

调查研究

云南省文山州广南县吊浆粑食物中毒事件的病原学分析

周帼萍¹,梁泉¹,黄庭轩¹,杨祖顺²,许燕²,国译丹²,李洪春³,张练³

(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; 3. 云南省文山州疾病预防控制中心,云南 文山 663000)

摘要:目的 分析云南省文山州广南县一起吊浆粑食物中毒事件,鉴定引起中毒的致病因素。方法 在流行病学调查的基础上,对采集的4份食物样品参照GB/T 4789.29—2003进行微生物常规培养,对其中分离的疑似目标菌株进行VITEK 2 COMPACT生化鉴定和16S rRNA序列比对,并对样品进行动物中毒试验,采用液相色谱-质谱联用方法对样品中的米酵菌酸进行定量分析。结果 分离的3株食源性致病菌的16S rRNA序列比对和VITEK 2 COMPACT生化鉴定结果均为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*),均可产毒使小鼠死亡,且样品中米酵菌酸含量超标,产毒量最高达9.67 mg/kg。结论 该食物中毒事件是由唐菖蒲伯克霍尔德菌污染吊浆粑,产生大量米酵菌酸所致。从试验过程和结果分析,该菌株应为我国命名的椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*)。

关键词:吊浆粑;食物中毒;唐菖蒲伯克霍尔德菌;毒素;米酵菌酸;椰毒假单胞菌酵米面亚种;食源性致病菌;云南中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)01-0071-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.01.016

Etiology analysis of an outbreak caused by fermented corn flour in Guangnan County, Wenshan City, Yunnan Province

ZHOU Guo-ping¹, LIANG Quan¹, HUANG Ting-xuan¹, YANG Zu-shun²,
XU Yan², GUO Yi-dan², LI Hong-chun³, ZHANG Lian³

(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; 3. Wenshan Center of Disease Control and Prevention, Yunnan Wenshan 663000, China)

Abstract: **Objective** The objective of this research was to analyze and identify the pathogens of an outbreak caused by consumption of sweet dumplings made by fermented corn flour in Guangnan County. **Methods** On the basis of epidemiological investigation, microbiological culture and biochemical analysis was performed on four collected food samples by VITEK 2 COMPACT according to GB/T 4789.29-2003. The suspected isolates were performed 16S rRNA sequence analysis. And the toxin was analyzed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). **Results** Both sequence analysis and biochemical analysis showed that all the three isolates were *Burkholderia gladioli*. And its toxin, bongkrekic acids, were detected in all samples, the highest toxicity was 9.67 mg/kg. **Conclusion** *B. gladioli* was the pathogen of this outbreak caused by fermented corn flour. It was called as *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* in China. **Key words:** Fermented corn flour; food poisoning; *Burkholderia gladioli*; toxin; bongkrekic acid; *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*; foodborne pathogens; Yunnan

酵米面类食物中毒是迄今为止在我国发现的一种病死率极高的微生物类食物中毒。该中毒多发生于边远贫困地区,具有地域性特点,由于其中

毒发病急、难治愈、死亡率高,给消费者生命健康造成了严重危害。因此,开展酵米面类食物中毒的病原学分析,特别是明确该病原菌的分类地位和命名,对于预防此类公共卫生事件具有重要意义^[1]。

2014年6月21日云南省文山州广南县某居民户自制吊浆粑,当天食用后无不适,剩余吊浆粑在室内存放,分别在27日加工成汤圆油炸和煮食后供23名村民用餐。进食者为20人,其中一人食用5个汤圆,于20 min后出现了恶心和呕吐症状,潜伏

收稿日期:2016-11-04
基金项目:云南省卫生科技计划项目(2014NS351)
作者简介:周帼萍 女 教授 研究方向为微生物与食品安全
E-mail:wjczgp@163.com
通信作者:杨祖顺 男 副主任技师 研究方向为食品安全风险监测
E-mail:780187842@qq.com

