

从食物中毒患者标本中分离鉴定海藻和腐败施万菌

汪永禄 王多春 詹圣伟 郑锦绣 刘燕 陶勇 石志峰 郝民 于礼 阙斌

【摘要】目的 对两起食物中毒调查中分离到的施万菌属(*Shewanella* spp.)菌株进行生化和分子生物学鉴定。**方法** 对2007年9月29日至10月3日间,马鞍山市的两起食物中毒患者的肛拭、从业人员手拭和剩余食物标本进行采集,按照国标方法(GB/T 4789),对所有标本进行增菌和选择性培养基分离培养,疑似菌落用VITEK-32和API20E系统鉴定,用辅助生化、生长、溶血和药敏实验分析菌株特性,同时扩增16S rDNA并测序,用MEGA 4.0软件建立进化树并进行分群。**结果** 所有标本经增菌后接种选择性培养基,共有8份标本在TCBS和BP培养基上长出单一的菌落,在三糖铁琼脂(TSI)斜面上的主要生长特征为:产硫化氢、不产气,氧化酶阳性。8株菌经VITEK-32鉴定仪鉴定为海藻施万菌(*S.algae*)或腐败施万菌(*S.putrefaciens*),经API20E系统鉴定为腐败施万菌。在WS、SS和EMB培养基均未检测到施万菌生长。比较施万菌的16S rDNA序列表明,其中7株为海藻施万菌,1株为腐败施万菌。没有从这8份标本中检测到其他肠道病原菌,包括霍乱弧菌、沙门菌、副溶血性弧菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌。**结论** 从食物中毒患者中分离到施万菌,为该菌作为可能的食物中毒病原菌提供了线索。

【关键词】 食物中毒;施万菌属;分离;鉴定

Isolation and characterization of *Shewanella* spp. from patients of food poisoning WANG Yong-lu, WANG Duo-chun, ZHAN Sheng-wei, ZHENG Jin-xiu, LIU Yan, TAO Yong, SHI Zhi-feng, HAO Min, YU Li, KAN Biao. Ma' anshan Center for Disease Control and Prevention, Ma' anshan 243000, China

Corresponding author: ZHAN Sheng-wei, Email: zhanshengwei@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To identify the isolates of *Shewanella* spp. from specimens of food poisoning based on biological and biochemical analysis. **Methods** Strains were obtained from the investigation on two food poisoning episodes in September and October, 2007 in Ma' anshan city, Anhui province. In accordance with the national standard protocol (GB/T 4789), all specimens were enriched and isolated on selective medium, and the suspected strains were identified by the VITEK-32 and API20E systems. For *Shewanella* spp. identified by the biochemical system, more characteristics were analyzed using auxiliary biochemical, growth, hemolytic and drug-resistance tests. DNAs of *Shewanella* spp. were extracted, 16S rDNA was PCR amplified and sequenced with universal 16S rDNA primers. Phylogenetic tree was constructed with MEGA 4.0. **Results** After enrichment, all specimens were inoculated to selective medium and *Shewanella* spp. strains were isolated from 8 samples with single colony on both TCBS and BP media. The characteristics of growth in the Triple Sugar Iron (TSI) agar appeared to have had hydrogen sulfide production but no gas production or positive oxidase. No *Shewanella* spp. strain was detected in WS, SS and EMB media. The 8 strains were identified as *Shewanella algae* (*S.algae*) or *Shewanella putrefaciens* (*S.putrefaciens*) by VITEK-32, as *S.putrefaciens* by API20E system. No other enteropathogenic bacteria, including *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Proteus vulgaris* or *Staphylococcus aureus*, were detected from those 8 samples. From 16S rDNA phylogenetic trees, 7 out of 8 *Shewanella* spp. were identified as *S.algae*, 1 as *S.putrefaciens*. **Conclusion** Strains of *Shewanella* spp. were isolated from samples of the food poisoning episodes, providing a possible clue to investigate the role of *Shewanella* spp. on food poisoning

