

的肠炎沙门菌表现出不同的耐药谱,说明同一克隆系的肠炎沙门菌株在龙岩当地已经形成了不同的耐药谱,提示应加强沙门菌耐药株的监控,临床应加强对抗生素使用的科学管理,尽可能在应用抗生素前,通过调查发病前的饮食史,患者症状及病原学诊断,结合药敏结果合理使用抗生素,避免经验用药,减少耐药株的产生。

(志谢 本文 PFGE 实验检测与分析得到福建省疾病预防控制中心细菌科的指导和帮助,特此表示感谢)

## 参考文献

- [ 1 ] Hedican E, Miller B, Ziemer B, et al. *Salmonellas* is outbreak due to chicken contact laeding to a foodborne outbreak associated with infected delicatessen workers [ J ]. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, 7 ( 8 ): 995-997.
- [ 2 ] Schneider J L, White P L, Weiss J. Multistate outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Newport infections associated with ground beef, October to December 2007 [ J ]. *J Food Prot*, 2011, 74 ( 8 ): 1315-1319.
- [ 3 ] 张代涛, 阚颀. 沙门菌属分子分型技术研究进展 [ J ]. 中国人

兽共患病学报, 2009, 25 ( 5 ): 465-468.

- [ 4 ] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门菌检验 [ S ]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [ 5 ] Humphrey T J, Baskerville A, Mawer S, et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected eggs [ J ]. *Epidemiol Infect*, 1989, 103 ( 3 ): 415-423.
- [ 6 ] 佐藤静夫. 鸡肠炎沙门氏菌感染症及防制效果 [ J ]. 中国家禽, 1996 ( 8 ): 39-40.
- [ 7 ] Thong K L, Ngeow Y F, Altwegg M, et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping [ J ]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33 ( 5 ): 1070-1074.
- [ 8 ] Landeras E, Gonzalez-Hevia M A, Alzugaray R, et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping [ J ]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34 ( 9 ): 2294-2296.
- [ 9 ] 杨晋川, 夏杨, 郭惠, 等. 一起由肠炎沙门菌所致食源性疾病暴发疫情的病原学研究 [ J ]. 中华预防医学杂志, 2013, 47 ( 2 ): 160-163.
- [ 10 ] 丁水军, 陈棋炯, 孙永祥, 等. 食物中毒肠炎沙门菌的生物学特性及分子分型研究 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20 ( 6 ): 1326-1328.

## 研究报告

# 椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒的病原分离鉴定

李晓琍, 杨祖顺, 国译丹, 周慧新, 范璐, 李璜  
(云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022)

**摘要:**目的 通过对食物中毒病原菌的分离鉴定, 为查明中毒原因提供科学依据。方法 分离鉴定和毒性试验按照国家标准方法 WS/T 12—1996《椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒诊断标准及处理原则》和 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》进行。米酵菌酸检测按照 GB/T 11675—2003《银耳卫生标准》执行, 采用液相色谱-质谱联用法对样品开展检测。结果 经 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和基因指纹鉴定仪进行鉴定, 4 份样品中 3 份鉴定结果为唐菖蒲伯克霍尔德菌, 小鼠毒性试验阳性。4 份样品均检测出米酵菌酸。结论 本次食物中毒源于食源性椰毒假单胞菌酵米面亚种污染。

**关键词:** 椰毒假单胞菌酵米面亚种; 食物中毒; 鉴定; 米酵菌酸; 食源性致病菌; 云南

中图分类号: R155; Q93-3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0036-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.008

## Isolation and identification of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino fermentans* from food poisoning accident

LI Xiao-li, YANG Zu-shun, GUO Yi-dan, ZHOU Hui-xin, FAN Lu, LI Ying  
(Yunnan Center of Disease Control and Prevention, Kunming Yunnan 650022, China)

**Abstract: Objective** To investigate the pathogen of a food poisoning accident and provide scientific evidence to identify

