

创伤弧菌生物学特性和检测技术研究进展

王青柏, 李良秋, 徐鹏, 曾绮文, 王东东, 王嘉铭, 谭雨婷 (广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东广州 510070)

摘要 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一种重要的水产品污染病原,可造成养殖水产品的病害,同时也是一种致命的人类机会致病菌,与全世界大部分食用污染海鲜致死的案例有关。随着全球气温升高,以及食用海鲜产品的人群变多,我国创伤弧菌感染率呈现上升趋势。简要综述了创伤弧菌的生物学特性及分子检测的最新进展,为创伤弧菌感染的早期诊断和及时治疗提供参考资料。

关键词 创伤弧菌;生物学特性;检测技术

中图分类号 R 378.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)05-0033-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.05.008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research Progress on Biological Characteristics and Detection Techniques of *Vibrio vulnificus*

WANG Qing-bai, LI Liang-qiu, XU Peng et al (Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Microbiology Application New Technology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou, Guangdong 510070)

Abstract *Vibrio vulnificus* is an important aquatic product pollution pathogen that can cause diseases in cultured aquatic products. It is also a deadly human opportunistic pathogen, associated with most cases of eating contaminated seafood worldwide. With the global temperature rising and the number of people eating seafood products increasing, the infection rate of *Vibrio vulnificus* in China is on the rise. This article briefly reviewed the biological characteristics of *Vibrio vulnificus* and the latest advances in molecular detection, providing reference for the early diagnosis and timely treatment of *Vibrio vulnificus* infection.

Key words *Vibrio vulnificus*; Biological characteristics; Detection technology

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是人类和水产养殖动物的重要病原弧菌,广泛存在于海水及河口环境中^[1]。2000年,美国疾病控制中心首次从腹泻患者粪便中分离出一种嗜盐性的革兰阴性细菌^[2]。2007年Bross等^[1]从脓毒症患者血液分离培养出同种细菌,引起了大家的普遍关注,该菌于1979年被命名为*Vibrio vulnificus*。随后,美国、日本等国家相继报告创伤弧菌感染临床病例,姜红^[3]于1991年报道了我国首例创伤弧菌引起的原发性败血症。2006年,创伤弧菌被列入最危险的细菌,与霍乱弧菌、副溶血性弧菌并列为威胁人类健康的三大弧菌^[4]。近年来,随着气候变暖以及进食海鲜的人群变多,我国创伤弧菌感染率呈现上升趋势^[5-8]。人感染创伤弧菌往往与食用受污染的海产品及创口暴露于海水有关,临床症状主要表现为原发性败血症和严重的创口感染,此外,还可引起肠胃炎、肺炎、脑膜炎等,其中引起的原发性败血症在免疫功能低下的人群中死亡率高达50%~60%^[9]。在水产养殖中,创伤弧菌可使许多种经济动物患病,如罗非鱼^[10]、虾南美白对虾^[11]、金鲳鱼^[12]、安圭拉鳗鱼^[11]、鲟鱼^[13]、石斑鱼^[14]等。最近,我国学者首次报道了从患病的淡水鱼草鱼中分离出创伤弧菌^[15]。草鱼是我国主要的养殖淡水物种之一,年产量超过580万t,也是世界水产养殖中最大的鱼类产量^[15]。

