

分类号:

密级: 公开

# 兰州大学

## 研究生学位论文

论文题目 (中文)	CVC 置管者 CRBSI 的细菌生物学特性及其与 ACE 毒力基因的相关性研究
论文题目 (外文)	Correlation study on biological characteristics of bacteria for CRBSI and ACE Virulence gene for CVC catheter patients
研究生姓名	豆欣蔓
学科、专业	生命科学研究·细胞生物学
研究方向	医学细胞生物学
学位级别	博士
导师姓名、职称	李玉民 教授
论文工作起止年月	2015 年 10 月至 2018 年 9 月
论文提交日期	2018 年 9 月
论文答辩日期	2018 年 11 月 29 日
学位授予日期	

校址: 甘肃省兰州市



# CVC 置管者 CRBSI 的细菌生物学特性及其与 ACE 毒力基因的相关性研究

## 摘 要

### 目的

临床治疗留置中心静脉导管（CVC），可引起患者发生导管相关性血流感染（CRBSI），极易继发脓毒症（Sepsis）或脓毒性休克（SS）。Sepsis 及 SS 是机体对 CVC 导管留置相关的病原菌入侵机体所产生的一系列严重的系统性反应，致死率极高。本研究通过对留置 CVC 导管者大样本进行系统的回顾性分析，研究 CRBSI 的流行病学特征及致感染细菌的生物学特性，分析病原菌毒力基因与致感染的相关性，为 CRBSI 的防治提供生物学依据。

### 方法

1. 采用医院信息系统（HIS）、检验信息系统（LIS）与生物学研究方法，对本中心连续 4 年 16,841 例 CVC 置管者临床病例的 CRBSI 流行病学特征及细菌生物学特性进行回顾性研究，分析 CRBSI 的发生率、病原微生物的种类特性及影响因素。

2. 将 ICU 留置 CVC 导管者（实验组）100 例与未留置 CVC 导管者（对照组）100 例的外周静脉血进行对比研究，采用实时荧光定量 PCR（RT-PCR）技术，分析最为主要的 6 类致感染病原菌的毒力基因表达的差异性。采用 Graphpad prism6.0 进行统计学分析。

3. 将 ICU 留置 CVC 导管发生了 CRBSI 的 SS 患者（实验组）238 例与正常体检者（对照组）242 例的外周静脉血进行对比研究，采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）方法，检测毒力基因 ACE 的基因活性及 rs4291 和 rs4646994 分子标记的多态性；采用 Kaplan-Meier 生存曲线对 ACE 基因不同位点多态性与 SS 患者生存率之间的相关性进行研究；运用单变量与多变量研究方法对 SS 的危险因素进行统计分析。

### 结果

1. 16,841 例 CVC 置管者 CRBSI 的流行病学特征及细菌生物学特性如下：
- （1）CVC 置管的总数量逐年增加，但 CRBSI 发生率逐年降低，分别为 7.9/千导管日、7.6/千导管日、6.9/千导管日、6.4/千导管日。
  - （2）CRBSI 的相关影响因素及所占比例为，患者合并多种并发症为 88%，导管维护者感控依从性不良，置管前评估不佳为 4.2%，患者自我管理不良为 2.1%，

其他因素为 0.3%。

(3) CRBSI 的病原菌类型: 16,507 例为单一病原菌感染, 331 例为双重感染, 3 例为三重感染。总分离出病原菌 16,905 株, 革兰氏阳性菌 (G<sup>+</sup>菌) 8,709 株 (51.4%), 革兰氏阴性菌 (G<sup>-</sup>菌) 7,875 株 (46.7%), 真菌 321 株 (1.9%)。

(4) 综合分析结果显示, CVC 置管者 CRBSI 的致感染病原菌主要有 6 类, 即肠球菌 (16.5%)、鲍曼不动杆菌 (15.4%)、肺炎克雷伯杆菌 (11.2%)、铜绿假单胞菌 (10.5%)、大肠埃希菌 (9.6%)、表皮葡萄球菌 (3.0%)。

2. 6 类致感染病原菌的感染毒力基因实验分析与对照组相比, 实验组: 肠球菌的感染相关基因 *esP*、*gelE*、*cylA*、*ACE*, 鲍曼不动杆菌的感染相关基因 *baP*、*ompA*、*csuA* 和肺炎克雷伯杆菌的感染相关基因 *iroN*、*htrA*, 铜绿假单胞菌的感染相关基因 *exoS*、*exoT*、*exoU*、*exoY*, 大肠埃希菌的感染相关基因 *caeA*, 表皮葡萄球菌的感染相关基因 *icaA*、U43366 等毒力基因与对照组相比表达水平高, 且差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。肠球菌感染患者的 *ACE* 基因表达量明显升高。

