环境分离株	HE983728. 1
<i>B. oklahomensis</i> C6786 ^{&}	美国-盆腔的伤口	人类致病株	CP009555. 1
<i>P. oxyphila</i> NBRC 105797 ^{&#}	日本-森林土壤	环境分离株	NZ_BAYD01000014. 1
<i>B. phenazinium</i> LMG 2247 [#]	苏氨酸富集的土壤	环境分离株	HQ398588. 1
<i>B. phenoliruptrix</i> AC1100 ^{&#}	2,4,5-三氯苯氧乙酸唯一碳源的混合培养物	环境分离株	HQ398589. 1
<i>B. phymatum</i> LMG 21445 [#]	法国-根瘤	环境分离株	AY644640. 1
<i>B. phytofirmans</i> PsJN ^{&#}	植物内生菌	环境分离株(促进植物生长)	CP001052. 1
<i>B. plantarii</i> LMG 9035 [#]	日本-枯萎病和黄化病的水稻幼苗	植物致病株	AY619655. 1
<i>B. pseudomallei</i> 1026b ^{&}	泰国-败血症患者的血液	人类致病株	CP002833. 1
<i>B. pseudomallei</i> K96243 ^{&}	泰国-临床	人类及动物致病株	AY697975. 1
<i>B. pseudomultivorans</i> LMG 16669	英国-树兰(<i>Epidendrum obrienianum</i>)根圈	环境分离株	HE963745. 1
<i>B. pyrrocinia</i> ATCC 39277	美国-麦田土壤	环境分离株	AF456032. 1
<i>B. sabiae</i> LMG 24235 [#]	巴西-豆科(<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>)根瘤	环境分离株	HQ398591. 1
<i>B. sacchari</i> LMG 19450 ^{&#}	巴西-甘蔗种植园的土壤	环境分离株	AY644641. 1
<i>B. sartisoli</i> LMG 24000 ^{&#}	新西兰-多环芳香烃(PAH)污染的土壤	环境分离株(降解菲)	HQ398593. 1
<i>B. sediminicola</i> LMG 24238 ^{&#}	韩国-淡水沉渣	环境分离株	HQ398594. 1
<i>B. seminalis</i> BCCU1	美国-囊性纤维化患者	人类致病株	EF408665. 1
<i>B. silvatlantica</i> PPCR-2 [#]	玉米根际	环境分离株	HQ398596. 1
<i>B. soli</i> LMG 24076 [#]	韩国-人参(ginseng)土壤	环境分离株	HQ398597. 1
<i>B. sordidicola</i> LMG 22029 ^{&#}	韩国-麻栎(<i>Phanerochaetesordida</i>)	环境分离株	HQ398570. 1
<i>B. spreintiae</i> WSM5005 ^{&#}	南非-植物(<i>Lebeckiaambigua</i>)根瘤	环境分离株	NZ_KI421534. 1
<i>B. stabilis</i> LMG 14294 [#]	比利时-囊性纤维化患者	人类致病株	AF456031. 1
<i>B. telluris</i> LMG 22936 ^{&#}	荷兰-玉米单作区的土壤	环境分离株	FCNZ02000013. 1
<i>B. terrae</i> LMG 23368 [#]	韩国-阔叶林土壤	环境分离株	HQ398598. 1
<i>B. terrestris</i> LMG 22937 ^{&#}	荷兰-玉米单作区的土壤	环境分离株	FCOL02000002. 1
<i>B. terricola</i> LMG 20594 ^{&#}	比利时-30 ~ 60 cm 深度土壤	环境分离株(降解农药)	HQ398599. 1
<i>B. thailandensis</i> LMG 20219 [#]	泰国-稻田土壤	环境分离株	AY619656. 1
<i>P. tropica</i> LMG 22274 ^{&#}	巴西-甘蔗根	环境分离株	FNZM01000020. 1
<i>B. tuberum</i> LMG 21444 [#]	南非-球兰(<i>Aspalathuscarnosa</i>)的根瘤	环境分离株	AY619674. 1
<i>B. ubonensis</i> LMG 20358 [#]	泰国-表层土壤	环境分离株	AY780511. 1
<i>B. udeis</i> LMG 27134 ^{&#}	美国-蔡污染的土壤	环境分离株	FCOK02000001. 1
<i>B. unamae</i> BRUESC202	巴西-野生结节	环境分离株	KF031494. 1
<i>B. vietnamiensis</i> ATCC 53617	美国-废水	环境分离株(生物防治菌株)	AF456028. 1