期最长者食用了半个汤圆,于 38 h 后感觉恶心。食用者均中毒,无性别、年龄差异,主要临床表现为恶心(4/20)、呕吐(11/20)、头晕(5/20)、腹痛(6/20)、腹泻(1/20)、乏力(4/20)、意识模糊(1/20)、昏迷(6/20),重症病例表现出头晕、意识模糊、昏迷,伴全身多器官损伤,而未进食吊浆粑者和仅喝汤者无临床症状。给予催吐、保肝、解毒等治疗后,重症患者转入 ICU,并给予血浆置换、重要器官保护、抗感染等治疗。此次食物中毒事件死亡 6 人,死者分别为 5、43、84 岁男性和 18、43、50 岁女性,死亡诊断为多脏器功能衰竭。其他患者陆续出院,预后良好。引起食物中毒的吊浆粑制作流程为:玉米浸泡 15 d,期间 3~5 d 换一次水,之后进行碾碎、磨浆、吊滤,在太阳下晒干后常温存放。食用前揉捻成汤圆状,每个约重 10 g,油炸或水煮食用。事件发生后,云南省文山州疾病预防控制中心将从食用户家中采集的剩余吊浆粑(干粉)、生汤圆、熟汤圆以及制作户剩余的吊浆粑,共 4 份样品送至云南省疾病预防控制中心,实验室参照 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》^[2] 针对食源性致病菌进行菌株分离鉴定、毒素和米酵菌酸分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及样品

雄性小鼠,SPF 级,体质量 18~20 g,由昆明医学院实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(滇)2011-0004],饲料由昆明医学院实验动物中心提供[合格证号:SCXK(滇)2011-0005]。环境条件:温度 20~25 ℃,相对湿度 40%~70%。

在食用户和制作户家中共采集 4 份样品,吊浆粑干粉、生吊浆粑、生汤圆和煮熟的汤圆各一份,每份约 100 g,采集后 2~8 ℃ 冷藏储运,3 h 内运送到实验室开展检验。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 COMPACT 全自动细菌鉴定和药敏分析仪(法国梅里埃)、Cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad)、凝胶图像分析系统(英国 SYNGENE)、Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国安捷伦)、液质联用仪 AB3200 Q TRAP(美国 AB SCIEX)、Nanopure 纯水机、匀浆机、大容量高速离心机、旋转蒸发仪。

GVC 增菌液(椰毒假单胞菌酵米面亚种增菌用)、沙门菌志贺菌 SS 琼脂、卵黄琼脂平板、微量生化管均购自北京陆桥技术有限责任公司;进口 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂,英国 OXOID)、改良 PDA(进口

PDA 使用时加入 1/100 000 龙胆紫、20 μg/ml 氯霉素);Premix Taq、DL2000 DNA Marker 和核酸染料 Goldview 均购自日本 TaKaRa;VITEK 2 COMPACT GN 鉴定卡(法国梅里埃);琼脂糖(西班牙 Biowest);酵母面黄杆菌毒素标准品(B6179,美国 Sigma);PCR 引物合成和产物测序均由苏州金唯智科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 样品中食源性致病菌的检测

样品用 0.85% 生理盐水按 1:2 的比例稀释成浓悬液,用无菌接种环取一环悬液在 PDA 平板和改良 PDA 平板直接分离纯化,同时参照 GB/T 4789.29—2003^[2] 将样品用 GVC 增菌液增菌后,PDA 平板和改良 PDA 平板分离纯化和革兰染色。用微量生化管结合 VITEK 2 COMPACT 对分离株进行生化鉴定。

1.2.2 分离株的 16S rRNA 序列分析

LB 平板划线培养分离株,30 ℃ 培养 24 h。挑取单菌落,加入装有 50 μl 无菌去离子水的 PCR 管中,混匀,98 ℃ 裂解 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液即细菌 DNA,4 ℃ 保存备用。用 16S rRNA 通用引物 27-F(AGAGTTTATCCTGG CTCAG)和 1492-R(GGTTACCTTGTTACGACTT)进行 PCR 扩增。50 μl PCR 体系:Premix Taq 酶 25 μl,引物各 2 μl,DNA 模板 5 μl,无菌 MiliQ 水 16 μl。PCR 条件为:94 ℃ 裂解 5 min;94 ℃ 变性 50 s,54 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 90 s,循环 30 次;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物用 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。PCR 产物由苏州金唯智科技有限公司测序,结果经修正后提交 GenBank 并获得编号。用 MEGA6.0 软件采用邻近法基于 16S rRNA 序列进行聚类分析,构建进化树,经过 1 000 次数值分析 Bootstrap 为 1 000。

1.2.3 小鼠毒性试验

小鼠毒性试验参照 GB/T 4789.29—2003 方法进行^[2]。每份样品采用 3 只小鼠,每只取 0.5 ml 粗毒素进行灌胃,7 d 内观察受试动物反应和死亡情况。

1.2.4 米酵菌酸的定量分析

采用液相色谱-质谱联用快速检测技术,按照 GB/T 5009.189—2003《银耳中米酵菌酸的测定》^[3] 进行米酵菌酸定量分析检测,检测数值参照 GB 11675—2003《银耳卫生标准》^[4] 中理化指标判断结果。