创伤弧菌的感染不仅对人类健康造成重大危害,也给水产养殖业带来巨大经济损失,而且我国海产品品种丰富多样,每年因食用海产品而引起食物中毒、急性胃肠炎或腹泻

等疾病屡有报道。因此研究创伤弧菌的生物学特性及检测技术具有重要意义。

1 生物学特性

创伤弧菌是一种低度嗜盐菌,存在于盐度为0.08%~3.50%的水体中^[16],属于弧菌科(Vibrionaceae)弧菌属(*Vibrio*)。该菌为革兰氏阴性细菌,菌体短小,呈稍弯曲的逗点状,有极端单鞭毛,有动力,单独存在或尾端相连成“C”或“S”型,氧化酶阳性,无芽孢,适于生长在碱性环境中,对酸性环境敏感,在低于13℃的环境下不生长,在无盐培养基上不生长^[3]。创伤弧菌在固体培养基中呈多样性,在选择性培养基TCBS上呈绿色菌落,而在改良的mCPC琼脂上呈带黄色晕环的黄色菌落。它是一种重要的水产品污染病原,可造成养殖水产品的病害,同时也是一种致命的人类机会致病菌,与全世界大部分食用污染海鲜致死的案例有关^[17]。根据生化血清学试验和受感染宿主的不同,目前将创伤弧菌分为3种生物型^[18]:生物I型主要感染人类,通常零星发生;生物II型主要引起鳗鱼的疾病,但是也有少数感染人的报道;生物III型于1996年首次报道,可引起人类败血症和软组织感染。创伤弧菌的致病性是多种致病因子共同作用的结果,主要致病因子包括溶血素、MARTX毒素、铁载体、荚膜多糖、脂多糖以及金属蛋白酶等。

1.1 溶血素 溶血素(*vibrio vulnificus* haemolysin, VVH)是创伤弧菌分泌至胞外的一种穿孔毒素(pore-forming toxin),是创伤弧菌重要的毒力因子之一,参与了细菌入侵宿主的毒力机制,通过破坏肠道黏膜组织协助创伤弧菌从肠道侵入到血液^[5]。VVH能特异性结合胆固醇,在细胞膜上组装成低聚体^[19],进而形成离子渗透孔(ion-permeable pores)破坏细胞膜的屏障功能,导致红细胞破裂、溶解^[20],上皮细胞凋

基金项目 广东省省级科技计划项目(2013B06180004)。

作者简介 王青柏(1981—),男,浙江平湖人,工程师,硕士,从事微生物研究和质量管理工作。

收稿日期 2018-10-20;修回日期 2018-11-01

亡^[21]。溶血素基因 *vwhA* 编码的多肽与霍乱弧菌埃尔托型和霍乱弧菌非 O1 群的溶血素的第一区及第二区的氨基酸分别有 65% 和 60% 的相似度,通过 II 型分泌途径被分泌到胞外^[22]。

1.2 MARTX 毒素 MARTX (multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin) 毒素,是创伤弧菌重要的毒力因子之一,分子量巨大,由 4 000 多个氨基酸残基组成,属于重复子毒素家族 (RTX),在其 C 段重复出现 9 个串联的氨基酸的特殊分子结构^[23]。MARTX 毒素是创伤弧菌抵抗宿主免疫防御的一个重要工具,穿过宿主细胞膜时,会把自己分割成小分子效应因子进入到细胞质中。释放的效应因子通过作用于宿主细胞的信号通路,有效地抑制了由 Rac1 调节的巨噬细胞免疫吞噬作用、细胞迁移和抗菌氧自由基的产生^[24]。小鼠疾病模型研究表明,MARTX 毒素和 VVH 这 2 种毒力因子缺少其中任何一种,创伤弧菌临床分离株就不能使小鼠致病,MARTX 毒素可能通过与 VVH 相互协作,共同促使肠道黏膜的炎症快速发展,致使上皮细胞变性坏死^[25]。

1.3 铁载体 铁摄取系统是创伤弧菌的关键致病因子^[26]。铁是几乎所有生物体必需的微量营养素,从环境中获取铁对细菌至关重要。然而,由于血液中的铁通常与铁螯合蛋白如转铁蛋白和乳铁蛋白以高亲和力结合,人体中的可溶性铁是非常有限的,不能维持细菌生长。创伤弧菌可通过表达儿茶酚铁载体 (vulnibactin) 和异羟肟酸铁载体来摄取铁,其中酚盐类铁载体是其主要的方式^[27]。研究表明,当儿茶酚铁载体相关基因 (*vuuA*、*venB*、*vsaA*、*vsaB*) 发生突变时,创伤弧菌菌株的毒力将会降低^[28]。