注: [#]表示该菌株为典型株(type strain); [&]表示全基因组测序完整图/草图;表中 *B.* 为 *Burkholderia* 属名缩写, *P.* 为 *Paraburkholderia* 属名缩写

2 × *Taq* PCR Master Mix 25 μl, 正反引物各 2 μl, DNA 模板 5 μl,加水至 50 μl。利用 Primer 3 Plus 根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)基因数据库 *recA* 序列(DQ989504. 1 ~ DQ989518. 1)自行设计 *recA* 引物, *recA*-F: GATAGCAAGAAGGGCTCC, *recA*-R: CTCTTCTTCGTC CATCGCCTC。扩 增 条 件 为: 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s,循环 30 次;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物长度为 512 bp,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, Goldview 染色,凝胶成像分析仪观察 PCR 扩增结果,并进行双向测序。

1. 2. 2 *recA* 序列分析

所得序列提交至 GenBank 数据库获得序列编

号,并从数据库中提取伯克霍尔德菌属(包括伯克霍尔德菌属和副伯克霍尔德属 *Paraburkholderia*) 72 个种的代表菌株 *recA* 序列和 21 个唐菖蒲伯克霍尔德菌种内菌株 *recA* 序列,用 MEGA6.0 软件对 *recA* 基因进行分析。

1. 2. 3 单核苷酸的多态性(SNP)分析

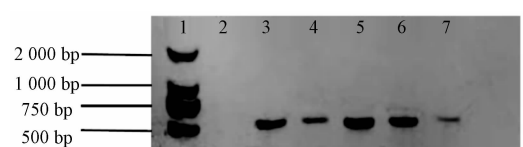
recA 序 列: 以 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* LMG11626 为参比序列,利用 Clustalw 软件对 21 个唐菖蒲伯克霍尔德菌种内菌株和最近源 2 个种的菌株进行 *recA* 序列比对,完成 SNP 分析。

16S rRNA 序列:从 GenBank 网站下载唐菖蒲伯克霍尔德菌以及邻近菌株的 16S rRNA 序列,并利用 DNASTAR 组件 Megalign 计算序列间的差异性。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

以自行设计的引物 *recA*-F 和 *recA*-R 对 4 株食物中毒分离株和标准菌株 (CICC 10574) 同时进行 PCR 扩增,扩增效果良好,阴性对照未出现条带,5 株菌株都有单一清晰条带,产物大小符合预期 512 bp,见图 1。PCR 产物进行双向测序,测序结果提交 GenBank 获得编号 (KY312856 ~ KY312860)。



注:1 为 Marker DL2000;2 为空白对照;3 为食物中毒分离株 YD-1;4 为食物中毒分离株 YD-2;5 为食物中毒分离株 YD-4;6 为食物中毒分离株 YD-HH;7 为标准菌株 (CICC 10574)

图 1 分离株的 *recA* 基因扩增产物电泳图

Figure 1 Electropherogram of PCR amplification products of the *recA* gene

2.2 *recA* 序列分析构建进化树

在 GenBank 数据库中选取唐菖蒲伯克霍尔德菌种内所有菌株及伯克霍尔德菌属其他 72 个种的菌株 *recA* 序列信息,详见表 1,以这些 *recA* 序列比对构建的伯克霍尔德菌属进化树,见图 2,其中唐菖蒲伯克霍尔德菌种内进化树见图 3。

从表 1 可以看出 GenBank 数据库中伯克霍尔德菌属内菌株主要有环境分离株、植物致病菌和人/动物致病株,而单就唐菖蒲伯克霍尔德菌这一个种内就有环境分离株如 CICC 10574 和 UAPS07070,植物病原菌唐菖蒲伯克霍尔德菌唐菖蒲致病变种、唐菖蒲伯克霍尔德菌洋葱致病变种、唐菖蒲伯克霍尔德菌蘑菇致病变种 (数据库中目前没有该变种的 *recA* 序列)以及人类的食源性致病菌唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种。

