

食物中毒

应用 rDNA-内转录间隔区分子条形码技术调查福建省
亚稀褶黑菇中毒事件林锋^{1,2}, 庄东铭³, 黄信有⁴, 裴振义⁵, 高建龙³, 毛财凤⁶, 方勤美⁷, 傅武胜^{1,2,8}

- (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 福建省疾病预防控制中心 福建省人兽共患病
研究重点实验室, 福建 福州 350001; 3. 邵武市疾病预防控制中心, 福建 南平 354000;
4. 南平市疾病预防控制中心, 福建 南平 353000; 5. 建瓯市疾病预防控制中心, 福建 建瓯 353100;
6. 福建省邵武市立医院, 福建 南平 354000; 7. 福建省农业科学院生物技术研究所,
福建 福州 350003; 8. 福建医科大学公共卫生学院, 福建 福州 350108)

摘要:目的 调查福建省南平地区 3 个市县的 3 起野生菌食物中毒事件, 为今后野生菌中毒调查和处置积累经验, 减少中毒事件的发生。方法 通过查阅中毒患者的临床救治资料, 前往中毒事件发生地采集引起中毒的可疑蘑菇样品, 并采用 rDNA-内转录间隔区 (rDNA-ITS) 分子条形码鉴定技术进行种属鉴别。结果 中毒流行病学特征、中毒患者临床特征、生化指标变化和分子生物学鉴定的结果表明, 2017 年 8 月的 2 起食物中毒事件均由亚稀褶黑菇 (*Russula subnigricans* Hongo) 导致; 根据中毒患者临床特征, 另一起中毒事件亦被推断为由亚稀褶黑菇引起; 3 起中毒事件中, 蘑菇食用者为 21 人, 发病 17 人, 罹患率为 81.0%, 其中 3 人死亡, 病死率为 17.6% (3/17)。结论 首次在福建省通过分子生物学手段鉴别出由亚稀褶黑菇引起的食物中毒事件; 亚稀褶黑菇广泛分布于福建山区, 易被误采误食而引起中毒事件, 且病死率高。

关键词:亚稀褶黑菇; 毒蘑菇; 食物中毒; 分子生物学鉴别; 流行病学调查

中图分类号: 文献标识码:A 文章编号: 1004-8456(2019)03-0276-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.03.017

Investigation on food poisoning incidents of *Russula subnigricans* Hongo by application of rDNA-internal transcribed spacer molecular barcode technique in Fujian Province

LIN Feng^{1,2}, ZHUANG Dongming³, HUANG Xinyou⁴, PEI Zhenyi⁵,
GAO Jianlong³, MAO Caifeng⁶, FANG Qinmei⁷, FU Wusheng^{1,2,8}

- (1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Fuzhou
350108, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis Research, Fujian Center for Diseases
Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China; 3. Shaowu Center for Diseases Control
and Prevention, Fujian Nanping 354000, China; 4. Nanping Center for Diseases Control and
Prevention, Fujian Nanping 353000, China; 5. Jian'ou Center for Diseases Control and
Prevention, Fujian Jian'ou 353100, China; 6. Fujian Shaowu Hospital, Fujian Shaowu
354000, China; 7. Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Fuzhou 350003, China;
8. College of Public Hygiene, Fujian Medical University, Fujian Fuzhou 350108, China)

Abstract: Objective To investigate three cases of food poisoning caused by the toxic mushroom in Nanping, Fujian Province in 2017, accumulate the experience and solutions for the investigation and disposal of wild mushroom poisoning and help to reduce the morbidity and mortality caused by food poisoning incident in the future. **Methods** Review the clinical treatment data of the patients with poisoning, and identify the species of the mushroom samples by internal transcribed spacer (ITS) barcode identification technology. **Results** The epidemiological investigation, clinical characteristics analysis and ITS sequencing verification were carried out for three poisoning incidents at the end of August

收稿日期: 2019-03-22

基金项目: 福建省科学技术厅社会发展引导性(重点)项目(2018Y0007)