1.4 荚膜多糖 荚膜是构成细菌与外界环境之间的一道屏障,是许多病原菌重要的毒力因子之一。荚膜对细菌入侵过程中的黏附、逃避巨噬细胞吞噬作用以及促进全身感染是十分必要的。荚膜也是创伤弧菌的一个重要致病因子^[29],创伤弧菌的菌落形态及毒性作用与其荚膜的表达密切相关,菌落透明的创伤弧菌不产生荚膜,对小鼠不具有致病性,而菌落不透明的创伤弧菌产生荚膜,对小鼠有致死性^[30]。

2 创伤弧菌检测技术研究进展

目前,生化特征仍是弧菌鉴定分类的常用方法,但是这种方法操作繁琐又耗时费力,易受人员的主观判定干扰,而且弧菌属主要病原菌表型相似性较高,弧菌属细菌的生化特征不稳定,给弧菌的鉴定带来了很大困难和不确定性,弧菌的鉴定结果也经常不准确。而一些商业化的微生物快速检测系统如 API VITECH 等的检测原理也是根据生化反应,对致病性弧菌的检测准确度不高,不利于病原菌的确定和治疗措施的及时应对^[31]。随着检测技术的不断发展,微生物的检测已从传统的生化、免疫学方法逐渐发展为基因水平的检测。常规 PCR 及其衍生技术在创伤弧菌的快速检测中不断得到运用和发展。

2.1 常规 PCR 技术 Hill 等^[32] 基于 *vwhA* 基因首次建立了创伤弧菌的 PCR 检测方法,对 5 株创伤弧菌和 22 株其他细菌进行 PCR 扩增,所测创伤弧菌都得到一条 519 bp 的特异

性条带,而其他菌株没有特异性扩增,对于经碱性蛋白胨水 (alkaline peptone water, APW) 24 h 增菌的人工染菌牡蛎样品,检出限为 100 CFU/g。Kumar 等^[33] 建立的基于 *gyrB* 基因的海产品创伤弧菌 PCR 检测方法,所测创伤弧菌都出现一条 28 bp 的特异性条带,其他弧菌和非弧菌细菌无特异扩增。对于不经过增菌步骤的人工染菌牡蛎,该法的检出限为 300 CFU/g,而对于 APW 18 h 增菌的样品,检出限为 30 CFU/g。PCR 方法虽然实现了致病菌的快速检测,但如何避免假阳性结果仍然是一个挑战,需要非常严格的引物设计,包括引物特异性、引物长度、解链温度、GC 含量、较少的二级结构和 PCR 退火温度,以实现其高特异性。

2.2 多重 PCR 技术 随着 PCR 技术的广泛应用,由基本的 PCR 原理衍生出的改进方法不断出现,其中多重 PCR 技术 (Multiplex PCR) 具有高效、快捷和特异性高等优点,能够同时扩增出多个核酸片段,克服了单重 PCR 缺点,可实现对同一基因组多个位点或不同基因组多个位点的同时检测。张新中等^[34] 采用多重 PCR 的方法同时检测创伤弧菌 *gyrB* 基因的 3 个位点,设计的 3 对引物分别扩增得到 481、702 和 1 065 bp 的 DNA 片段,能够更为准确地甄别病原体,该方法的灵敏度为 102 CFU/mL。Lee 等^[35] 采用多重 PCR 的方法同时检测纯培养物和染菌牡蛎中鼠伤寒沙门氏菌、创伤弧菌、霍乱弧菌和副溶血性弧菌的,发现染菌牡蛎匀浆 3 h 增菌后的创伤弧菌检出限为 100 CFU/g。Bauer 等^[36] 建立了基于 *toxR* 基因的多重 PCR 方法检测创伤弧菌、霍乱弧菌和副溶血性弧菌,如果已知待测菌株的原始菌落形态,该法的效果良好,否则溶藻弧菌会对结果产生影响。Tarr 等^[37] 建立了检测霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌的多重 PCR 方法,对 190 株代表菌株的基因组进行扩增,均出现特异性扩增片段,由于多重 PCR 反应体系中多对引物同时扩增,如果试验条件控制不当,容易出现扩增失败或非特异性扩增。成功的多重 PCR 方法是基于引物的特异性以及多对引物对浓度、退火温度、底物浓度达到平衡的状态,因此引物的设计及对反应体系和反应条件的不断优化是建立该方法的关键所在。

