

综述

创伤弧菌致病性及致病机制研究进展

叶淑瑶^{1,2},杨保伟²,李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021;
2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

摘要:创伤弧菌广泛存在于海水和牡蛎等海产品中,具有很强的细胞毒性和溶血性,被美国疾病预防控制中心(CDC)列为三大致病性弧菌之一。本文就创伤弧菌在食品中的污染状况,人类感染途径及临床表现,致病性、致病机制和检测方法等进行综述,以期为该菌感染的预防和治疗提供理论依据。

关键词:创伤弧菌;食源性致病菌;污染水平;致病性;致病机制;检测方法

中图分类号:R155 **文献标识码:**R **文章编号:**1004-8456(2018)02-0213-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.02.018

Research progress on pathogenicity and pathogenic mechanism of *Vibrio vulnificus*

YE Shu-yao^{1,2}, YANG Bao-wei², LI Feng-qin¹

(1. Key Laboratory of Food Safety Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Assessment, Beijing 100021, China; 2. Collage of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China)

Abstract: *Vibrio vulnificus* widely exists in oysters and seawater. It has been recognized as one of the three major pathogenic *Vibrio* spp. because of its strong cytotoxicity and hemolysis. In this paper, the contamination status of *Vibrio vulnificus* in food, prevalence, pathogenicity, pathogenic mechanism and detection method are reviewed, so as to provide theoretical basis for the prevention and treatment of the infection.

Key words: *Vibrio vulnificus*; foodborne pathogens; contamination status; pathogenicity; pathogenic mechanism; detection method

创伤弧菌是一种革兰阴性弧菌,呈棒状或弧状,兼性厌氧,单极端生鞭毛。该菌有3个生物型,其中生物Ⅰ型和生物Ⅱ型分别感染人类和鳗鱼,但近年来研究发现生物Ⅱ型中仅有血清型E菌株对人类有致病性,生物Ⅲ型仅在以色列发现,被认为是生物Ⅰ型和Ⅱ型的杂交体,也有致病性的报道^[1-3]。根据毒力相关基因(virulence correlate gene,VCG),创伤弧菌又可分为环境型和临床型两大类,这两种基因型菌株分别携带大量特异性基因,从而增强了它们对环境的适应性和致病性^[4-5]。

创伤弧菌广泛存在于海湾和咸水水域,在5~10月期间沿海水域的污染水平较高。主要通过伤口接触海水造成感染,也可经口感染,食用牡蛎等贝类是引起人类感染创伤弧菌的主要途径,感染后

病情严重程度和致死率远超其他致病性弧菌,死亡率高达18%,人食用被污染的海产品感染创伤弧菌后通常易患原发性败血症,即使救治及时,死亡率仍高达50%;皮肤有伤口的人游泳或接触被该菌污染的水域是导致伤口感染创伤弧菌的主要原因,严重感染者需大面积清创甚至截肢^[6]。这两种感染途径都会使患者承受极大的身心痛苦和沉重的经济负担。美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control,CDC)将创伤弧菌列为三大致病性弧菌之一。本文就近年来创伤弧菌在食品中的污染状况、人类感染途径及临床表现、致病性、致病机制和检测方法等进行综述,以期为该菌的预防和治疗提供理论依据。

1 创伤弧菌污染状况和人类感染途径及临床表现

1.1 创伤弧菌污染状况

创伤弧菌广泛存在于近海水体、海底淤泥和海产品中,富含蛋白质的牡蛎、毛蚶、贻贝、对虾的污染率和污染水平较高,海鱼中该菌的污染水平较

收稿日期:2018-02-21
作者简介:叶淑瑶 女 硕士生 研究方向为微生物食品安全
E-mail: yeshuyao75@163.com
通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物
E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

低。由于创伤弧菌是嗜盐菌,因此在淡水鱼虾中少见。美国 CDC 报道^[7]称美国海域水温相对较高的 5~10 月期间,食品和环境中的创伤弧菌污染水平较高,这可能与这一时期飓风和热带风暴引起洪水导致人暴露于海水中的可能性增大有关。部分国家或地区海产品中创伤弧菌的污染情况见表 1。

表 1 创伤弧菌在海产品中的污染状况
Table 1 Contamination of *Vibrio vulnificus* in seafood

国家或地区	食品基质	污染率/%	参考文献
美国	牡蛎	95.0	[8]
中国杭州	海虾	42.3	[9]
中国广西	海产鱼、贝、甲壳类	27.5	[10]
中国深圳	海产鱼、藻、软体、甲壳类	12.2	[11]
法国	海产鱼、贝、甲壳类	12.6	[12]
意大利	甲壳类	11.5	[13]
意大利	蚌	8.90	[14]
日本	海产鱼、贝	37.6	[15]
马来西亚	海产鱼、虾、贝	13.0	[16]
新西兰	牡蛎	17.2	[17]
泰国	牡蛎	22.1	[18]
斯里兰卡	海虾	2.40	[19]
瑞典	贻贝	63.0	[20]
越南	海虾	1.50	[21]