【Key words】 Food poisoning; *Shewanella* spp.; Isolate; Characterization

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.08.018

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划(2006AA02Z425);国家自然科学基金(30872260);国家“十一五”科技重大专项(2008ZX10004-012)

作者单位:243000 安徽省马鞍山市疾病预防控制中心(汪永禄、詹圣伟、郑锦绣、刘燕、陶勇、石志峰);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(王多春、郝民、于礼、阙斌)

汪永禄与王多春同为第一作者

通信作者:詹圣伟, Email: zhanshengwei@sina.com.cn

施万菌属(*Shewanella* spp.)有 30 多个种,分布于世界各地,常见于海水和淡水环境中。由于多数为嗜冷菌而不为临床微生物学家关注。与临床有关的种只有海藻施万菌(*S. algae*)和腐败施万菌(*S. putrefaciens*)^[1],目前 80% 的临床分离菌是海藻施万菌,常见的海藻施万菌感染包括耳部和软组织的感染^[2,3],比较严重的感染有菌血症、脑膜炎和心内膜炎^[4]。施万菌属引起感染的流行病学和临床症状与气单胞菌和其他海生嗜盐弧菌相似^[5]。但目前未见从聚餐性食物中毒的腹泻患者中分离到施万菌属的报道。本研究从 2 起临床诊断为类似河豚毒素中毒的患者肛拭、饭店厨师手涂抹、食品工具涂抹和剩余食物标本中分离到 8 株施万菌,并通过生化、特殊生长状况和 16S rDNA 序列分析证明其中的 7 株是海藻施万菌,1 株为腐败施万菌。食物中毒患者中施万菌的分离和鉴定,为施万菌属与食物中毒建立联系,也为进一步研究施万菌属作为一种可能的食物中毒病原菌提供了线索和依据。

材料与方 法

1. 标本的采集:收集 2007 年 9 月 29 日和 10 月 3 日发生在马鞍山市的两起由聚餐导致的食物中毒患者(临床诊断)肛拭、饭店厨师手涂抹、食品工具涂抹和剩余食物等标本。其中用无菌镊子夹取剩余食物放入无菌广口瓶内封盖。其他标本用无菌生理盐水溶解,所有标本在采集 3 h 内送至实验室进行检测。

2. 增菌和培养:食物标本用无菌方式分别取 25 g,剪碎以 225 ml 生理盐水研磨。所有标本进行增菌液的增菌,包括氯化镁孔雀绿(MM)增菌液、GN 增菌液、7.5%氯化钠肉汤;牛肉膏和氯化钠结晶紫增菌液,除结晶紫外,其他成分加好加热溶解。约加 30%氢氧化钾溶液 4.5 ml,校正 pH 值。加热煮沸,过滤。再加入结晶紫溶液,混合后分装试管,在 37℃(MM 在 42℃)增菌 24 h,然后分别取一接种环增菌液接种 WS 培养基、SS 培养基、EMB 培养基、BP 培养基和 TCBS 培养基,置 37℃培养 18~24 h。增菌和培养试剂分别为杭州微生物试剂有限公司和北京陆桥技术有限责任公司产品,均在有效期内。

3. 分离和生化鉴定:所有培养基上挑可疑菌落(霍乱弧菌、变形杆菌、沙门菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌)转种三糖铁琼脂(TSI)斜面 37℃培养 24 h,菌株经革兰染色和氧化酶实验后,分别使用 VITEK-32 细菌鉴定仪和 API20E 生化鉴定系统(法国梅里埃)做生化鉴定,按厂家说明书操作。

4. 辅助生化、生长和溶血实验:从 TSI 取一接种环菌做如下实验。①氧化酶实验(试剂为法国梅里埃公司产品);②耐盐量生长实验在 LB 中加入不同含量的 NaCl,37℃培养 18 h 后观察其生长现象;③耐热生长实验将含 LB 的玻璃试管置不同温度的水浴中 30 min,然后置 37℃培养 18 h 后观察其生长现象;④溶血和黏液状菌落形成实验按文献[5],在绵羊红细胞培养基上接种单菌落,置 42℃培养 72 h 后观察溶血和黏液状菌落形成现象。