作者简介: 林锋 男 硕士生 研究方向为有毒野生菌鉴别及中毒调查 E-mail: linf9527@163.com

通信作者: 傅武胜 男 主任技师 研究方向为食品安全理化检验与风险评估 E-mail: fwsfqm@126.com

2017 with 17 poisoning patients and 3 deaths. According to the result of the epidemiological characteristics of poisoning, the clinical characteristics of the poisoning patients, the changes of biochemical indexes and the identification result by molecular biology, two cases of food poisoning were confirmed to be caused by *Russula subnigricans* Hongo and another case was presumed to be caused by this toxic mushroom. **Conclusion** The molecular biology identification was firstly used to identify 2 cases of mushroom poisoning incidents owing to *Russula subnigricans* Hongo in Fujian Province, which is widely distributed among the mountainous areas in Fujian Province.

Key words: *Russula subnigricans*; poisonous mushroom; food poisoning; molecular biological identification; epidemiological survey

我国野生菌资源丰富,约有 3 800 种大型真菌^[1],虽然大多数种类对人类不具有毒性作用,但其中至少有 435 种为有毒蘑菇^[2]。在形态上,不少有毒蘑菇容易与可食用蘑菇相混淆,易被误采误食从而导致食物中毒。我国每年由毒蘑菇引起的中毒事件数居高不下,平均致死率高达 21.48%^[3],是国外同期的 10 倍以上。福建省森林覆盖率在全国居于首位,野生蘑菇种类较多,也是我国野生菌中毒事件频发地区之一,在蘑菇生长的旺季频频发生因食用有毒野生菌而引起的中毒事件,其中包括可导致人死亡的亚稀褶黑菇中毒。据文献^[4]报道,我国亚稀褶黑菇中毒事件最早见报于 1975 年,该事件发生于福建省宁化县,造成 4 人中毒,2 人死亡,之后我国云南、贵州、湖南等省份也不断有报道^[5-7]。亚稀褶黑菇是我国毒性最大的毒蘑菇之一,尹军华等^[8]调查 1994—2006 年的 83 起蘑菇中毒事件,其中由亚稀褶黑菇引起的 15 起事件的致死率高达 49.4%;CHEN 等^[9]调查了 1994—2012 年我国南方 102 起蘑菇中毒事件,数据表明亚稀褶黑菇引起的中毒死亡人数占蘑菇中毒总调查死亡数的 24.59%,仅次于灰花纹鹅膏 (*Amanita fuliginea*, 43.17%)。2017 年 8 月底,福建省南平地区的 3 个邻近市县在一周内接连发生 3 起疑似由亚稀褶黑菇引起的蘑菇中毒事件,共造成 17 人中毒,其中 3 人死亡。本研究对这 3 起中毒事件进行了调查,对相关资料进行分析,并首次在福建省采用现代分子生物学手段——rDNA-内转录间隔区 (rDNA-ITS) 分子条形码技术鉴别,确定其中 2 起事件中中毒因素为亚稀褶黑菇,为今后类似有毒蘑菇中毒的应急处置和防控积累经验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

编号为 R02 的蘑菇样品来自中毒事件 1,由知情者带领调查人员到事件发生地南平市松溪县浩屏山景区采集,根据患者回忆认为与其食用的蘑菇属同种;采集前,调查人员记录子实体的形态特征,

并去除子实体带有的泥土等杂质,样品送至福建省疾病预防控制中心实验室后用便携式鼓风干燥机在 50 ℃ 下烘烤至干。中毒事件 2 蘑菇样品为建瓯市水源乡中毒患者家中的剩余食物,编号为 R03,样品被烹煮并含某些调味料。中毒事件 3 无剩余样品,患者病重未能陪同调查人员至生长地采集毒蘑菇。

1.1.2 主要仪器与试剂

Long Gene A100 Thermal cycle 基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),FR-980 A 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司),Powerpac Basic 电泳仪,IS-RDD3 恒温振荡器,LRH-250 生化培养箱。

十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司),DNA 标记物 D2000 Marker、DH-5 α 感受态细胞(-80 ℃ 下保存,于冰浴上化冻后使用)均购自天根生化科技(北京)有限公司,2 \times Easy Taq PCR Super Mix(北京全式金生物技术有限公司),DNA 胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司],pMD19-T Vector Cloning Kit 克隆载体试剂盒[宝日生物技术(北京)有限公司],琼脂糖粉(100 g/瓶,美国 Sigma)。真菌通用型引物 ITS 4: 3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5', ITS5: 3'-GGAAGTAAAGTTCGTAACAAGG-5',浓度均为 10 μ mol/L,由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 流行病学调查