2 结果

2.1 分离株形态特征

4 份样品除生汤圆外均分离出椰毒假单胞菌疑似菌株(YD-1、YD-2、YD-4),-70℃保藏并进行后续分析。3株菌均为革兰阴性短杆菌并具有一致的菌落特征:在PDA平板上(36±1)℃培养24h,菌落直径为1~1.5mm,灰白色,表面光滑、湿润,菌落边缘整齐,48h时菌落中心凸起,周围产黄绿色色素;在改良PDA平板上菌落为圆形,直径1~2mm,深紫色,微凸,表面光滑、湿润,菌落边缘整齐,易于挑取;在卵黄琼脂平板上的菌落表面光滑、湿润,(36±1)℃培养48h后周围形成乳白色混浊环,斜射呈虹彩现象;在SS琼脂平板上不生长。

2.2 生化鉴定

挑取PDA上36℃培养24h的少量纯菌,用微量生化管和GN鉴定卡进行生化鉴定,结果为动力+,氧化酶-,靛基质-,V.P.-,O/F试验(O型)+,葡萄糖-,果糖-,半乳糖-,阿拉伯糖-,甘露醇+,硝酸盐还原+,尿素-,侧金盏花醇-,柠檬酸盐利用+,精氨酸+,5℃和41℃均不生长。用VITEK 2 COMPACT

对3株菌进行系统生化鉴定,结果均为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*B. gladioli*)。

2.3 16S rRNA 序列分析结果

对伯克霍尔德属内90个种^[5]在Genbank数据库中进行16S rRNA序列比对,BLASTN的结果参见表1,分离的3株菌在1396bp长度范围内互相之间仅有一个bp的差异,在整个数据库中互相比对,其结果最为近似。用邻近法构建伯克霍尔德属进化树,虽然某些种的不同菌株在该进化树上位置有变动,但是YD-1、YD-2、YD-4的16S rRNA序列与唐菖蒲伯克霍尔德菌ATCC33664、OM1和PA11.1以及GenBank数据库中唯一登记为椰毒伯克霍尔德菌(*B. cocovenenans*)的LMG11626T在同一个进化分支上(见图1),该种与植物伯克霍尔德菌(*B. plantarii*)和范式伯克霍尔德菌(*B. vandii*)在进化上有明显差异。16S rRNA序列分析该3株菌均属于伯克霍尔德属,且与*B. gladioli*同源性最高。

表1 3株分离株的16S rRNA 序列分析

Table 1 16S rRNA sequence analysis of 3 strains isolated from the case

菌株名称	基因登录号	长度/bp	最高相似菌株	最高相似菌株的登录号	同源性	最相似菌株来源*
YD-1	KT944030.1	1396	YD-2	KT944031.1	99%(1395/1396)	同一案例分离株
YD-2	KT944031.1	1397	YD-1	KT944030.1	99%(1395/1396)	同一案例分离株
YD-4	KT944032.1	1399	YD-1	KT944030.1	99%(1395/1396)	同一案例分离株

注:*表示本案例中3个菌株16S rRNA除了互相匹配之外,都和*B. gladioli* OM1(EU678361)最为一致,该菌株由韩国研究者从平菇软腐病处分离到,并被命名为*B. gladioli* pv. *agaricicola*^[6]

2.4 小鼠毒性试验结果

4份样品均进行毒性试验,试验组小鼠20min后出现竖毛,躁动不安、行步蹒跚、瘫软、抽搐、呈角弓反张、呼吸急促等症状,2h之内全部死亡;对照组小鼠7d后仍然存活。

2.5 米酵菌酸定量分析结果

采用液相色谱-质谱联用快速检测技术对样品进行检测,4份样品中均检出米酵菌酸,其中吊浆粿干粉样品中含量为1.73mg/kg,已煮熟的汤圆样品中含量为3.08mg/kg,生汤圆样品中含量为5.07mg/kg,生吊浆粿样品中含量最高为9.67mg/kg。参考GB11675—2003^[4],米酵菌酸含量必须≤0.25mg/kg,而4份样品中米酵菌酸含量均远高于此标准。