1.2 人类感染途径及临床表现

据美国 CDC 报道^[22-23],美国每年由各种弧菌引起的病例约有 80 000 例,其中 52 000 例是由于食用了被污染的水产品,多数患者 1~3 d 内能恢复且无后续影响,但是感染创伤弧菌的患者通常病情较重,需要进行重症监护甚至截肢,约有 1/4 的创伤弧菌感染患者在发病 1~2 d 内死亡。2014 年,美国霍乱和其他弧菌疾病监测系统(the cholera and other vibrio illness surveillance system, COVIS)统计了 1 252 例弧菌属感染病例,其中由创伤弧菌引起的有 124 例,死亡率高达 18%^[7]。国内创伤弧菌感染的病例少见,这可能与我国缺乏对该菌的监测有关。2015 年我国科学家 ZHAO 等^[24]报道了 2000—2014 年间中国东南部仅有 21 例创伤弧菌感染者,其中 4 人死亡。HSU 等^[25]报道了中国台湾地区 2005—2012 年间 19 例创伤弧菌感染者,其中 2 人死亡。虽然创伤弧菌感染在我国报道较少,但是近年来调查表明,我国以牡蛎为主的海产品中创伤弧菌的污染率较高,加上大众对于生食海鲜的喜爱,导致我国居民感染创伤弧菌的风险增加,必须引起重视。

免疫力低下者(如地中海贫血症患者、接受免疫抑制疗法的患者)、肾病患者、慢性肝病患者、糖尿病患者、恶性肿瘤患者、酒精中毒者以及因服药导致胃酸水平下降或近期有胃部手术的患者为易感人群^[7,26-27]。感染途径主要是生食或食用未彻底加热的贝类,特别是牡蛎,这已成为美国感染创伤

弧菌和致死的主要原因;另外,开放性伤口暴露于海水或含盐量较高的咸水环境也提高了感染创伤弧菌的风险。人体感染创伤弧菌后,菌体在皮下组织中迅速繁殖而引起皮肤大面积损伤,致死率达 15%~30%。创伤弧菌感染可引起两种疾病:1)原发性败血症,创伤弧菌透过肠粘膜进入血液,导致患者出现全身中毒症状,如发烧、寒颤、血压降低、下肢及软组织损伤(表现为下肢疼痛肿胀、局部红斑、淤斑坏死、大疱性皮肤损害、蜂窝组织炎)以及腹痛、腹泻、恶心、呕吐等肠胃炎症状^[28-29]。美国每年大约有 20~40 例创伤弧菌感染引起原发性败血症的患者,其中 50% 是由于肾病和血清铁水平升高而死亡^[7]。2)创伤感染,多见于四肢伤,皮肤损害表现与原发性败血症相同并向躯干蔓延,同时伴有发热、寒颤、恶心、呕吐等症状^[28-29]。其中,原发性败血症的致死率远高于伤口感染。

2014 年,美国传染病协会(the Infectious Diseases Society of America, IDSA)更新了皮肤及软组织感染的治疗指导方针,建议使用多西环素联合头孢他啶治疗创伤弧菌感染^[30]。美国 CDC 则进一步提出复方磺胺甲噁唑联合氨基糖苷类药物作为儿童感染用药,氟喹诺酮类药物如左氧氟沙星、环丙沙星、加替沙星等单剂疗法在动物模型中效果等同于上述联合用药^[7]。有研究^[31]表明替加环素在皮肤及软组织感染中表现出较好的治疗效果。中国学者卢中秋等^[29]在治疗研究中发现乳酸左氧氟沙星、哌拉西林钠、头孢哌酮钠、奈替米星的治疗效果最好。