2.3 DPO-PCR 技术 PCR 技术的特异性取决于引物与模板 DNA 之间互补的程度,因此,引物的设计对于 PCR 特异性反应显得尤为重要^[38]。2007 年韩国 Seegene 公司首次提出一种新型的聚合酶链式反应引物设计方法即双启动寡核苷酸引物 (dual priming oligonucleotide, DPO),提高了 PCR 反应特异性^[39]。最近, Xu 等^[40] 基于 DPO 技术建立了 DPO-多重 PCR 方法检测海产品中霍乱弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌等 4 种主要致病菌,设计的特异性引物分别靶向霍乱弧菌 *mdh*、创伤弧菌 *vwhA*、溶藻弧菌 *colH* 和副溶血性弧菌 *toxR* 基因;为了测试其特异性,该研究使用了 396 种细菌菌株,包括 209 种目标菌株和 187 种其他细菌菌株,结果显示特异性 PCR 产物仅在靶细菌菌株中观察到。与常规 PCR 检测相比,该 DPO-多重 PCR 方法允许在更宽的退火温度 (48~68 °C) 下有效扩增靶基因,对于每种弧菌的纯培养物或

人工污染的食物基质样品,其分析检测限均小于 1.510 CFU。可见,多重 PCR 中引入 DPO 引物技术,大大提高了多重 PCR 检测结果的灵敏度及特异性。

2.4 RT-qPCR 技术 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 自 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出后,实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,该技术是利用反应体系中荧光信号的积累实时监测整个 PCR 的进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析^[41]。RT-qPCR 结合了常规 PCR 的核酸扩增高效性,探针技术的高特异性,光谱技术的高敏感性和高精确定量等多种优点,且操作完全封闭,仪器直接读数,结果判断更加客观真实。通过查询中国标准在线服务网 (<http://www.spic.org.cn>) 发现,截至目前,我国颁布的基于 PCR 技术的国家和行业标准有 305 个,其中涉及实时荧光 PCR 的有 180 个,约占 60%,说明实时荧光定量 PCR 技术的准确性、可靠性及高效性得到各个行业的认可,也为实时荧光定量 PCR 技术的推广应用奠定基础。王紫薇等^[42]在北京市市场随机采集的 105 份海产品进行创伤弧菌检验,并比较了 RT-PCR 法和 VITEK 鉴定方法的准确性,结果发现,105 份海产品中,有 40 份样品检出创伤弧菌,检出率为 38.10%;其中,虾类产品检出率高达 52.38%,其次为贝类产品(37.88%)和鱼类产品(22.22%);经 rpoB 基因测序验证,RT-PCR 和 VITEK 方法的准确率分别为 100.00% 和 67.50%。但是 RT-qPCR 的荧光信号容易受样品基质、培养基、核酸提取试剂等抑制,导致其检测敏感性显著降低,影响了该精确定量技术的适用性,而且探针成本较高、检测仪器昂贵、操作要求高等诸多因素给 RT-qPCR 在基层的推广应用带来一定困难。另外一个局限性是该技术只能对反应体系中模板 DNA 进行定量,无法鉴别污染样品的细菌是死菌还是活菌。