5. 16S rDNA 基因的 PCR:DNA 的制备使用细菌基因组提取试剂盒(Tengen 公司),按试剂盒说明书操作。施万菌属 16S rDNA 的扩增采用肠杆菌科 16S rDNA 通用引物。16S rDNA-F:5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 16S rDNA-R:5' -ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3',引物在大肠埃希菌 K12 的 16S rDNA 中的位置是 8~1523 nt,扩增长度约 1515 bp;16S rDNA-F 由上海生物工程公司合成。序列的扩增在 PCT-100 型扩增仪(美国 MJ 公司)上进行,采用 50 μl PCR 反应体系,其中包括模板 DNA 2 μl、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、上下游引物各 0.5 μmol 和 1.25 U Taq DNA 酶。PCR 反应条件如下:预变性 94℃ 10 min;循环 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 1.5 min,共 30 个循环;最后延伸 72℃ 10 min。取 5 μl PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳检测 PCR 产物的特异性。PCR 和电泳使用的组分购自宝生物工程有限公司(大连),PCR 产物送宝生物工程有限公司(大连)测序。

6. 16S rDNA 进化树的建立与序列分析:将测序的分离菌株 16S rDNA 序列,与 GenBank 中的施万菌属菌种水平的代表性 16S rDNA 序列一起,用 MEGA 4.0 软件中的 ClustalW 程序进行多序列排列,选择默认参数,用 Neighbor-Joining 法建立序列进化发生树,用 Bootstrap 法生成 500 个重复序列组,采用 DNAPARS(最大简约性法)生成众多进化树,并用 Consense 程序检验和优选进化树。

7. 抗生素耐药实验:按 WHO 推荐的 CLSI 标准,采用琼脂稀释法,制备含相应抗生素系列稀释梯度的 MH 琼脂平板。调节待测菌悬液浊度至 0.5 麦氏标准,按 1:10 稀释,以多点接种器吸取制备好菌液(约 1~2 μl)接种于 MH 琼脂平板表面,每点菌数约为 10⁴ CFU,形成直径为 5~8 mm 的菌斑。接种好后置 37℃孵育 16~20 h,观察结果。抗生素包括氨苄西林、头孢噻吩、庆大霉素、卡那霉素、四环素、诺氟沙星、氯霉素、红霉素和多粘菌素 B。结果判断以

抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。药敏质控菌株为 *E.coli* ATCC®25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC®29213。

结 果

1. 分离和培养:所有标本经增菌后接种选择性培养基,共有 8 份标本分离到施万菌。其中 2007 年 9 月 29 日为 6 份,分别是从业人员手拭标本(MAS2723)、刀涂抹标本(MAS2729)各 1 份和 4 份患者肛拭标本(MAS2736、MAS2737、MAS2740、MAS2741);10 月 3 日有 2 份,即从业人员手拭标本(MAS2758)和卤牛肉标本(MAS2762)各 1 份。这 8 份标本在 TCBS 和 BP 培养基上均可见单一的菌落,在 TCBS 培养基上的特征:菌落中等大小、光滑、凸起、圆形、边缘无色、中间黑色。在 BP 培养基上的生长特征:菌落 1~2 mm、凸起、无晕、灰黑色、圆形、较丰满。在 TSI 斜面上的生长特征:底层为黑色、产硫化氢、不产气、斜面产碱为红色。氧化酶实验为阳性。

2. 生化鉴定:经 VITEK-32 细菌鉴定仪鉴定, MAS2723 为 *Shewanella algae/putrefaciens* (90% 概率),其余 7 株为 *Shewanella algae/putrefaciens* (99% 概率)。这 8 份标本在 WS 培养基、SS 培养基和 EMB 培养基均未见单个可疑菌落生长,没有分离和鉴定到常见的肠道病原菌,包括霍乱弧菌、沙门菌、副溶血性弧菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌。