2 毒力因子及致病机制

2.1 溶血素

创伤弧菌可产生由结构基因 *vhA* 编码的创伤弧菌溶血素(*Vibrio vulnificus* haemolysin A, VvhA),该溶血素是一种具备创伤弧菌种属特异性,活性和毒性都很强的细胞外蛋白,属于孔形成蛋白家族中的胆固醇依赖型溶细胞素^[32]。VvhA 是创伤弧菌引发细胞、组织损伤的重要毒力因子,作用机制主要包括细胞毒性和诱导细胞凋亡两方面。VvhA 的细胞毒性机制是与细胞膜上的非酯化胆固醇结合并在细胞表面聚集,使细胞膜形成孔道导致胞内钾离子外流,引起胶体渗透性细胞破裂。研究^[33]表明,VvhA 与胆固醇的结合依赖于胆固醇的立体结构,低密度脂蛋白胆固醇使 VvhA 寡聚导致其失活。VvhA 诱导细胞凋亡的主要机制与线粒体有关。VvhA 可诱导产生超氧化物一氧化氮酶(NOS),通过该酶催化大量一氧化氮合成而引起宿主组织损

伤,导致低血压和休克。肺是 VvhA 作用的重要靶器官,SUN 等^[34]通过重组溶血素 rVvc 作用于肺腺癌细胞 A549,证明细胞凋亡是由线粒体损伤激活 cytc-c caspase-9/3 细胞凋亡机制与 *bcl-2* 基因表达下调、*bax* 基因表达上调引起的。

创伤弧菌还可以分泌另一种溶血素 MARTX (multifunctional autoprocessing repeats in the toxin),该溶血素是由 *rtxA1* 基因编码,具有类似 RTXA (repeats in the toxin A) 的特征,需经过翻译修饰后方可发挥作用。MARTX 的 C 端有富含甘氨酸的重复序列,通过 I 型分泌系统转运至胞外,需结合钙离子才能表现出细胞毒性。MARTX 毒素与 VvhA 的致病机制类似,也具有细胞溶解和诱导细胞凋亡的能力,可作用于包括人类、老鼠、鱼和鳗鱼的红细胞、上皮细胞和吞噬细胞等多种真核细胞^[33-35]。MARTX 毒素可使吞噬作用相关的 SFKs-FAK/Pyk2-PI3K-Akt 信号通路无效化,从而导致巨噬细胞圆缩,吞噬作用受损^[36]。创伤弧菌生物 II 型分泌的 MARTX 毒素可导致人上皮细胞溶解及单核细胞凋亡并引起早期剧烈的免疫反应失调^[37]。研究^[33]表明,MARTX 的细胞毒性远大于 VvhA,对小鼠的致死效果也更加明显。两种毒素均能促进创伤弧菌在小肠内的生长繁殖并转移到其他组织,以逃避机体的吞噬作用。

2.2 蛋白酶

创伤弧菌蛋白酶 (*Vibrio vulnificus* protease, VVP) 是由创伤弧菌分泌至胞外的锌离子依赖金属蛋白酶,属于嗜热菌蛋白酶家族,具有很强的细胞毒性和溶血能力,可促进菌体从肠道侵入血流,其编码基因 *vvpE* 具有高度的保守性^[38-39]。

成熟的 VVP 包含两个功能区域,即氨基端 (VVP-N) 和羧基端 (VVP-C)。VVP-N 能介导蛋白水解反应,降解构成血管基膜骨架的 IV 型胶原蛋白导致毛细血管结构破坏,引起严重的出血性皮肤损伤^[40]。VVP-C 区域可介导与底物蛋白或细胞膜的有效连接,增强 VVP-N 的作用效果^[41]。VVP 还能诱导肥大细胞释放组胺并激活因子 XII,促进前血管舒缓素向血管舒缓素转化,血管舒缓素作用于血浆中的激肽原,释放缓激肽从而导致水肿^[42]。最近研究^[43]表明,缺乏粘液素 (Muc 2) 会导致严重的结肠炎,而 VVP 可促进 *muc 2* 基因启动子特定区域的甲基化使得 *muc 2* 基因转录受到抑制,明显降低人黏液分泌细胞 HT29-MTX 中 Muc 2 水平,提高创伤弧菌对内皮细胞的粘附性和肠壁渗透性。

部分鳗源创伤弧菌致病菌株中 *vvpE* 基因缺失,分泌一种新的创伤弧菌丝氨酸蛋白酶 (*Vibrio*

vulnificus serine protease, VvsA) 代替 VVP,这种酶与副溶血性弧菌胞外蛋白酶同源,具有多种细胞毒性,能引起人类伤口感染和胃肠炎,是导致出血性水肿的重要原因^[44]。