2.5 MPN-PCR 技术 最大可能数 (most probable number MPN) 法是依据试验结果计算出目标菌统计学上的估计值,是常用的微生物半定量检测方法^[43]。MPN 法的试验过程涉及细菌的复苏和选择性富集,可以在大量杂菌存在条件下检出活的目标菌。国家食品安全风险评估中心 2015 年发布的《国家食品污染和有害因素风险监测工作手册》中 8 种食源性致病菌的定量检测方法,除了铜绿假单胞菌外均推荐了 MPN 法^[44]。将 PCR 技术和 MPN 法的结合应用也越来越多,这提高了检测速度,也提高了检测敏感性。Bonny 等^[45]结合 MPN 法和多重 PCR 技术建立了 MPN-多重 PCR 方法,定量检测样品中副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌;该研究共分析了 120 份鱼样,副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌的患病率分别为 48.33%、27.00% 和 32.50%;当应用单纯化 MPN-PCR 时,在 $P < 0.05$ 时获得类似的结果,验证了多重 MPN-PCR 的准确性;所测试的样品中副溶血性弧菌、霍乱弧菌以及创伤弧菌的污染量分别为 $0 \sim 2.43 \times 10^6$ 、 $0 \sim 2.16 \times 10^6$ 和 $0 \sim 4.93 \times 10^5$ MPN/g。

2.6 LAMP 技术 常规 PCR 检测、多重 PCR 及荧光定量 PCR 检测虽然特异性和灵敏性强,但是需要专业人员操作,

所需设备仪器比较昂贵,一定程度上阻碍了这种方法的广泛应用。环介导恒温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是由日本学者 Notomi 于 2000 年首次报道的一种适用于基层诊断的恒温核酸扩增技术^[46],此技术在恒温条件下即可完成核酸的扩增,具有耗时少、成本低、技术要求低等优点,近年来已被广泛用于病毒、细菌、寄生虫等各种病原体的相关研究。Ren 等^[47]首次建立了基于溶细胞素基因的创伤弧菌 LAMP 检测方法,利用该方法对 31 株菌株进行检测,结果显示,LAMP 反应对创伤弧菌具有高度特异性,且比常规 PCR 灵敏 10 倍。别闯南等^[48]分别以创伤弧菌溶血素 A 基因 (hemolysin gene A, HA) 和多重毒素 (repeats in toxin, RTX) 毒力基因的保守序列作为靶序列设计内、外引物,建立了快速检测致病性创伤弧菌 2 种毒素的 LAMP 方法,该 LAMP 检测创伤弧菌的 2 种基因的灵敏度都达 10 CFU/mL。在人工模拟样品检测中,LAMP 结果显示,采用水煮法提取 DNA,从样品处理到报告结果耗时 1.5 h,鱼肉中创伤弧菌的检出限为 1×10^2 CFU/g (RTX) 和 1×10^4 CFU/g (HA);采用同样方法提取 DNA 进行普通 PCR,其检出限为 1×10^3 CFU/g (RTX) 和 1×10^4 CFU/g (HA),耗时 4 h。

3 结语

创伤弧菌是一种重要的海洋动物病原菌,可造成养殖水产产品的病害。同时也是一种致命的人类机会致病菌,与全世界大部分食用污染海鲜致死的案例有关^[49]。创伤弧菌由于对易感人群的高致死率,也被称为“食肉细菌”,引起的原发性败血症的死亡率超过 50%^[50]。除了原发性败血症之外,通过接触存在有创伤弧菌的海水或海产品引起的伤口感染,死亡率约为 25%^[51]。因此,对创伤弧菌生物学特性的深入了解以及病原菌快速检测显得尤为重要。由于创伤弧菌在低于 13 °C 的温度下不能生长,因此可以利用这点,在食用海鲜产品前将海鲜产品冷却至低于此温度保藏几个小时,以最大限度地降低感染风险,当然这会影响海鲜产品的新鲜度和口感。由于创伤弧菌感染通常是致命的,并且预后与诊治的速度、准确度直接相关。因此,建立一种快捷、简便、实用性强的检测方法对于创伤弧菌感染的早期诊断和及时治疗是至关重要。随着分子生物学技术的不断发展,PCR 及其衍生技术也在不断地改进,更多新的、优秀的创伤弧菌快速检测技术将不断涌现,使包括创伤弧菌在内的病原微生物的检测更加准确、特异与灵敏。