由于 VITEK-32 没有将菌株从海藻施万菌和腐败施万菌中区分开,继续使用 API20E 对菌株做生化鉴定。结果所有菌株在生化卡培养 24 h 后判定为腐败施万菌,其结果的可能性为 07MAS2741 (89.1%),其余 7 株为 99.1%;菌株 07MAS2741 在生化卡培养 96 h 后,尿素(URE)和明胶(GEL)水解反应由阴性变为阳性,因此属于尿素和明胶的慢水解反应,此时判定为腐败施万菌的可能性为 99.1%。

3. 辅助检测:

(1)耐盐量实验:所有菌株均能够在 6% 的 NaCl 浓度下生长(37℃),除 07MAS2723 耐盐量为 6% 以外,其余菌株的耐盐量可达 10% 以上;除 07MAS2723 在 6% 的 NaCl 浓度下不能产生菌膜外,其余菌株可在 8% 的 NaCl 浓度下产生菌膜,在 10% 的 NaCl 浓度下产生菌膜能力消失。

(2)耐热实验:在 1%NaCl LB 中,所有菌株均可耐热到 60℃ 30 min,在 65℃ 能存活 10 min,但在

表 1 分离菌株的生长和生化特征

特征	分离菌株	腐败施万菌 (ATCC8071)	海藻施万菌 (IAM14159)
6%NaCl生长状况(℃)			
4	-	+	-
37	+	+	+
42	+(MAS2723-)	-	+
菌膜形成(℃)			
37	+(MAS2723-)	N	N
42	+(MAS2723-) (MAS2741-)	N	N
枸橼酸盐	-	d	d
β-糖苷酶	-	-	-
明胶酶	+[MAS2741(+)]	(+)	(+)
氧化酶	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+
吡啉产生	-	-	-
精氨酸二水解酶	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+
H ₂ S 产生	+	+	+
尿素水解	-[MAS2741(+)]	-	-
明胶水解	+[MAS2741(+)]	+	+
DNA 水解	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
亚硝酸盐还原	-	-	+
阿拉伯糖	-[MAS2723(+)]	d	-
核糖	-	d	(+)
纤维二糖	-	-	-
半乳糖	-	-	-
葡萄糖	-	d	(+)
果糖	-	d	(+)
甘露醇	-	-	-
乳糖	-	-	-
麦芽糖	-[MAS2741(+)]	d	-
蔗糖	-	d	-

注:+:阳性反应;-:阴性反应;d:结果可变;(+):延迟或弱反应;N:未检测

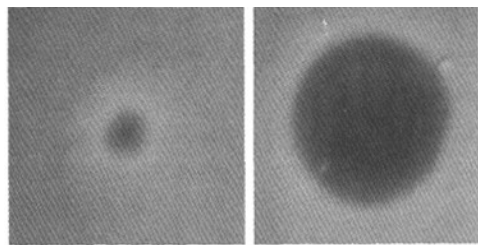
65℃ 30 min,然后置 37℃ 培养 18 h 后,所有菌株则再不能生长。

(3)溶血实验:在绵羊血培养基上点种菌落,置 42℃ 72 h 后,8 株菌都产生明显的β-溶血现象,溶血环平均直径为 3 mm,除 07MAS2723 外,其余菌株还形成黏液状菌落(图 1)。

4. 16S rDNA 进化树分析:16S rDNA 进化发育树将施万属菌区分为两个群:本研究分离的 7 株施万属菌(除 MAS2723 外)与 GenBank 库中的海藻施万菌(*S.alga* ATCC51192)聚为一群,本研究分离菌株 MAS2723 与 GenBank 库中的腐败施万菌(*S.putrefaciens* ATCC8071)聚为一群。据此可以判断,除 MAS2723 外,本研究分离的其他菌株为海藻

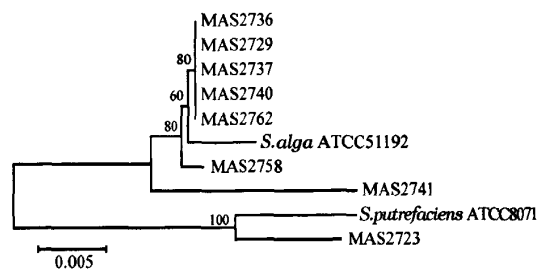
施万菌;结合 16S rDNA 进化树与生化检测结果, MAS2723 为腐败施万菌(图 2)。