2.3 荚膜多糖

创伤弧菌荚膜多糖 (capsular polysaccharide, CPS) 在抵抗宿主的免疫反应过程中起重要作用,能抵抗巨噬细胞的吞噬作用、抗体和补体的调理作用以及血清补体的杀菌作用;此外,CPS 还能包裹创伤弧菌表面的免疫原性结构,避免激活宿主的非特异性免疫反应。CPS 也是创伤弧菌胞外基质的主要成分,参与组成生物膜,从而增强细菌抵抗宿主免疫反应的能力。有研究^[45]表明,CPS 能促进人肠上皮细胞细胞因子 IL-8 产生导致炎症加重。CPS 的合成受到转录反终止子 *rafH* 在转录水平的调控,*rafH* 突变会导致 CPS 产量减少,血清抗性几乎完全消失^[46]。

2.4 铁过氧

铁元素是人体必需微量元素,在人体中以结合血红素构成血红蛋白或结合血液中的铁传递蛋白和乳铁传递蛋白的形式存在^[47]。铁元素也是创伤弧菌的必需营养素,对促进该菌在血液中的增殖至关重要。创伤弧菌有多种铁吸收系统,当血液中的游离铁含量低时,创伤弧菌能够合成作为铁载体或铁螯合剂的创伤弧菌素,与创伤弧菌素受体 (VuuA) 共同作用争夺宿主体内铁离子。慢性肝病、血色素沉着症、地中海贫血患者肝脏合成的铁结合蛋白减少,导致机体内游离铁离子含量升高,促进创伤弧菌增殖^[48]。铁元素还是 CPS 合成的必需元素,创伤弧菌分泌铁吸收调节蛋白 (Fur) 对 VuuA,需氧菌素受体 (IutA) 和血红素受体 (HupA) 进行负调控,减少荚膜多糖合成,也能导致荚膜多糖抵抗血清的能力下降^[48-49]。

创伤弧菌致病机制复杂,至今尚未完全阐明,一般认为该菌所致疾病是多致病因子、多途径共同作用的结果,除了以上几种主要的致病因子之外,菌毛、鞭毛、脂多糖、磷脂酶等也与创伤弧菌的致病性有关。

3 创伤弧菌检测方法

3.1 增菌培养法

目前国际上常用的创伤弧菌检测方法包括美国食品和药品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 发布的细菌分析学手册 (bacteriological analytical method, BAM) 第九章、国际标准化组织 (International Standard Organization, ISO) 发布的

ISO/TS 21872-2: 2007、加拿大卫生部发布的 MFLP-37 以及日本厚生省发布的食品卫生检查指南^[50-53]。FDA 发布的 BAM-2004 提供的第一法是最大可能数 (most probable number, MPN) 法, 将海产品匀浆在碱性蛋白胨水 (alkaline peptone water, APW) 中增菌后在改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E (modified cellobiose-polymyxin B-colistin, mCPC) 琼脂平板或纤维二糖-多粘菌素 E (cellobiose-colistin, CC) 琼脂平板上划线分离, 对纤维二糖阳性菌落进行生化鉴定或基于 *whA* 基因的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 鉴定。第二法是将海产品组织匀浆稀释物涂布于创伤弧菌琼脂 (*vibrio vulnificus* agar, VVA) 平板上, 培养后在平板上覆盖滤膜以粘附菌落, 裂解滤膜上的菌体释放 DNA 使之与基于 *whA* 基因设计的探针杂交^[50]。加拿大 MFLP-37 建议使用 mCPC 作为创伤弧菌分离用培养基, 鉴定方法仅介绍了常规生化鉴定^[52]。ISO 2017 年对方法进行了更新, 提供了生化鉴定、PCR 和荧光定量 PCR 作为可选的鉴定手段^[54]。

以上增菌培养法均耗时费力, 不适用于活的非可培养 (viable but non-cultural, VBNC) 创伤弧菌检测。根据创伤弧菌的生化或分子特性, 为能快速、准确地检测创伤弧菌, 国内外学者利用免疫法或基于 PCR 已建立了多种快速检测方法。

3.2 免疫学方法

免疫学方法具有操作简单、特异性强、灵敏度高、检测时间短且结果易于观察的特点。TAMPLIN 等^[55]建立了基于创伤弧菌特异性单克隆抗体 FRBT37 的酶免疫法 (enzyme immunoassay, EIA), 该法的最低检出限为 2 000 个菌/孔, 准确率达 99.7%, 曾是 FDA 的 BAM 认可的创伤弧菌鉴定方法。古小莉等^[56]利用创伤弧菌外膜蛋白作为抗原, 建立的创伤弧菌斑点酶联免疫法特异性好, 创伤弧菌显色明显且与其他杂菌无交叉反应, 灵敏度比 TAMPLIN 等建立的方法提高了 1 倍, 为 10^3 CFU/ml, 对增菌后的增菌液检测效果与常规方法一致, 具有快速、经济和肉眼可见等优点。曾静等^[57]利用创伤弧菌鞭毛蛋白作为抗原, 制备单克隆抗体 mAb 并建立了创伤弧菌双抗夹心酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 方法灵敏度也达到了 10^3 CFU/ml, 与创伤弧菌有强阳性反应而与其他杂菌无交叉反应, 可用于商品化试剂盒的开发, 具有良好的应用前景。