参考文献

- [1] BROSS M H, SOCH K, MORALES R, et al. *Vibrio vulnificus* infection: Diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2007, 76(4): 539-544.
- [2] STROM M S, PARANJPYE R N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect*, 2000, 2(2): 177-188.
- [3] 姜红. 原发性创伤弧菌败血症一例 [J]. *中华内科杂志*, 1991(30): 645-646, 127.
- [4] CHUNG P H, CHUANG S K, TSANG T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(8): 1302-1303.
- [5] 林燕. 1 例创伤弧菌前臂感染病人的护理 [J]. *全科护理*, 2018(7): 890-892.
- [6] 肖美英, 沈芳, 王莺, 等. 1 例创伤弧菌创面感染后继发感染性休克的分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017(11): 1571-1573.
- [7] 邓慧倍. 8 例创伤弧菌感染患者的护理 [J]. *护理学报*, 2017(8): 33-34.

- [8] 郑小庆, 盛吉芳. 创伤弧菌感染 13 例临床特点及预后分析[J]. 中国微生物生态学杂志, 2016, 28(2): 213-217.
- [9] 陈晓燕, 胡超群. 溶藻弧菌脂多糖在两种鱼类体内的组织分布[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 30-35.
- [10] CHEN C Y, CHAO C B, BOWSER P R. Infection of tilapia *Oreochromis* sp. by *Vibrio vulnificus* in freshwater and low-salinity environments[J]. World Aquacult Soc, 2006, 37(1): 82-88.
- [11] FOUZ B, AMARO C. Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms [J]. Aquaculture, 2003, 217(1/2/3/4): 667-682.
- [12] LI G F, ZHAO D H, HUANG L, et al. Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture[J]. Aquaculture, 2006, 261(1): 17-25.
- [13] SI L N, LI S W, WANG D. The isolation and drug sensitive tests of pathogens found in sturgeon epizootic disease[J]. Chin J Fish, 2010, 23(4): 18-22.
- [14] ABDULLAH A, RAMLI R, RIDZUAN M S M, et al. The presence of Vibrionaceae, *Betanodavirus* and *Iridovirus* in marine caged cultured fish: Role of fish size, water physicochemical parameters and relationships among the pathogens[J]. Aquac Rep, 2017, 7: 57-65.
- [15] LIU R R, LIAN Z Y, HU X C, et al. First report of *Vibrio vulnificus* infection in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* in China[J]. Aquaculture, 2019, 499: 283-289.
- [16] TAMPLIN M, RODRICK G E, BLAKE N J, et al. Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries [J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 44(6): 1466-1470.
- [17] HENG S P, LETCHUMANAN V, DENG C Y, et al. *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1-25.
- [18] HORI M, NAKAYAMA A, KITAGAWA D, et al. A case of *Vibrio vulnificus* infection complicated with fulminant purpura: Gene and biotype analysis of the pathogen[J]. JMM Case Reports, 2017, 4(5): 1-3.
- [19] KIM H R, RHO H W, JEONG M H, et al. Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *V. vulnificus*[J]. Life Sci, 1993, 53(7): 571-577.
- [20] YAMANAKA H, SATOH T, KATSU T, et al. Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin[J]. Journal of general microbiology, 1987, 133(10): 2859-2864.
- [21] KASHIMOTO T, UENO S, EHARA H, et al. Oligomerization is essential for apoptotic activity of *Vibrio vulnificus* hemolysin [J]. Vet Med Sci, 2009, 71(10): 1403-1406.
- [22] GULIG P A, BOURDAGE K L, STARKS A M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*[J]. J Microbiol, 2005, 43: 118-131.
- [23] LALLY E T, HILL R B, KIEBA I R, et al. The interaction between RTX toxins and target cells[J]. Trends microbiol, 1999, 7(9): 356-361.
- [24] LO H R, LIN J H, CHEN Y H, et al. RTX toxin enhances the survival of *Vibrio vulnificus* during infection by protecting the organism from phagocytosis[J]. J Infect Dis, 2011, 203(12): 1866-1874.
- [25] JEONG H G, SATCHELL K J F. Additive function of *Vibrio vulnificus* MARTX (Vv) and VvhA cytolysins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(3): 1-13.