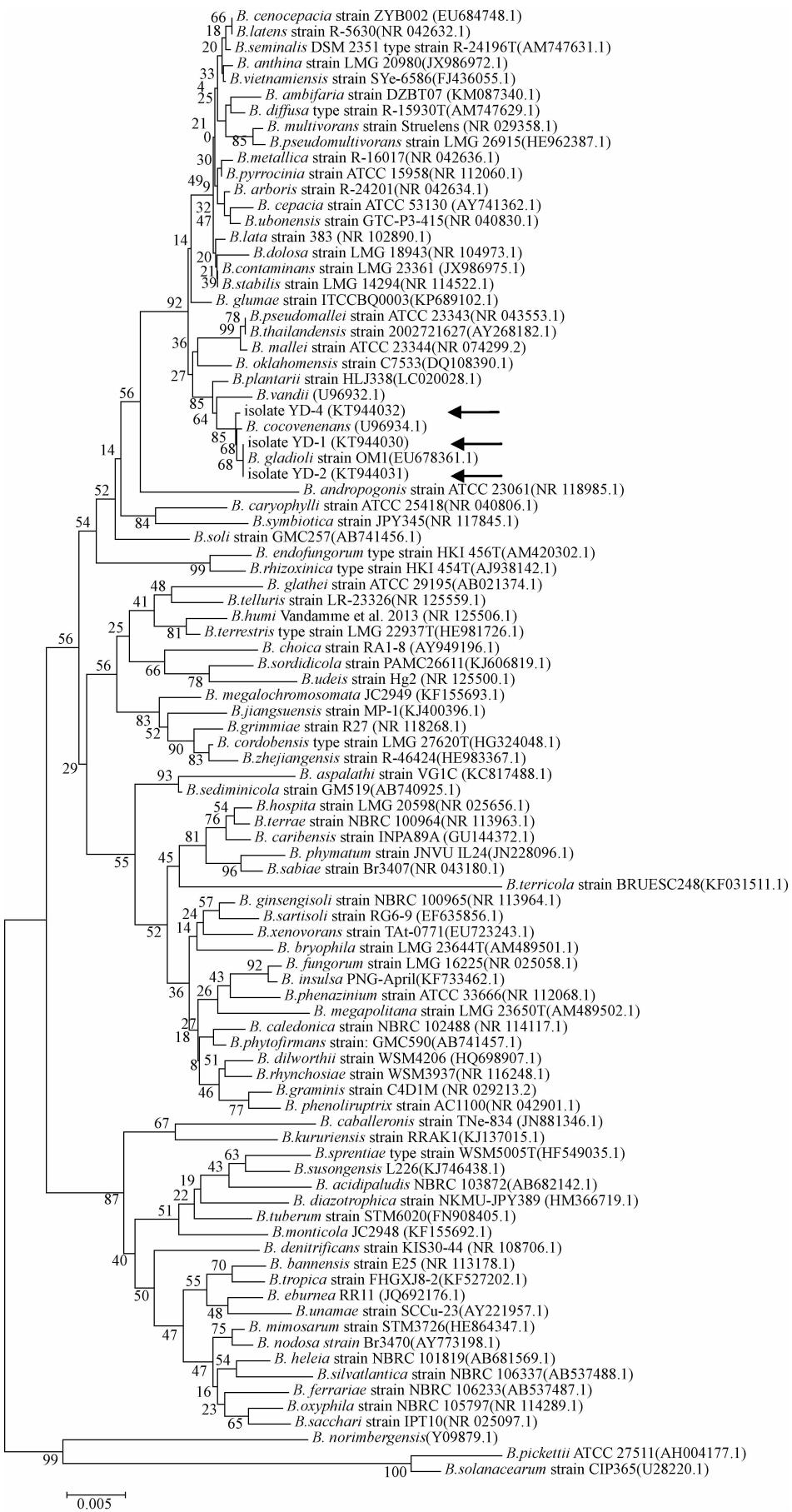
3 讨论

此次食物中毒事件中生汤圆样品未检出疑似菌株,但该样品的毒性试验符合米酵菌酸典型中毒症状,且米酵菌酸检出含量为5.07mg/kg,高于吊浆粿干粉和熟汤圆中米酵菌酸的含量,由于吊浆粿干粉、生吊浆粿和煮熟的汤圆中均检出*B. gladioli*,因此推测生汤圆中应存在疑似菌株,未检出的原因