5. 抗生素药敏试验:分离菌株对氨苄西林、庆大



MAS2723 其他海藻施万菌

图 1 分离的施万菌溶血实验



注:用 ClustalW 软件做多重序列比对;进化树采用 Minimum Evolution 法在 MEGA 4.0 软件中构建而成,评估方法为 Bootstrap 法,进化树 Cut-off 值为 50%

图 2 分离菌株与 GenBank 库中施万菌属的 16S rDNA 系统进化分析

霉素、卡那霉素(氨基糖苷类)和红霉素普遍敏感(S),对头孢噻吩和多粘菌素 B 耐药(R)或中敏(I)率较高;但 MAS2758 和 MAS2762 对四环素和氯霉素耐药,且对诺氟沙星也出现耐药(表 2)。

讨 论

施万菌的分类地位一直颇有争议。1931 年 Derby 和 Hammer 等将该菌鉴定为无色杆菌属

(*Achromobacter*),到 20 世纪 60 年代,Shewan 等将其归为假单胞菌属(*Pseudomonas*),1985 年 MacDonell 等根据 5S rDNA 序列数据,认为是一个新属,建议命名为施万菌属(*Shewanella*),并将其归为弧菌科的一个新属^[6]。随后,又陆续发现了该属的多个新种。现在一般认为,施万菌是一类非发酵、产硫化氢的水生细菌^[7]。与临床有关的种只有海藻施万菌和腐败施万菌,常见的海藻施万菌感染包括耳部和软组织的感染,比较严重的感染有菌血症、脑膜炎和心内膜炎。施万菌属引起感染的流行病学和临床症状与气单胞菌和其他海生嗜盐弧菌相似。但目前未见从聚餐性食物中毒腹泻患者中分离到施万菌属的报道。

本研究首次从聚餐引起的食物中毒患者标本中分离到施万菌,并对分离的菌株进行种水平的鉴定。在菌株的分离培养中,未从 SS 培养基获得海藻施万菌可疑菌落,而是在 TCBS 和 BP 培养基上比较容易地获得海藻施万菌的可疑菌落。海藻施万菌和腐败施万菌在生长和生化方面的差异,是海藻施万菌能够在绵羊红细胞培养基上产生 β-溶血,形成黏液状菌落,在 6% w/v 的 NaCl 培养基中和在 42℃ 时能够生长,能够还原亚硝酸盐,但在含麦芽糖时不能产酸。在本研究鉴定的 7 株海藻施万菌中,其亚硝酸盐还原反应为阴性,与目前已知的海藻施万菌亚硝酸盐还原反应都是阳性不同;MAS2741 分离自患者肛拭的海藻施万菌,尿素和明胶水解反应均表现为延迟反应,不同于本研究分离的其余海藻施万菌(分别为-和+)。本研究还发现,海藻施万菌也可在 8% NaCl 37℃ 中生长,且 7 株海藻施万菌在 37℃ 都有生物膜形成,但在 42℃ 时, MAS2741 无生物膜形成而其余 6 株海藻施万菌仍有。菌株 MAS2723 生化和 16S rDNA 都鉴定为腐败施万菌,该菌不形成生物膜、在 4℃ 不能生长以及置 42℃ 72 h 后产生明显的 β-溶血现象,在这些生物学特性上与典型的腐败

表 2 分离施万菌的药敏试验 MIC(μg/ml)