收稿日期: 2015-09-18

基金项目: 云南省卫生科技计划项目 (2014NS351)

作者简介: 李晓琍 女 主任技师 研究方向为卫生微生物 E-mail: 840700051@qq.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

the cause. **Methods** Isolation, identification and toxicological assessment of toxic agents were carried out according to the national standard GB/T 4789.29-2003, bongkreki acid was detected by liquid-plasma chromatography techniques according to GB/T 11675-2003. **Results** By VITEK 2 COMPACTR and Ribo-Printer microbial characterization system, *Burkholderia gladioli* was identified in 3 of 4 food samples, but all of the 4 food samples were confirmed to be contaminated by *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino*. A positive toxicological result was found in mice acute oral toxicity test. **Conclusion** The food poisoning accident was associated with ingestion of foods contaminated by *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino*.

**Key words:** *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino fermentans*; food poisoning; identification; bongkreki acid; food-borne pathogenic bacteria; Yunnan

椰毒假单胞菌酵米面亚种(以下简称椰酵假单胞菌)食物中毒,是我国发现的一种病死率很高的细菌性食物中毒,病死率高达 68% ~ 89%,死亡人数占食物中毒死亡总人数的 23% 以上<sup>[1]</sup>。

由椰酵假单胞菌引起的食物中毒流行区域广,我国已有 16 个省陆续发现了由椰酵假单胞菌引起的中毒。引起此类中毒的食品种类繁多,大致可分为 3 大类,即谷类发酵制品(发酵玉米面、糯玉米汤圆粉、玉米淀粉、发酵糯小米、醋凉粉等),变质银耳及薯类制品(马铃薯粉条、甘薯淀粉、山芋淀粉等)<sup>[2]</sup>。由椰酵假单胞菌引起的食物中毒在云南也偶有发生,发生地多为偏远、经济相对落后的地方,以受污染的糯米汤圆粉及吊浆面为主。

引起食物中毒的食品,一般是在生产加工、贮存运输、销售等过程中被污染的。在污染的微生物中,致病性微生物一般数量相对较少,却有大量的非致病性微生物污染,两者之间比例悬殊。有时在分离过程中,食物样品分离不到病原菌,可能是被大量的非致病菌所掩盖。这不仅关系到流行病学调查中病因的查找和确定,也关系到合理的医疗处置和治疗。因此,必须根据实际情况,选择合适的增菌液和培养基,提高致病菌的检出率,同时在检验过程中,不能仅仅重视病原菌的检出,也要重视优势菌的检出<sup>[3]</sup>。

2014 年 7 月 5 日,云南省文山市广南县八宝镇某村发生一起食物中毒事件,中毒人数 20 人,死亡 6 人,中毒食物为汤圆。中毒者发病急,出现上腹部不适、恶心、呕吐、头痛、头晕、全身无力、意识不清、抽搐、昏迷等症状或体征,疑为椰酵假单胞菌食物中毒。

本实验室采集中毒者进食食物样品 4 份,按照 WS/T 12—1996《椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒诊断标准及处理原则》<sup>[4]</sup>和 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》<sup>[5]</sup>制定了快速检测方案,采用全自动微生物生化鉴定和基因指纹鉴定等快速检测技

术,对样品开展椰酵假单胞菌的分离及米酵菌酸毒素检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

试验选取吊浆面、已煮过的汤圆、未煮汤圆、生吊浆粑各一份。

#### 1.1.2 实验动物

健康昆明小白鼠 12 只,普通级,体质量 20 g 左右[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,动物饲养环境条件:温度 20 ~ 24 ℃,相对湿度 46% ~ 58%。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

VITEK2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪(法国梅里埃)、基因指纹鉴定仪(美国杜邦)、1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent)、生化培养箱。