主要可能是由于生汤圆样品中存有大量杂菌(初步判断为酵母菌),GVC增菌液对酵母菌的抑制作用较弱,干扰了目标菌的生长。

实验室分离到的3株菌生化结果与椰毒假单胞菌酵米面亚种在葡萄糖、果糖、半乳糖、阿拉伯糖和侧金盏花醇不同,可能与不同中毒事件菌株的特异性有关。经VITEK 2 COMPACT鉴定均为*B. gladioli*,且16S rRNA序列分析该3株菌与*B. gladioli*同源性最高。2013年云南省红河州曾发生过吊浆粿引起的食物中毒事件^[7],也是由*B. gladioli*引起,这两起事件共造成11人死亡,均给社会带来了极大影响,在经济上造成了重大损失,所以*B. gladioli*引起的食物中毒应引起有关部门的高度关注。

酵米面食物中毒事件在我国时有发生,国内文献曾多次报道其病原菌为椰毒假单胞菌酵米面亚种^[8-9],但在国外文献资料及目前进口微生物鉴定设备数据库中均查不到此菌种名称。关于该菌的命名,很多学者认为应将其归类到伯克霍尔德菌属。焦振泉等^[10-12]对我国椰毒假单胞菌酵米面亚种分离株与伯克霍尔德菌属进行同源性研究,认为“椰毒假单胞菌应该属于伯克霍尔德菌属,且与



注: 图下标尺表示遗传距离; 箭头表示分离株所在位置

图 1 伯克霍尔德菌属的 16S rRNA 基因序列系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequence of *Burkholderia*

B. gladioli 和 *B. cocovenenans* 特别近源”,建议依据国际细菌系统发育委员会的原则,将引起食物中毒的椰毒假单胞菌酵米面亚种归入 *B. gladioli*,命名为 *B. gladioli* pv. *cocovenenans*,以便和其他植物病原菌株区分^[13]。2012 年德国研究者 Nadine 等^[14]对印尼食物中毒事件中的 *B. gladioli* 分离株进行了全基因组测序(草图)分析,德国菌种保藏中心已将分离自印尼有毒椰子发酵食品的 *B. cocovenenans* DSM11318 标准株,更名为 *B. gladioli*^[15]。云南近几年发生的两次酵米面中毒事件,从流行病学调查和实验室检测结果来看,与国内其他椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒比较符合,可能是国内与国际上命名不一致,用 VITEK 微生物鉴定仪鉴定结果为 *B. gladioli*。因此,发生酵米面类食物中毒事件的检验过程中,检测人员应特别重视,以免造成漏检、误检。同时,我国学者也应尽快明确其分类地位,及时对国家标准进行修订,在命名上与国际接轨。

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. 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[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009. 189—2003 银耳中米酵菌酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[4] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 11675—2003 银耳卫生标准[S]. 北京:中国标准出版

社,2003.

[5] Euzéby J P. List of bacterial names with standing in nomenclature;a folder available on the internet[J]. Int J Syst Bacterio, 1997,47(2):590-592.

[6] Lee C J,Yun H S,Jhune C S,et al. Occurrence of bacterial soft rot of *Pleurotus ostreatus* caused by *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* in Korea[J]. Journal of Plant Pathology,2010,92(1):235-240.

[7] 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.

[8] 刘志涛,万蓉,胡太芬,等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查分析[J]. 职业与健康,2013,29(5):582-583.

[9] 王静,刘秀梅. 椰毒假单胞菌酵米面亚种及米酵菌酸的研究进展(综述)[J]. 中国食品卫生杂志,1996,8(2):43-46.

[10] 焦振泉. 椰毒假单胞菌酵米面亚种系统分类学研究[D]. 北京:中国预防医学科学院,中国疾病预防控制中心,1999.

[11] 焦振泉,曹玮,余东敏,等. 椰酵假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德菌 16S ~ 23S rRNA 基因间区序列的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志,2008,20(3):197-203.

[12] 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.

[13] JIAO Z Q,Kawamura Y N,YANG R F, et al. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an emended description of *B. gladioli* [J]. Microbiology and Immunology,2003,47(12):915-925.

[14] Nadine M,Claudia R,Kirstin S,et al. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*[J]. Chemistry and Biology,2012,19(9):1164-1174.

[15] German: German collection of microorganisms and cell cultures [EB/OL]. (2017-01-11) [2017-01-16]. <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-8361>. html? tx _ dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304.

· 资讯 ·

阿根廷发布葡萄酒中禁用着色物质及检测方法

2017 年 1 月 20 日,阿根廷发布 G/TBT/N/ARG/315 通报,发布葡萄酒中禁用着色物质及检测方法,采用高效液相色谱(HPLC)和紫外分光光度法检测方法,判定葡萄酒是否使用禁用着色物质。当葡萄酒中检出禁用色素后,将被判定为掺假食品。

(摘自食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2017/01/414884.html>)