由图 2 可见,目前 GenBank 数据库中所有唐菖蒲伯克霍尔德菌种菌株在 *recA* 序列分析构建的进化树上都位于同一个进化分支上,与该种最近源的都是植物病原菌,如伯克霍尔德菌属细菌中水稻细菌性谷枯病菌和水稻幼苗枯萎的病原菌植物伯克霍尔德菌。同时该种与伯克霍尔德菌属中人类条件致病菌洋葱伯克霍尔德菌群和人畜共患病原菌类鼻疽伯克霍尔德菌群 (*B. pseudomallei* group) 也近源。图 2 中所有命名为副伯克霍尔德属 (*Parabukholderia*) 的菌株和多数环境分离株都在分支 II,而所有病原菌,不论是植物病原菌还是人类、动物致病株都集中于上部的分支 I。

由图 3 可见,唐菖蒲伯克霍尔德菌种内以 *recA*

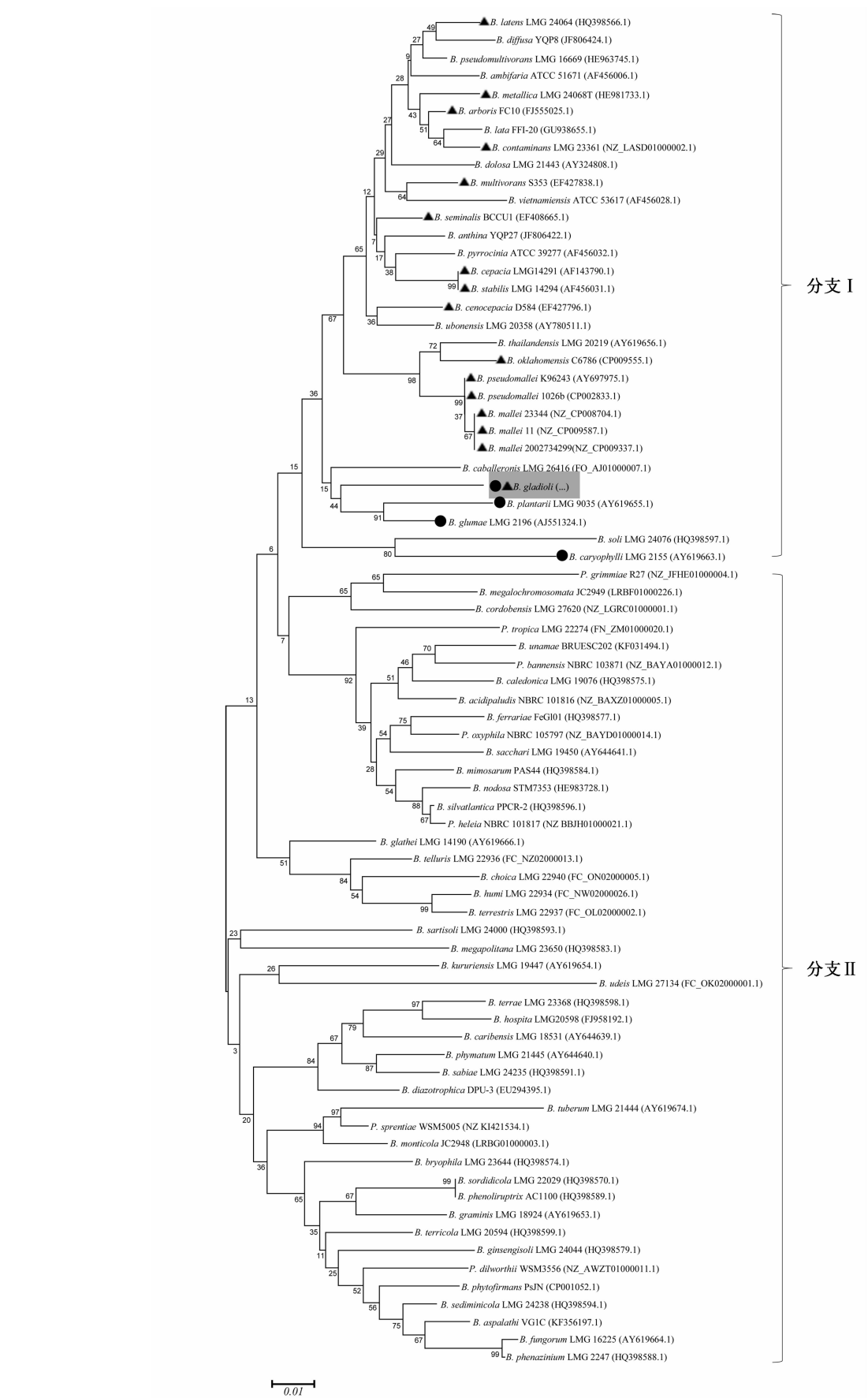
序列分析所构建的进化树中,来自云南不同地区的两起不同年份的食物中毒案例中的分离株 YD-HH、YD-1、YD-2 和 YD-4 在同一个进化分支上,它们与原椰毒假单胞菌典型株 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* LMG 11626 近源;唐菖蒲伯克霍尔德菌种中另外 2 个植物病原菌变种唐菖蒲伯克霍尔德菌唐菖蒲致病变种、唐菖蒲伯克霍尔德菌洋葱致病变种都单独构成一个进化分支,分离自水果的两个环境分离株 CICC 10574 和 UAPS07070 在同一进化分支上,只有韩国分离的水稻病原菌 *B. gladioli* BSR3 较为独特单独成为一只分支。