- [26] LITWIN C M, RAYBACK T W, SKINNER J. Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence [J]. Infect Immun, 1996, 64(7): 2834-2838.
- [27] SIMPSON L M, OLIVER J D. Siderophore production by *Vibrio vulnificus* [J]. Infect Immun, 1983, 41(2): 644-649.
- [28] KIM I H, SHIM J I, LEE K E, et al. Nonribosomal peptide synthase is responsible for the biosynthesis of siderophore in *Vibrio vulnificus* MO6-24/O[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(1): 35-42.
- [29] CHATZIDAKI-LIVANIS M, JONES M K, WRIGHT A C. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group capsular polysaccharide operon [J]. J Bacterio, 2006, 188(5): 1987-1998.
- [30] HILTON T, ROSCHE T, FROELICH B, et al. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(11): 6986-6993.
- [31] 徐宸, 王鑫, 钟江. 创伤弧菌快速检测法的建立[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(19): 114-116.
- [32] HILL W E, KEASLER S P, TRUCKSESS M W, et al. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(3): 707-711.
- [33] KUMAR H S, PARVATHI A, KARUNASAGAR I, et al. A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths[J]. Int J Food Microbiol, 2006, 111(3): 216-220.
- [34] 张新中, 张世秀, 李海平, 等. 多重 PCR 在创伤弧菌快速检测中的应用[J]. 水产科学, 2007, 26(12): 668-670.
- [35] LEE C Y, PANICKER G, BEJ A K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by Covalink NH microwell plate sandwich hybridization[J]. J Microbiol Methods, 2003, 53(2): 199-209.
- [36] BAUER A, RØRVIK L M. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(4): 371-375.
- [37] TARR C L, PATEL J S, PUHR N D, et al. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 134-140.
- [38] 苏琰, 李融, 黎华. 基于双启动寡聚核苷酸引物的 PCR 技术及其研究应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2906-2912.
- [39] CHUN J Y, KIM K J, HWANG I T, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene[J]. Nucleic acids research, 2007, 35(6): 1-6.
- [40] XU Y G, SUN L M, WANG Y S, et al. Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay [J]. Food control, 2017, 71: 64-70.
- [41] ARYA M, SHERGILL I S, WILLIAMSON M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR [J]. Expert review of molecular diagnostics, 2005, 5(2): 209-219.
- [42] 王紫薇, 汪琦, 赵晓娟, 等. 2016 年北京市海产品中创伤弧菌的污染调查及两种检测方法比较[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(2): 182-186.
- [43] 刘军. 食源性致病菌定量检测技术研究近况[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(2): 302-304.
- [44] 国家食品安全风险评估中心. 2015 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 684-877.
- [45] BONNY S Q, HOSSAIN M A M, LIN T K, et al. Multiplex MPN-PCR for the enumeration of three major *Vibriosis* raw fishes in Malaysia [J]. Food control, 2018, 90: 459-465.
- [46] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [47] REN C H, HU C Q, LUO P, et al. Sensitive and rapid identification of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Microbiol Res, 2009, 164(5): 514-521.
- [48] 别闯南, 王权, 白雪瑞. 检测创伤弧菌两种毒力基因的环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(1): 48-54.
- [49] 刘彤, 郑秋月, 赵昕, 等. 变性高效液相色谱技术对创伤弧菌检测的研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2011, 23(5): 470-472.
- [50] STROM M S, PARANJPYE R N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*[J]. Microbes Infect, 2000, 2(2): 177-188.
- [51] HARWOOD V J, GANDHI J P, WRIGHT A C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: A review[J]. J Microbiol Methods, 2004, 59(3): 301-316.