3.3 分子检测方法

由于与其他杂菌存在竞争关系, 酶免疫法无法检测到样品中的创伤弧菌, 而 PCR 等分子检测方法

特异性强、灵敏度高, 更适合污染水平较低的样品中创伤弧菌的检测。WRIGHT 等^[58]设计的碱性磷酸酶标记寡核苷酸探针通过核酸杂交检测创伤弧菌以及 HILL 等^[59]基于 *vvhA* 基因的 PCR 方法已成为 FDA 的 BAM 中对创伤弧菌特异性计数和鉴定的重要方法。CAMPBELL 等^[60]于 2003 年建立了基于 *vvhA* 基因的实时荧光定量 PCR 检测牡蛎中创伤弧菌, 该方法已被 ISO/TS 21872 采纳作为创伤弧菌确证方法之一。

WEI 等^[61]于 2014 年设计了针对包括创伤弧菌在内的 4 种致病性弧菌多重 PCR 方法, 并以 16S rRNA 基因保守区作为扩增内标, 建立的方法检出限达到 10 CFU/管, 与生化鉴定结果的符合率高, 适用于菌群复杂的样品检测。随后, KIM 等^[62]设计了 6 对多重 PCR 引物对环境样品中包括创伤弧菌在内的 5 种致病性弧菌进行快速检测, 且不同种弧菌之间、弧菌与其他非弧菌之间均没有交叉反应。KIM 等^[63]建立的多重荧光定量 PCR 方法对鱼类样品中创伤弧菌的检出限可达 10 CFU/ml, 对海水样品中该菌的检出限达到了 1 CFU/ml。

环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是近年来新兴起的基因诊断技术, 该技术是在链置换型 DNA 聚合酶的作用下, 设计一对外引物和两对内引物来识别靶基因的 6 个区域, 恒温 (60 ~ 65 °C) 条件下 1 h 内就可对目的基因进行高效、特异的复制, 操作简单快速, 仪器依赖性小, 适合现场快速检测^[64]。ZHOU 等^[65]设计了四重弧菌 LAMP 检测技术, 以创伤弧菌金属蛋白酶基因 (GenBank No. U50548.1) 为靶基因设计引物, 结果表明引物特异性良好, 检测限为 8×10^3 CFU/ml, 比单纯利用外引物进行 PCR 检测灵敏 100 倍。LAMP 技术灵敏度高, 但操作中易受污染导致假阳性率高, 为解决该问题, 王耀焕等^[66]将 LAMP 与横向流动试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 检测联合应用, 针对创伤弧菌的外膜蛋白 *TolC* 基因设计 6 条特异性引物和 1 条异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的探针, 生物素标记的 LAMP 扩增产物特异性地与 FITC 标记的探针杂交, 杂交产物经 LFD 检测。完成检测仅需要 80 min, 对纯细菌培养物的检测灵敏度为 3.7×10^2 CFU/ml 或 7.4 CFU/反应, 是利用外引物进行常规 PCR 检测的 100 倍。

刘德婧等^[67]通过指数富集的配基系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选得到一条高亲和力、强特异性的创伤弧菌适配体 V8 并进行 5'-FITC 修饰, 与

菌体碎片杂交后利用流式细胞仪进行计数,检测限达到了 28 CFU/ml,速度快,尤其适用于 VBNC 状态下的创伤弧菌检测。核酸适配体还可与量子点、胶体金显色等检测手段联用,使检测更加快速灵敏,是极为理想的检测元件。郭微微等^[68]则根据 16S rDNA 和 *gyrB* 保守区扩增产物设计并筛选得到针对包括创伤弧菌在内的 7 种港口航道致病菌的探针,经氨基化修饰后点制芯片。样品增菌后提取 DNA 对 16S rDNA 和 *gyrB* 保守区 PCR 扩增后与芯片杂交,结果表明建立的基因芯片检测方法灵敏度高,可实现快速、高通量、准确的检测。

综上所述,鉴于创伤弧菌的致病性及在食品中的广泛分布,有必要加强创伤弧菌在我国的污染情况及病例报告的监测,而我国目前尚未有针对从环境到餐桌整个流通过程中创伤弧菌污染模型和人体感染创伤弧菌的剂量-反应关系评估,发展灵敏、特异、简便的海产品中创伤弧菌检测方法,对不同类别海产品中该菌污染水平进行监测,并开展创伤弧菌耐药性及致病机制的深入研究,以此为依据开展膳食暴露创伤弧菌对我国居民健康影响的风险评估,制定我国食品中创伤弧菌的限量标准等是未来研究的重点,为感染后临床用药和治疗带来极大帮助。

参考文献

[1] HENG S P, LETCHUMANAN V, DENG C Y, et al. *Vibrio vulnificus*: an environmental and clinical burden [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 997.