2.3 唐菖蒲伯克霍尔德菌种内及植物伯克霍尔德菌 *recA* 序列的 SNP 比较

将唐菖蒲伯克霍尔德菌种内 21 株菌株的 *recA* 序列进行 SNP 比较,结果见图 4。

对 *recA* 的 416 bp 长度序列的比较发现,来自云南不同地区的两起食物中毒案例中的分离株 YD-HH、YD-1、YD-2 和 YD-4 的序列完全一致 (故图 4 中仅列出 YD-HH),但是它们和分离自印尼爪哇由椰子发酵制备的天培而导致食物中毒案例的原椰毒假单胞菌的典型株 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* LMG 11626 之间有 2 bp 的差异。而 GenBank 数据库中所有的 12 个唐菖蒲伯克霍尔德菌洋葱致病变种菌株的序列也是完全一致的,所以仅以 LMG 6979 序列为代表。分离自植物的 CICC 10574 和 UAPS07070 序列一致,以 CICC 10574 为代表。唐菖蒲伯克霍尔德菌变种的典型株 *B. gladioli* pv. *gladioli* LMG 2216 和韩国分离的水稻病原菌 *B. gladioli* BSR3 序列独特则单独列出。图 4 可见,凡是唐菖蒲伯克霍尔德菌种内所有的菌株在 *recA* 基因 416 bp 的序列中仅有 1 ~ 3 bp 的微小差别,序列之间相似度高达 99.28% ~ 99.76%;但是它们和与其序列最相似的 *B. glumae* LMG 2196 之间差异达 20 bp,相似度 95.16%;与植物伯克霍尔德菌种标准株 *B. plantarii* LMG 9035 之间差异达 28 bp,相似度 93.27%。

同样比较这几个标准株 1 124 bp 的 16S rRNA 序列,唐菖蒲伯克霍尔德菌种内菌株相似度为 99.4% ~ 100.0%,而与 *B. glumae* LMG 2196 和 *B. plantarii* LMG 9035 相似度也高达 98.8% 和 98.9%。可见 *recA* 序列比较能够准确充分地将唐菖蒲伯克霍尔德菌种和伯克霍尔德菌属的近源种区分开,甚至在唐菖蒲伯克霍尔德菌种内各变种区分上有参考价值。而 16S rRNA 序列则过于保守,很难将唐菖蒲伯克霍尔德菌种与近源的其他种明确地区分开。



注:图中 *B.* 为 *Burkholderia* 属名缩写;*P.* 为 *Paraburkholderia* 属名缩写;▲为人、畜病原菌;●为植物致病菌;灰色底色部分为唐菖蒲伯克霍尔德菌属内进化树

图 2 *recA* 序列分析构建的伯克霍尔德菌属进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of *Burkholderia* genus by *recA* partial sequence analysis