SS 琼脂平板、卵黄琼脂平板、GVC 增菌液均购自北京陆桥技术公司,PDA 半固体琼脂、PDA 平板均购自英国 Oxoid[PDA 平板分为 2 种:第一种为直接配制,不添加龙胆紫和氯霉素水溶液;第 2 种在 PDA 中添加龙胆紫(1:100 000, V/V)和氯霉素水溶液(终浓度为 20 μg/ml)]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分离鉴定方法

按照 GB/T 4789.29—2003 中规定的方法进行增菌、平板分纯,用 VITEK 2COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和基因指纹鉴定仪进行鉴定。

#### 1.2.2 小鼠毒性试验和米酵菌酸测定

小鼠毒性试验按照 GB/T 4789.29—2003 中规定的方法进行,每份样品采用小白鼠 3 只,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。

米酵菌酸检测按照 GB/T 11675—2003《银耳卫生标准》<sup>[6]</sup>执行,采用液相色谱-质谱联用法对样品开展米酵菌酸毒素检测。

### 1.2.3 仪器条件

色谱条件: Waters BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为水(0.1% 甲酸)、B 为甲醇, 流动相比率 A:B = 3:7, 等梯度洗脱 3 min, 流速 300 μl/min, 进样量 20 μl, 柱温 30 °C。

质谱条件: 离子化方式为电喷雾离子源(ESI) 负离子模式, 检测方式为多离子反应监测(MRM); 碰撞气(CAD) Midium, 气帘气(CUR) 172.375 kPa, 雾化器(GS1) 310.275 kPa, 加热气(GS2) 379.225 kPa, 喷雾电压(IS) - 4 500 V, 去溶剂温度(TEM) 400 °C, 扫描时间 20 ms, 米酵菌酸保留时间 0.60 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离鉴定结果

4 份样品中, 3 份样品(吊浆面、已煮过的汤圆、生吊浆粩)在 PDA 分离平板上有少量(每皿大约 8 ~ 15 个)可疑目标菌生长, 培养 24 h 后, 平板上形成的菌落大小约 1 ~ 1.5 mm, 呈灰白色、湿润、表面光滑、边缘整齐。培养 48 h 后, 中心有凸起, 菌落周围有黄绿色色素, 具有典型椰酵假单胞菌的菌落特征。挑取 PDA 平板上可疑单个菌落, 点种卵黄琼脂平板及 SS 琼脂平板。在卵黄琼脂平板上, 可见形成表面光滑及湿润的菌落。置 36 °C 温箱内培养 48 h 后, 菌落周围形成乳白色混浊环, 对日光斜视可见环表面呈明显虹彩现象; SS 琼脂平板上无菌生长。

取 PDA 斜面上的菌苔做相关生化试验, 结果为动力 +、氧化酶-、淀粉-、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 + (+ 表示阳性结果, - 表示阴性结果), 5 和 41 °C 温度下不生长。用 VITEK2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和基因指纹鉴定仪鉴定, 3 份样品结果均为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*), 因无相应血清所以未做血清学分型。除目标菌外, PDA 平板上还有大量杂菌生长, 杂菌是优势菌, 杂菌经染色镜检和鉴定大多为酵母菌。1 份样品[未煮汤圆(湿)]未分离出椰酵假单胞菌。

### 2.2 动物急性毒性检测

4 份样品, 每份样品采用 3 只小白鼠, 每只小白鼠取 0.5 ml 粗毒素灌胃, 小鼠主要出现竖毛、躁动不安、步履蹒跚、肢体麻痹、抽搐、瘫软、呈角弓反张状、呼吸急促等症或体征, 在 2 h 内全部死亡。

### 2.3 米酵菌酸测定

采用液相色谱-质谱联用法对样品开展米酵菌酸

毒素检测, 从送检 4 份样品中均检出了米酵菌酸。吊浆面米酵菌酸的含量为 1.73 mg/kg, 已煮过的汤圆含量为 3.08 mg/kg; 生吊浆粩含量为 9.67 mg/kg, 含量为 4 份样品中最高的; 未煮汤圆虽未分离到活菌, 但仍检测到米酵菌酸, 含量为 5.07 mg/kg。