参阅检验报告单和复印相关病历资料,获知患者的年龄、生化指标、主要症状等信息。

1.2.2 分子生物学鉴定^[3]

取烘干后的样品菌盖部分约 0.1 g,用液氮研磨至粉末状后迅速转移至 1.5 ml 离心管中,使用植物组 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA,采用 2 \times Easy Taq PCR Super Mix 扩增试剂和通用引物序列扩增 ITS 片段;将扩增产物进行电泳,割胶回收纯化 PCR 产物,转接至 pMD-19T 载体,将此连接产物转化至 DH-5 α 感受态细胞内培养,再挑选单菌落进行摇

菌,菌液 DNA 测序由铂尚生物技术(上海)有限公司完成。

测得的 ITS 序列与美国生物技术信息中心(NCBI)的 GenBank 数据库进行比对,可得到序列相似性和相似的物种名称等信息。如二者 ITS 序列的相似性>96%,则初步确定待测蘑菇与数据库中的目标蘑菇为同种关系;如序列相似性 \leq 93%,则鉴别为非同种关系,为种以上的关系^[8]。下载相似率高的物种 ITS 序列及相似物种的 ITS 序列,以变绿红菇(*Russula virescens*)为外组群,建立系统发育树。通过邻接(NJ)法进行系统发育树的建立,用 Bootstrap 法对系统发育树进行检验,1 000 次重复,从而对样品的种属进行最终鉴别。

2 结果

2.1 流行病学特征

2.1.1 流行病分布特征

由病例资料得知,3 起中毒事件均发生在 2017 年 8 月底,中毒事件 1 为 10 名同伴外出游玩时自行采摘蘑菇经饭店厨师烹调为蘑菇汤后食用所导致,野生蘑菇总量为 0.5 kg 左右,患者均饮用蘑菇汤,无饮酒。中毒事件 2 为农村家庭就餐,可疑食品为清炒蘑菇,各中毒者的具体食用量不详。中毒事件 3 中蘑菇被撕成小片后,清洗、加米水煮后清炒,病例 13 食用量最多,共食用 10 片,其他患者食用量均小于 5 片。3 起中毒事件共发病 17 人,死亡 3 人,病死率为 17.6%(3/17)。患者中男性 9 名,女性 8 名,所有患者年龄区间为 2~65 岁。潜伏期最短为 15 min 左右,最长为 17 h,平均为 2.6 h,见表 1。

表 1 3 起中毒事件发生时间、地点及患者信息

Table 1 Information about the poisoning time, places and all the patients

事件	发生时间	发生地	患者	性别	年龄/岁	潜伏期/h
1	8月23日13时	松溪县	病例 1	女	47	1.0
			病例 2	女	47	1.2
			病例 3	女	52	1.0
			病例 4	男	57	2.0
			病例 5	男	48	5.0
			病例 6	男	48	3.6
2	8月24日18时	建瓯市	病例 7	男	53	1.5
			病例 8	男	2	1.0
			病例 9	男	11	3.2
			病例 10	女	49	0.25
			病例 11	男	43	2.0
			病例 12	女	38	1.5
3	8月30日12时	邵武市	病例 13	男	48	17
			病例 14	女	40	1.0
			病例 15	男	23	1.2
			病例 16	女	65	1.0
			病例 17	女	44	0.75

2.1.2 患者临床特征

中毒患者的首发症状为恶心、呕吐等胃肠炎症状,潜伏期为 1~2 h,少数患者的潜伏期达 3 h 以上;8 名患者出现胸闷、乏力、全身剧烈疼痛等症状,但发病时间不详;生化检查发现,除了未检测生化指标的患者外,共 7 名患者肌酸激酶(CK)值异常升高,高于正常值上限 10 倍,临床上被确定为横纹肌溶解症^[10];7 名患者谷丙转氨酶(ALT)异常升高,表明患者的肝功能异常,肝脏受损较严重,症状表现与亚稀褶黑菇文献^[11]描述一致。病例 13 食用蘑菇 17 h 后出现背痛、酱油色尿等症状,与 3 起事件其他患者的中毒表现不同。部分患者由于蘑菇食入量较少,仅表现为轻度的胃肠炎症状,所检测生化指标也未见异常,见表 2。