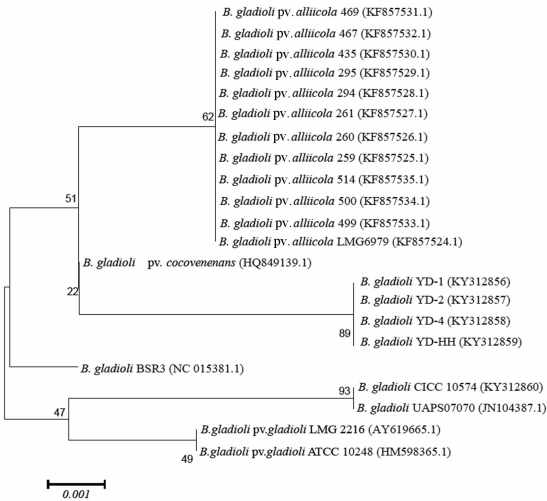
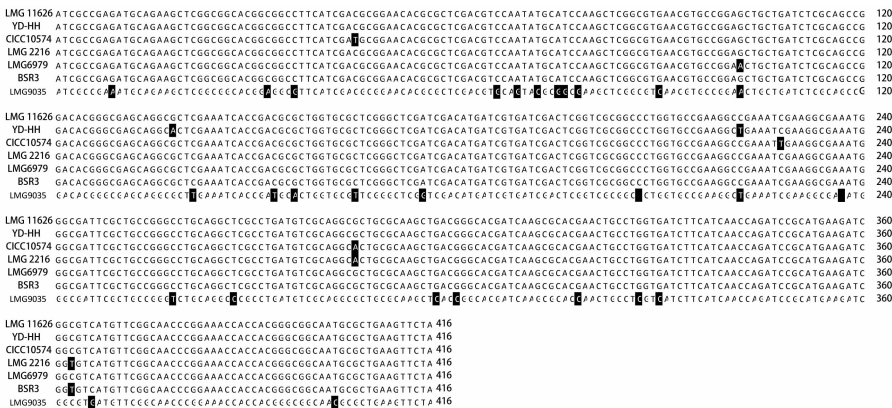


图 3 *recA* 序列分析构建的唐菖蒲伯克霍尔德菌种内进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Burkholderia gladioli* species by *recA* partial sequence analysis



注:黑底色为与标准菌株 LMG11626 序列差异位点

图 4 唐菖蒲伯克霍尔德菌种内不同菌株之间 *recA* 序列的 SNP 比较

Figure 4 SNP analysis of *recA* sequences in *Burkholderia gladioli* species

2003 椰毒假单胞菌食物中毒一致, 生理生化鉴定和分子生物学鉴定都与唐菖蒲伯克霍尔德菌一致, 建议在标准修订时对其名称进行更新。

2014 年加拿大学者^[15]通过表型和比较基因组分析, 将原伯克霍尔德菌属分为包含各种动物、人类、植物致病菌的伯克霍尔德菌属和一个含多种环境细菌的副伯克霍尔德菌新属, 该结论已被一些机构所接受, 所以表 1 中所选用的伯克霍尔德菌菌株中已有一些细菌属名改为副伯克霍尔德菌。该文献中采用 21 个保守蛋白质截短序列分析做出的进化树将伯克霍尔德菌属分为分支 I 和分支 II 两大类, 而本研究采用的 *recA* 构建的进化树与其组成基本一致, 说明 *recA* 序列分析对该属内各种鉴定非常有效, 接近全基因组分析的结果。

在采用 16S rRNA 序列分析将两个案例中的 4 株分离株鉴定到伯克霍尔德菌属之后, 本研究采

3 讨论

椰毒假单胞菌食物中毒曾是我国死亡率最高的细菌性食物中毒之一, 遍及我国 20 多个省份^[1], 后经过卫生部门的大力宣传和消费者生活水平的提高, 食用酵米面情况减少, 这类食物中毒事件目前已经较为罕见, 相关研究日见稀少。但 2012—2014 年云南省红河州和文山州 2 起唐菖蒲伯克霍尔德菌食物中毒事件病死率高达 30.0% 和 55.6%, 在社会上造成恶劣影响, 经济损失巨大^[3-4], 所以食品安全监管部门不应放松对该类食源性致病菌的监控和研究。椰毒假单胞菌在国际分类系统中已经并入唐菖蒲伯克霍尔德菌, 我国目前尚未修订该项食品安全国家标准, 细菌名称与国际不接轨, 导致很多困扰。如云南省这两起食物中毒事件从流

行病调查特征、毒素检测结果与 GB/T 4789.29—

用 *recA* 序列分析比较了伯克霍尔德菌属中 72 种不同种标准株的序列, 以及唐菖蒲伯克霍尔德菌种内 4 个致病变种及环境分离株的 *recA* 序列分析, 发现 *recA* 序列分析不仅能很好鉴别伯克霍尔德菌属内不同的种, 对唐菖蒲伯克霍尔德菌种内变种的区分也有参考价值。

参考文献

[1] 刘秀梅. 我国椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒流行趋势浅析[J]. 中华预防医学杂志, 1996, 30(6): 372-374.