## 3 讨论

1977 年在东北酵米面中毒食品中发现椰酵假单胞菌<sup>[7]</sup>。现已证明该菌主要产生 2 种毒素, 即米酵菌酸和毒黄素, 前者是引起食物中毒和死亡的主要毒性代谢产物<sup>[2]</sup>。

在食物中毒病原菌分离鉴定过程中, 增菌与分离培养是关键环节。椰酵假单胞菌的 GVC 增菌液是添加了龙胆紫和氯霉素水溶液的马铃薯葡萄糖水(PD), 其原理是利用龙胆紫能抑制革兰阳性菌和氯霉素能抑制革兰阴性菌而不抑制椰酵假单胞菌的特性<sup>[8]</sup>。但在本次食物中毒实验室分析中, 除了椰酵假单胞菌, 其他革兰阳性菌及革兰阴性菌很少, 优势菌是酵母菌, 酵母菌属于真菌, 而椰酵假单胞菌在微生物分类学上属细菌, 但培养特性接近真菌<sup>[9]</sup>, 这就解释了出现 GVC 增菌液中的龙胆紫和氯霉素没能抑制酵母菌, 经过 GVC 增菌液增菌以后酵母菌大量繁殖, 在 PDA 平板上杂菌的数量多, 目标菌的数量少的现象。

本次试验中, 利用 VITEK2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和基因指纹鉴定仪鉴定, 其结果为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*B. gladioli*)。Gillis 等<sup>[10]</sup>将椰酵假单胞菌化归为伯克霍尔德菌属, 命名为椰毒伯克霍尔德菌(*B. cocovenenans*), Coenve 等<sup>[11]</sup>将椰毒伯克霍尔德菌划为唐菖蒲伯克霍尔德菌。唐菖蒲伯克霍尔德菌是伯克霍尔德菌属中的一个种, 它包含 3 个不同的致病型: *B. gladioli* pathovar *gladioli*、*B. gladioli* pathovar *alliicola*、*B. gladioli* pathovar *agaricola*。1999 年焦振泉等研究发现, 椰酵假单胞菌和唐菖蒲伯克霍尔德菌致病型菌株的典型株在生化特征上差异很小, 在比较椰酵假单胞菌 16S rRNA 基因序列后, 根据细菌的系统分类将其划归为唐菖蒲伯克霍尔德菌的一个病原型<sup>[12-13]</sup>, 2003 年 JIAO 等<sup>[14]</sup>建议将椰毒伯克霍尔德菌列为唐菖蒲伯克霍尔德菌的第 4 个致病型, 即 *B. gladioli* pathovar *cocovenenans*。2008 年焦振泉等<sup>[15]</sup>建议划分椰酵假单胞菌米酵菌酸产毒株及不产毒株为唐菖蒲伯克霍尔德菌的生物变种(一个或几个)或新的生物型。2005 年杜春明等<sup>[16]</sup>则通过对唐菖蒲伯克霍尔德菌中不同致病型菌株的菌体脂肪酸成分的测定和分析, 发现它们的脂肪酸成分上基本一致, 又进一步证实了

原来的唐菖蒲伯克霍尔德菌、椰毒假单胞菌和椰毒假单胞菌酵米面亚种应该合并为一个菌种。以上的研究分析不同菌株基因水平的差别,并阐述其系统发育关系,说明椰毒假单胞菌和唐菖蒲伯克霍尔德菌致病型菌株的典型株在生化特征上差异很小,支持了椰毒假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德菌更为近缘这一结论。本研究中病原菌经全自动微生物生化鉴定仪和基因指纹鉴定仪鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌,试验结果跟上述研究报告一致,椰毒假单胞菌即唐菖蒲伯克霍尔德菌。