[2] ZAIDENSTEIN R, SADIK C, LERNER L, et al. Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel [J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14 (12): 1875-1882.

[3] AMARO C, SANJUÁN E, FOUZ B, et al. The fish pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2: epidemiology, phylogeny, and virulence factors involved in warm-water vibriosis [J]. Microbiol Spectrum, 2015, 3 (3): VE-0005-2014.

[4] JAMES D O. The biology of *Vibrio vulnificus* [J]. Microbiol Spectrum, 2015, 3 (3): VE-0001-2014.

[5] PAUL A G, KERI L B, ANGELA M S. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. The Journal of Microbiology, 2005, 42 (S1): 118-131.

[6] CHUNG P H, CHUANG S K, THOMAS T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12 (8): 1302-1303.

[7] Centers for Disease Control. *Vibrio* species causing vibriosis [DB/OL]. (2016-05-13) [2017-10-27]. <https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html>.

[8] JONES J L, LÜDEKE C H, BOWERS J C, et al. Abundance of *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus* in oysters (*crassostrea virginica*) and clams (*Mercenaria mercenaria*) from

Long Island sound [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80 (24): 7667-7672.

[9] PAN J H, ZHANG Y J, JIN D Z, et al. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio vulnificus* in retail shrimps in Hangzhou, People's Republic of China [J]. J Food Prot, 2013, 76 (12): 2063-2068.

[10] 陈艳,梅玲玲,李秀桂,等. 东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的监测 [J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21 (4): 344-347.

[11] 袁月明,袁梦. 深圳地区环境中创伤弧菌污染的调查与分析 [J]. 河南预防医学杂志, 2014, 25 (1): 16-18.

[12] ROBERT-PILLOT A, COPIN S, HIMBER C, et al. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR [J]. Int J Food Microbiol, 2014, 189 (7): 75-81.

[13] CABURLOTTO G, SUFFREDINI E, TOSON M, et al. Occurrence and molecular characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* in crustaceans commercialised in Venice area, Italy [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 220 (12): 39-49.

[14] PASSALACQUA P L, ZAVATTA E, BIGNAMI G, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in the clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy [J]. Ital J Food Saf, 2016, 5 (1): 5709.

[15] FUKUSHIMA H, KANSENSHOGAKU Z. Distribution of *Vibrio vulnificus* along the coastal area of Shimane Prefecture and contamination of retail fish and shellfish with *V. vulnificus* in Shimane Prefecture, Japan [J]. Kansenshogaku Zasshi, 2006, 80 (3): 220-230.

[16] PAYDAR M, THONG K L. Prevalence and genetic characterization of *Vibrio vulnificus* in raw seafood and seawater in Malaysia [J]. J Food Prot, 2013, 76 (10): 1797-1800.

[17] KIRS M, DEPAOLA A, FYFE R, et al. A survey of oysters (*crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147 (2): 149-153.

[18] CHANGCHAI N, SAUNJIT S. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in retail raw oysters from the eastern coast of Thailand, Southeast Asian [J]. J Trop Med Public Health, 2014, 45 (3): 662-669.

[19] KORALAGE M S, ALTER T, PICHPOL D, et al. Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. isolated from preharvest shrimp of the North Western Province of Sri Lanka [J]. J Food Prot, 2012, 75 (10): 1846-1850.

[20] COLLIN B, REHNSTAM-HOLM A S. Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden [J]. Fems Microbiol Ecol, 2011, 78 (2): 306-313.

[21] TRA V T, MENG L, PICHPOL D, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail shrimps in Vietnam [J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2016, 129 (1/2): 48-51.

[22] MICHAEL A H, SALIM S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2011, 15 (3): e157-e166.