[2] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验: GB/T 4789.29—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[3] 周帼萍, 梁泉, 黄庭轩, 等. 云南省文山州广南县吊浆粿食物中毒事件的病原学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(1): 71-75.

[4] 杨庆文, 国译丹, 周惠新, 等. 云南省首起唐菖蒲伯克霍尔

德菌食物中毒的鉴定与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(17): 3363-3364,3367.

[5] 焦振泉, 刘秀梅, 杨瑞馥,等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种 16S rDNA 序列测定与分析 [J]. 卫生研究, 1999, 28 (4): 232-235.

[6] CHAIN P S G. Genomic versatility in the *Burkholderia* genus: from strains to species[D]. East Lansing: Doctoral Dissertation of Michigan State University, 2011.

[7] JONES A M, STANBRIDGE T N, ISALSKA B J, et al. *Burkholderia gladioli*: recurrent abscesses in a patient with cystic fibrosis[J]. Journal of Infection, 2001, 42(1):69-71.

[8] DURSUN A, ZENCIROGLU A, KARAGOL B S, et al. *Burkholderia gladioli* sepsis in newborns[J]. European Journal of Pediatrics, 2012, 171(10):1503-1509.

[9] JIAO Z Q, YOSHIKAKI K, NORIKO M, et al. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenans* and an emended description of *B. gladioli* [J]. Microbiology and Immunology, 2003, 47(12):915-925.

[10] LIU D Y. Molecular detection of foodborne pathogens [M]. USA:Taylor and Francis CRC Press, 2009:338-343.

[11] COSTECHAREYRE D, RHOUMA A, LAVIRE C, et al. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. [J]. Microbial Ecology, 2010, 60(4):862-872.

[12] SCHOLZ H C, WITTE A, TOMASO H, et al. Genotyping of *Chromobacterium violaceum* isolates by *recA* PCR-RFLP analysis [J]. Fems Microbiology Letters, 2005, 244(2):347-352.

[13] PAYNE G W, VANDAMME P, MORGAN S H, et al. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7):3917-3927.

[14] CESARINI S, BEVIVINO A, TABACCHIONI S, et al. *RecA* gene sequence and multilocus sequence typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(5):580-588.

[15] SAWANA A, ADEOLU M, GUPTA R S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species [J]. Front Genet, 2014, 5:429.

· 其他 ·

《疾病监测》杂志 2018 年征稿征订启事

《疾病监测》杂志 1986 年 1 月创刊,国内外公开发行。国内统一刊号:CN11-2928/R,国际刊号:ISSN 1003-9961。

《疾病监测》杂志是中华人民共和国卫计委主管,中国疾病预防控制中心主办,传染病预防控制所《疾病监测》杂志编辑部出版发行的国家级学术性期刊,是代表中华人民共和国卫计委向国内外公开报道中国每月甲乙丙类传染病疫情的唯一的专业性刊物。杂志以快、简、新为突出特点,及时准确权威地报道中国传染病疫情。

主要栏目:热点聚焦、述评、专家论坛、疫情快讯、传染病监测、慢性非传染病监测、自然疫源性疾病预防、院内感染监测、突发公共卫生事件监测、环境卫生监测、食品卫生监测、技术与方法、综述、网络直报、死因监测、耐药监测、案例分析、海外动态、科普知识、行业动态、国外媒体、简讯等。

刊发周期:审稿通过后一般在 3 个月左右能刊出。对具有创新性的优秀论文开绿色通道,加急审稿、优先发表。

欢迎投稿、欢迎订阅。

在线投稿:http://www.jbjc.org

订阅:由北京报刊发行局发行,邮发代号:82-859。月刊,每期定价 18 元,全年 216 元。可汇款到编辑部订阅过刊(免费邮寄、挂号加收 3 元)。

地址:北京市昌平区昌百路 155 号《疾病监测》杂志编辑部

电话/传真:010-58900732 **邮政编码:**102206

E-mail:jbjc@iedc.cn