表 2 3 起中毒事件患者主要症状、ALT、CK 值及预后情况

Table 2 Alanine aminotransferase, creatine kinase values, main symptoms and prognosis of the patients

患者	主要症状	ALT/(U/L)	CK/(U/L)	预后
病例 1	呕吐、背痛	131	6 200	治愈
病例 2	恶心、呕吐	33	72	治愈
病例 3	恶心、呕吐、乏力	17	58	治愈
病例 4	恶心、呕吐、背痛	631	38 900	治愈
病例 5	呕吐、乏力、胸闷	123	16 550	治愈
病例 6	恶心、呕吐、乏力	136	3 006	治愈
病例 7	呕吐、全身酸痛	1 063	42 116	死亡
病例 8	抽搐、恶心、呕吐	—	—	死亡
病例 9	恶心、呕吐	31	896	治愈
病例 10	呕吐、全身酸痛	134	6 560	治愈
病例 11	恶心、呕吐、腹泻	—	—	治愈
病例 12	胸闷、乏力、头痛	—	—	治愈
病例 13	酱油色尿、背痛	197	26 669	死亡
病例 14	恶心、呕吐	24	115	治愈
病例 15	恶心、呕吐	20	188	治愈
病例 16	恶心、呕吐、头晕	20	96	治愈
病例 17	恶心、呕吐、头晕	16	62	治愈

注:—表示该项信息不详;ALT 指标参考范围为 0~40 U/L;CK 指标参考范围为 38~174 U/L

2.2 样品鉴别

2.2.1 形态鉴定

中毒事件 1 采集的蘑菇样品菌盖呈棕色,成熟体菌盖周围上扬,中间略微凹下,呈漏斗状,菌褶密度较稀,褶厚且脆;菌柄粗短,可初步判定为红菇属;菌柄掰开后多为中空,似有虫蛀,菌柄受伤放置后,受伤处颜色逐渐变红;烘干后子实体呈黄色,未变黑。经专家肉眼形态鉴别,初步认定该蘑菇为亚稀褶黑菇,但不排除为稀褶黑菇(*Russula nigricans*)等其他毒蘑菇的可能。中毒事件 2 的样品为患者食用后的剩余样品,鲜蘑菇经烹调后形态变化极大,已无法对其进行形态鉴别。事件 3 的蘑菇样品在事件处置之初已被销毁,而未能获得。

2.2.2 rDNA-ITS 分子条形码鉴定

经检索,可疑中毒蘑菇样品 R02、R03 的 ITS 序列与 GenBank 数据库中的 7 个亚稀褶黑菇亚种 (*Russula subnigricans* Hongo) 序列间的相似性达到 99%,与 1 个亚种相似性达到 98%(见表 3),因此初步确定其为亚稀褶黑菇。系统发育树显示,样品 R02、R03 的 ITS 序列与表 3 中所有 8 个亚稀褶黑菇亚种的 ITS 序列处在同一分支,且支持率为 100%(见图 1),因此确认引起两起中毒事件的毒蘑菇为亚稀褶黑菇。