[23] BIER N, SCHWARTZ K, GUERRA B, et al. Survey on

- antimicrobial resistance patterns in *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 in Germany reveals carbapenemase-producing *Vibrio cholera* in coastal waters [J]. *Front Microbiol*, 2015, 28(6):1179.
- [24] ZHAO H, XU L C, DONG H H, et al. Correlations between clinical features and mortality in patients with *Vibrio vulnificus* infection [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0136019.
- [25] HSU J C, SHEN S H, YANG T Y, et al. Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Vibrio vulnificus* and *Klebsiella pneumoniae* in diabetic patients [J]. *Biomed J*, 2015, 38(2):136-142.
- [26] MATSUMOTO K, OHSHIGE K, FUJITA N, et al. Clinical features of *Vibrio vulnificus* infections in the coastal areas of the Ariake Sea, Japan [J]. *Infect Chemother*, 2010, 16(4):272-279.
- [27] FROELICH B A, PHIPPEN B, FOWLER P, et al. Differences in abundances of total *Vibrio* spp., *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus* in clams and oysters in North Carolina [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(2):e02265-16.
- [28] 卢中秋,程俊彦,陈志康. 创伤弧菌感染的流行病学及临床特点 [J]. *中国急救医学*, 2003, 23(5):318-320.
- [29] 卢中秋,李秉熙,黄唯佳,等. 创伤弧菌败血症的临床和流行病学特点 [J]. *中国急救医学*, 2003, 37(5):378.
- [30] STEVENS D L, BISNO A L, CHAMBERS H F, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections; 2014 update by the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 59(2):e10-52.
- [31] YU W, SHEN X M, PAN H Y, et al. Clinical features and treatment of patients with *Vibrio vulnificus* infection [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2017, 59(3):1-6.
- [32] NATIVIDAD-BONIFACIO I, FERNÁNDEZ F J, QUIÑONES-RAMÍREZ E I, et al. Presence of virulence markers in environmental *Vibrio vulnificus* strains [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5):1539-1546.
- [33] HEE-GON J, KARLA J F. Additive function of *Vibrio vulnificus* MARTX_{Vv} and VvhA cytolytins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection [J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(3):e1002581.
- [34] SUN J C, ZHENG J, WANG G M, et al. Apoptotic effect of *Vibrio vulnificus* cytolyisin on A549 human lung adenocarcinoma cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 5(3):668-674.
- [35] 武静,刘晓斐,胡成进. 创伤弧菌流行病学调查及致病机制研究现状 [J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(3):166-168.
- [36] CHEN C L, CHIEN S C, LEU T H, et al. *Vibrio vulnificus* MARTX cytotoxin causes inactivation of phagocytosis-related signaling molecules in macrophages [J]. *Biomed Sci*, 2017, 24(1):58.
- [37] MURCIANO C, LEE C T, FERNÁNDEZ-BRAVO A, et al. MARTX toxin in the zoonotic serovar of *Vibrio vulnificus* triggers an early cytokine storm in mice [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7:332.
- [38] ELGAML A, MIYOSHI S. Regulation systems of protease and hemolysin production in *Vibrio vulnificus* [J]. *Microbiol Immunol*, 2017, 61(1):1-11.
- [39] 刘倩倩,申洪. 创伤弧菌金属蛋白酶的研究进展 [J]. *微生物*
- 免疫学研究进展, 2009, 37(4):66-69.
- [40] MIYOSHI S, KAWATA K, HOSOKAWA M, et al. Histamine-releasing reaction induced by the N-terminal domain of *Vibrio vulnificus* metalloprotease [J]. *Life Sciences*, 2003, 72(20):2235-2242.
- [41] MIYOSHI S, KAWATA K, TOMOCHIKA K, et al. The C-terminal domain promotes the hemorrhagic caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease [J]. *Toxicon*, 2001, 39(12):1883-1886.
- [42] LEE M A, KIM J A, YANG Y J, et al. VvpM, an extracellular metalloprotease of *Vibrio vulnificus*, induces apoptotic death of human cells [J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(12):1036-1043.
- [43] LEE S J, JUNG Y H, OH S Y, et al. *Vibrio vulnificus* VvpE inhibits mucin 2 expression by hypermethylation via lipid raft-mediated ROS signaling in intestinal epithelial cells [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(6):e1787.
- [44] SUMIO S, SHIN-ICHI M. Proteases produced by *Vibrios* [J]. *Biocontrol Science*, 2011, 16(1):1-11.
- [45] YOSHIDA S, OGAWA M, MIZUGUCHI Y. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect Immun*, 1985, 47(2):446-451.
- [46] GARRETT S B, GARRISON-SCHILLING K L, COOKE J T, et al. Capsular polysaccharide production and serum survival of *Vibrio vulnificus* are dependent on antitermination control by RfaH [J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(24):4564-4572.
- [47] WRIGHT A C, SIMPSON L M, OLIVER J D. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections [J]. *Infection and Immunity*, 1981, 34(2):503-507.
- [48] PAYNE S M, MEY A R, WYCKOFF E E. *Vibrio* iron transport: evolutionary adaptation to life in multiple environments [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(1):69-90.
- [49] PAJUELO D, HERNÁNDEZ-CABANYERO C, SANJUAN E, et al. Iron and fur in the life cycle of the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus* [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11):4005-4022.
- [50] FDA. Bacteriological analytical manual chapter 9 *Vibrio* [S/OL]. (2004-05) [2017-12-21]. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.html>.
- [51] International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.-part 2: detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*: ISO/TS 21872-2 [S]. 2007.
- [52] Health Protection Branch. The isolation and enumeration of *Vibrio vulnificus* from fish and seafoods: MFLP-37 [S/OL]. (1995-04) [2017-12-21]. <http://www.he-sc.gc.ca/fn-an/ah-formats/hptb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp73-e.pdf>.
- [53] 日本厚生劳动省. 食品卫生检查指针 微生物编 [M]. 日本: 社团法人日本食品卫生协会, 2004:201-224.
- [54] ISO. Microbiology of the food chain-horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera* and *Vibrio vulnificus*: ISO/FDIS 21872 (E) [S]. 2017.
- [55] TAMPLIN M L, MARTIN A L, RUPLE A D, et al. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater,