菌株编号	氨苄西林	头孢噻吩	庆大霉素	卡那霉素	四环素	诺氟沙星	氯霉素	红霉素	多粘菌素 B
MAS2723	≤2(S)	16(I)	0.5(S)	4(S)	≤1(S)	≤0.25(S)	≤2(S)	8(S)	32(R)
MAS2729	≤2(S)	>32(R)	1(S)	8(S)	2(S)	0.5(S)	≤2(S)	4(S)	≤4(I)
MAS2736	≤2(S)	>32(R)	1(S)	8(S)	2(S)	1(S)	8(S)	8(S)	≤4(I)
MAS2737	≤2(S)	>32(R)	1(S)	8(S)	2(S)	1(S)	8(S)	8(S)	≤4(I)
MAS2740	≤2(S)	>32(R)	1(S)	16(S)	2(S)	0.5(S)	4(S)	4(S)	≤4(I)
MAS2741	≤2(S)	16(I)	1(S)	8(S)	≤1(S)	0.5(S)	4(S)	8(S)	≤4(I)
MAS2758	≤2(S)	>32(R)	2(S)	8(S)	>16(R)	16(R)	>32(R)	4(S)	≤4(I)
MAS2762	≤2(S)	>32(R)	1(S)	4(S)	>16(R)	2(I)	32(R)	4(S)	8(R)

施万菌相比有不同^[5,9]。

本研究使用自动生化鉴定系统不能区分海藻施万菌和腐败施万菌。Nozue 等认为,许多临床分离的腐败施万菌应该是海藻施万菌。而也有学者提出异议,认为临床上鉴定为由腐败施万菌感染的患者,没有充足的证据表明应该是海藻施万菌感染。出现这种争议的原因,是目前的自动和半自动生化鉴定系统(如 API20E 和 20NE)的数据库中,只有腐败施万菌,而没有海藻施万菌,Vitek 生化鉴定系统数据库中虽然包括这两个种,但不能将两者区分开来。

为进一步鉴定此次食物中毒分离的施万菌属菌株,本研究继而进行了基于核酸水平的 16S rDNA 序列分析。16S rDNA 基因分子结构上的高度保守性、分布的普遍性及其所含的大量信息,使 16S rDNA 基因成为了一个较为理想的基因分类靶序列。对其序列进行分析,已被证明在细菌分类鉴定上具有重要价值。本研究对分离的 8 株施万属菌的 16S rRNA 进化树分析结果,其中 7 株施万属菌鉴定为海藻施万菌,1 株鉴定为腐败施万菌。因此推测,与食物中毒有关的施万属菌感染,是以海藻施万菌为主。

本研究的两起由聚餐导致的食物中毒,临床诊断为类似河豚毒素引起的食物中毒。近年来,从越来越多的海生生物和海生菌中检测到河豚毒素(TTX),施万菌也属于产河豚毒素菌^[9]。目前已有许多 TTX 引起的食物中毒的报道,尤其在东南亚、日本及我国台湾和内地。但关于 TTX 的来源问题仍然是争论的焦点。本研究首次从食物中毒患者肛拭标本中分离海藻施万菌,为 TTX 的微生物来源提供了线索。

参 考 文 献

[1] Khashe S, Janda JM. Biochemical and pathogenic properties of

Shewanella algae and *Shewanella putrefaciens*. J Clin Microbiol, 1998, 36(3):783-787.

[2] Holt HM, Sogaard P, Gahrn-Hansen B. Ear infections with *Shewanella algae*: a bacteriologic, clinical and epidemiologic study of 67 cases. Clin Microbiol Infect, 1997, 3(3):329-334.

[3] Chen YS, Liu YC, Yen MY, et al. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. Clin Infect Dis, 1997, 25(2):225-229.

[4] Dhawan B, Chaudhry R, Mishra BM, et al. Isolation of *Shewanella putrefaciens* from a rheumatic heart disease patient with infective endocarditis. J Clin Microbiol, 1998, 36(8):2394.

[5] Holt HM, Gahrn-Hansen B, Bruun B. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(5):347-352.

[6] MacDonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the family *Vibrionaceae* and recommendations for two new genera: *Listonella* and *Shewanella*. Syst Appl Microbiol, 1985, (6):171-182.

[7] Vogel BF, Satomi VK. Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 6689-6697.

[8] Bagge D, Hjelm M, Johansen C, et al. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(5):2319-2325.

[9] Wu Z, Yang Y, Xie L, et al. Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea of China. Toxicon, 2005, 46(4): 471-476.

(收稿日期:2009-05-05)

(本文编辑:张林东)