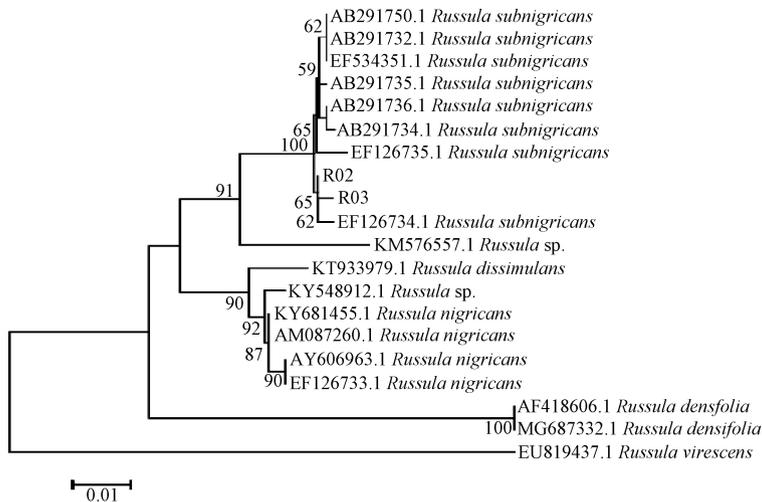
3 讨论

从形态学看,中毒事件 1 的样品形态与文献上关于亚稀褶黑菇的描述基本一致;事件 2 样品为烹调后的剩余样品,已无法通过形态进行鉴别,因此本研究通过 ITS 条形码鉴别方法对中毒蘑菇样品进行了种属鉴定。ITS 序列在物种的进化过程中承受的选择压力小,因此其具有进化相对迅速和多态性的特点,能反映出属、种以及菌株间的碱基对差异^[8],被研究者认为是大型真菌有效 DNA 条形

表 3 用于系统发育树分析的部分蘑菇名称和 ITS 片段相似性信息

Table 3 ITS sequences that were applied to build phylogenetic tree			
物种	相似性 /%	凭证码	登录号
<i>Russula subnigricans</i>	99	ZP6932	EF534351.1
	99	ZP7036 MHHNU	EF126734.1
	99	ZP6512	EF126735.1
	99	OSA-MY-4267	AB291750.1
	99	TNS-F-237524	AB291736.1
	99	OSA-MY-1722	AB291732.1
	99	OSA-MY-1725	AB291735.1
	98	OSA-MY-1724	AB291734.1
内群 <i>Russula</i> sp.	93	LM3263	KM576557.1
	93	AC856	KY548912.1
<i>Russula densifolia</i>	93	—	AF418606.1
	93	R64	MG687332.1
<i>Russula nigricans</i>	93	—	AM087260.1
	93	—	AY606963.1
	93	ZP7092	EF126733.1
<i>Russula dissimulans</i>	93	402	KY681455.1
	93	BPL285	KT933979.1
外组群 <i>Russula virescens</i>	—	JMP0079	EU819437.1

注:—表示无该项信息



注:仅显示支持率大于 50% 的分支

图 1 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on ITS sequence

码^[12]。在一些蘑菇中毒事故中,当样品形态失去鉴定价值时,采用 ITS 分子条形码有利于准确判断可疑中毒样品的种属。中毒事件 3 中,4 名患者有明显的消化道反应,且其潜伏期为 1 h 左右;另外 1 名患者出现横纹肌溶解症并伴随酱油色尿样,这与亚稀褶黑菇中毒特点基本一致,因此该事件的中毒原因可能为亚稀褶黑菇中毒。3 起中毒事件均发生在 8 月底,且发生地点为南平地区所属的 3 个不同市、县,说明亚稀褶黑菇中毒在该地区较为流行,需要引起相关部门的高度重视,并采取适当的防控措施

尤其需要在蘑菇生长旺盛时期之前,在有食用野生菌传统的林区加强经常性、覆盖面广的毒蘑菇中毒预防科普宣传,定期对卫生院等基层医疗机构的医生进行培训,提高医务人员对毒蘑菇中毒的识别判断能力和救治水平。

亚稀褶黑菇又被称之为亚黑红菇、亚稀褶红菇、火炭菌等,是目前发现的红菇科红菇属中最毒的种类^[13]。亚稀褶黑菇与同是红菇属的稀褶黑菇、密褶红菇 (*Russula densifolia*) 外表较为相似,蘑菇采集者若缺乏良好的专业知识及较强的辨别能力,往

往容易误采并导致食用者中毒。亚稀褶黑菇生长于高温潮湿的8~9月,分布于阔叶林或混交林地,以群生为常见,在福建、江西、湖南、云南、广东、贵州等省份多有生长^[14]。有限的研究表明,新鲜亚稀褶黑菇对小鼠的最小致死剂量为1 540 mg/kg BW,半数致死剂量(LD₅₀)为4 997 mg/kg BW^[15];其中的致命性毒素可能为环丙-2-烯羧酸,小鼠经口绝对致死剂量(LD₁₀₀)为2.5 mg/kg BW^[16]。亚稀褶黑菇可造成机体多脏器损害,患者一般死于中毒性心肌炎或中枢性呼吸衰竭^[15],因此是一种极为凶险的剧毒蘑菇。