sediment, and oysters[J]. Applied Environmental Microbiology, 1991,57(4):1235-1240.

[56] 古小莉,李刘冬,陈洁文,等. 应用斑点酶联免疫法快速检测创伤弧菌[J]. 中国渔业质量与标准,2014,4(6):27-31.

[57] 曾静,程晋霞,张蕾,等. 创伤弧菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备及在食品检测中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013,29(10):1068-1071,1075.

[58] WRIGHT A C, MICEU G A, LANDRY W L, et al. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe [J]. Appl Environ Microbiol,1993,59(2):541-546.

[59] HILL W E, KEASLER S P, TRUCKSESS M W, et al. Polymcrase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters [J]. Appl Environ Microbiol, 1991,57(3):707-711.

[60] CAMPBELL M S, WRIGHT A C. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters[J]. Appl Environ Microbiol,2003, 69(12): 7137-7144.

[61] WEI S, ZHAO H, XIAN Y Y, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2014,79(2):115-118.

[62] KIM H J, RYU J O, LEE S Y, et al. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics[J]. BMC Microbiol,2015,15(1):239.

[63] KIM J Y, LEE J L. Multipurpose assessment for the quantification of *Vibrio* spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex real-time polymerase chain reaction [J]. J Sci Food Agric,2014,94(13):2807-2817.

[64] 周顺,高志鑫,张敏. 创伤弧菌和副溶血弧菌双重 LAMP 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学,2016, 36(11): 1875-1881.

[65] ZHOU S, GAO Z X, ZHANG M, et al. Development of a quadruplex loop-mediated isothermal amplification assay for field detection of four *Vibrio* species associated with fish disease[J]. Springerplus,2016,5(1):1104.

[66] 王耀焕,王瑞娜,周前进,等. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条快速检测创伤弧菌检测方法的建立[J]. 生物技术通报,2014(6):81-87.

[67] 刘德婧,胡波,彭定发,等. 核酸适配体联合流式细胞术定量检测创伤弧菌方法的建立[J]. 中国生化药物杂志,2017,37(7):1-5.

[68] 郭微微,邱军强,何培民,等. 港口航道致病性细菌检测微阵列基因芯片的研制 [J]. 南方农业学报, 2017, 48(7): 1304-1309.

· 公告 ·

总局关于规范保健食品功能声称标识的公告

2018 年第 23 号

按照《中华人民共和国食品安全法》有关保健食品声称保健功能应当具有科学依据的规定,现就保健食品功能声称标识有关事项公告如下:

一、未经人群食用评价的保健食品,其标签说明书载明的保健功能声称前增加“本品经动物实验评价”的字样。

二、此前批准上市的保健食品生产企业,应当在其重新印制标签说明书时,按上述要求修改标签说明书。至 2020 年底前,所有保健食品标签说明书均需按此要求修改。

三、自 2021 年 1 月 1 日起,未按上述要求修改标签说明书的,按《中华人民共和国食品安全法》有关规定查处。

四、经过人群食用评价的保健食品,具体评价技术要求及标识另行规定。

五、本公告自发布之日起实施。

特此公告。

食品药品监管总局

二〇一八年二月十三日

(相关链接:<http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0050/224961.html>)