值得一提的是,4份样品中,3份样品[吊浆面、已煮过的汤圆、生吊浆粿(干)]分离出椰毒假单胞菌;未煮汤圆(湿)未分离出椰毒假单胞菌。出现生面未检出,已煮过的汤圆检出的情况可能原因是煮过的汤圆加热不彻底(夹开汤圆,面中间明显有生的部分),而内部的椰毒假单胞菌未能被杀死,但酵母菌的总数量反而因加热减少了,对椰毒假单胞菌造成的抑制和影响作用有限,而放置了几天的未煮汤圆(湿)中酵母菌大量繁殖,掩盖和抑制了椰毒假单胞菌的生长和分离,出现已煮过的汤圆中分离到病原菌而在未煮的汤圆中反而未分离到病原菌的现象。

细菌性食物中毒大多是由蛋白质毒素引起,而椰毒假单胞菌有别于其他菌的明显特点是产生脂肪酸性质的外毒素——米酵菌酸。米酵菌酸是由细菌产生的小分子毒素,其化学本质是多不饱和脂肪二酸衍生物<sup>[17]</sup>。采用液相色谱-质谱联用法从4份样品中均检测出米酵菌酸。结合小鼠毒性试验结果和菌落分离及鉴定结果可以认为本次食物中毒就是由椰毒假单胞菌引起的。

近年来,由椰毒假单胞菌产生的毒素所引起的食物中毒偶有发生,其致病力强,死亡率高,给消费者的健康带来很大危害。我国东北地区发生此种细菌食物中毒,多为食用发酵玉米面制品而引发的,山东、河南发生过变质鲜银耳中毒,此次云南食物中毒事件就是由于食用了被污染又未熟透的汤圆,说明中毒的发生与中毒者的饮食习惯以及食品加工方式有关。预防椰毒假单胞菌食物中毒的发生应注意:不用霉变的玉米、糯米等制备酵米面,浸泡米面时勤换水,保持卫生,储存放置地点要通风防潮。在食物的储存、加工等环节注意防止污染,以预防中毒的发生。

## 参考文献

- [1] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:765.
- [2] 刘秀梅. 我国椰毒假单胞菌食物中毒流行趋势浅析[J]. 中华预防医学杂志 1996,30(6):372.
- [3] 金莞尔. 影响细菌性食物中毒实验室诊断的因素探讨[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(1):113.
- [4] 中华人民共和国卫生部. WS/T 12—1996 椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒诊断标准及处理原则[S]. 北京:中国标准出版社,1996.
- [5] 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.
- [6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 11675—2003 银耳卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [7] 孟昭赫,苏翠华,李兆普,等. 酵米面黄杆菌与椰毒假单胞菌的对比研究[J]. 卫生研究,1987,16(6):17.
- [9] 郭铃. 椰毒假单胞菌食物中毒实验室检测[J]. 现代预防医学,2007,34(6):1145.
- [10] Gillis M, Tran V V, Bardin R, et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for *N. fixing* isolates from rice in Vietnam[J]. *Inter J Syst Bacteriol*, 1995,45(2):274-289.
- [11] Coenye T, Holmes B, Kersters K, et al. *Burkholderia cocovenans* (van Damme, et al. 1960) Gillis et al. 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et al. 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini. 1913) Yabuuchi et al. 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami, et al. 1987) Urakami et al. 1994, respectively[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1999,49(1):37-42.
- [12] 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,1999.
- [13] 焦振泉,刘秀梅. 椰毒假单胞菌酵米面亚种的16S rDNA序列的测定和分析[J]. 卫生研究,1999,28(4):232-235.
- [14] JIAO Z Q, Yoshiaki K, LIU X 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]. *Microbiol Immunol*, 2003,47(12):486-492.
- [15] 焦振泉,曹玮,余东敏,等. 椰毒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.
- [16] 杜春明,焦振泉,郭云昌,等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌菌体脂肪酸成分测定与分析[J]. 卫生研究,2005,34(5):616.
- [17] 陈卫真,周方,孟昭赫,等. 椰毒假单胞菌毒素——米酵菌酸形成机理的探讨[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,1991,11(3):151.