通常情况下,亚稀褶黑菇中毒的初始症状表现为恶心、呕吐等胃肠炎反应,潜伏期较短,但在实际中毒事件中,不同人食用亚稀褶黑菇后所引起的中毒反应时间以及表现出的症状差异可能较大,因此在疑似蘑菇中毒事件患者救治中,为了防止意外,尤其避免出现患者死亡,对已食用蘑菇但尚未出现中毒表现的也应尽快给予洗胃、导泻、催吐等应急治疗处理;另外需密切监测患者CK值等心肌指标,并尽快收集可能引起中毒的剩余样品,必要时到生长地采集同种蘑菇,以进行毒蘑菇形态学初步判定和分子生物学的准确鉴别,明确蘑菇的种属,以便医生尽快制定最佳的治疗方案,从而最大程度减少中毒死亡的发生,提高患者的治愈率。

(志谢 湖南师范大学生命科学学院陈作红教授和昆明植物研究所杨祝良教授对中毒蘑菇样品的形态鉴别)

参考文献

[1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000.
[2] 图力古尔,包海鹰,李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报,2014,33(3):517-548.

[3] 陈作红. 毒蘑菇识别与中毒防治[M]. 北京:科学出版社,2016.
[4] 刘我鹏. 两起毒蘑菇中毒病例报告[J]. 中华预防医学杂志,1983(1/6):383-384.
[5] 周亚娟,王娅芳,朱姝,等. 贵州省2起亚稀褶黑菇中毒事件回顾性分析报告[J]. 微量元素与健康研究,2016,33(6):39-41.
[6] 钱显光,罗洪文. 27例火炭蕈(亚稀褶黑菇)中毒救治体会[J]. 医药前沿,2014(23):315-316.
[7] 郑再德,刘惠云. 亚稀褶黑菇中毒十例报告[J]. 食用菌,1985(2):46-47.
[8] 尹军华,张平,龚庆芳,等. 亚稀褶黑菇和稀褶黑菇的ITS序列分析[J]. 菌物学报,2008,27(2):237-242.
[9] CHEN Z H, ZHANG P, ZHANG Z G. Investigation and analysis of 102 mushroom poisoning cases in Southern China from 1994 to 2012[J]. Fungal Diversity, 2014,64(1):123-131.
[10] 高伟波,朱继红. 横纹肌溶解症的诊治策略[J]. 疑难病杂志,2011,10(1):77-79.
[11] 肖桂林,刘发益,陈作红,等. 灵芝煎剂治疗亚稀褶黑菇中毒患者的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(4):278-280.
[12] SCHOCH C L, SEIFERT K A, SABINE H, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012,109(16):6241-6246.
[13] 龚庆芳,张玉梅,谭宁华,等. 亚稀褶黑菇的化学成分[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(3):436-438.
[14] 李海蛟,余成敏,姚群梅,等. 亚稀褶黑菇中毒的物种鉴定、地理分布、中毒特征及救治[J]. 中华急诊医学杂志,2016,25(6):733-738.
[15] 刘源彬,刘我鹏,张茂银,等. 亚稀褶黑菇对小白鼠的毒性试验及其临床表现[J]. 海峡预防医学杂志,1998,4(4):38-39.
[16] MATSUURA M, SAIKAWA Y, INUI K, et al. Identification of the toxic trigger in mushroom poisoning[J]. Nature Chemical Biology, 2009,5(7):465-467.

· 资讯 ·

印度发布豆类产品中甘草磷的最大残留限量

2019年5月6日,印度食品安全标准局(FSSAI)发布F.No.11771/FSSAI/imports/2018号文件,修订甘草磷在豆类产品中的最大残留限量。

根据印度相关法规,甘草磷在豆类产品中的最大残留限量为0.01 mg/kg。

(来源食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2019/05/517230.html>)