3. 比较两组之间 *ACE* 基因多态性结果显示: *ACE*rs4291 和 rs4646994 的等位基因 (Allele) 和基因型频率 (GF) 均有显著差别 ( $P<0.05$ ), 实验组 rs4291 的 TT 基因型频率和 rs4646994 的 DD 基因型频率均明显高于对照组 ( $P<0.05$ ); *ACE* 基因的细胞活性研究结果显示: 实验组和对照组相比较, AT 和 TT 基因型 (TT>AT) 比 AA 基因型明显升高, 而 DD 基因型则相对于 DI 和 II 基因型 (DI>II) 有明显下降; Kaplan-Meier 生存曲线评估结果显示: 携带 TT 或 DD 基因型的 SS 患者比非携带者具有更高的 7 d-30 d 内致死率; SS 危险因素的单变量和多变量分析结果显示: 低序贯性器官衰竭 (SOFA) 评分、r291、血清 *ACE* 及 r646994 等因素是 SS 患者具有更高危险及不良预后的预警指标。

## 结论

CVC 置管者 CRBSI 的致感染病原菌以肠球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌等 6 类为主。病原菌的毒力基因分析结果表明, 留置 CVC 导管者的病原菌致感染相关毒力基因的高表达水平可能与其感染的发生具有一定的相关性, 在呈现高表达的 16 个毒力基因中, *ACE* 基因与脓毒性休克之间存在明显的相关性这一结果表明, *ACE* 毒力基因有可能成为重要的临床预测指标。

**关键词:** CRBSI, 细菌生物学特性, *ACE*, 毒力基因

# **Correlation study on biological characteristics of bacteria for CRBSI and ACE Virulence gene for CVC catheter patients**

## **Abstract**

### **Objective**

Central venous catheter (CVC) is widely used in the treatment of critically ill patients. Catheter-related bloodstream infection (CRBSI) is one of the common complication for CVC catheter patients. Inappropriate and unreasonable treatment is extremely apt to cause sepsis (Sepsis) or septic shock (SS). The occurrence of these diseases is a series of serious systemic responses caused by the infection of CVC related pathogens, and the fatality rate very high. This study investigated the epidemiological characteristics and bacterial biological characteristics of CRBSI and analyzed the correlation between pathogenic virulence genes and infection by retrospective analysis of large samples of CVC catheter invaders in specific areas , providing a biological basis for the prevention and treatment of CRBSI.

### **Methods**

1. The epidemiological characteristics and bacterial biological characteristics of CRBSI in 16,841 clinical cases were retrospectively analyzed., Hospital information system (HIS), laboratory information system (LIS) and SPSS19 software were used to analyze the incidence of CRBSI, pathogenic microorganisms, influencing factors and so on.

2. The inpatients in the ICU were divided into the group of indwelling CVC catheter (experimental group) and the group of non-indwelling CVC catheter group (control group). The virulence gene expression differences of the six types of infectious pathogens were analyzed by RT-PCR. Statistical analysis was performed using Graphpad prism 6.0.

3. Comparative analysis of peripheral venous blood from SS patients with CRBSI who have a CVC catheter in the ICU (experimental group) (control group), and ACE rs4291 and rs4646994 polymorphisms were detected by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The

Kaplan-Meier survival curve was employed to evaluate association between ACE polymorphism and patient survival rate, meanwhile univariate and multivariate methods were used to assessment the risk factors for SS.

## **Result**

1. Epidemiological characteristics and bacterial biological characteristics of 16,841 CVC catheterists CRBSI:

(1) The results showed that the total number of CVC tubes increased year by year; during 2012 to 2015, the incidence of CRBSI was 7.9 /thousand catheter day, 7.6 / thousand catheter days, 6.9 / thousand catheter days, 6.4 / thousand catheter days, respectively. However, the CRBSI incidence decreased year by year.

(2) CRBSI related factors: patients with a variety of complications (88%), catheter control sensor compliance (5.4 (4.2%)), poor self - management (2.1%), and other factors (0.3%).

(3) CRBSI pathogens: 16,507 cases of single pathogen infection, 331 cases of double infection, 3 cases of triple infection; total separation of pathogens 16,905 strains, Gram-positive bacteria (G + bacteria) 8,709 (51.4%), Gram-negative bacteria (G - bacteria) 7,875 (46.7%), fungal 321 (1.9%).

(4) The comprehensive analysis showed that there were 10 types of infectious pathogens of CRBSI in CVC catheter patients in this region: Enterococcus (16.5%), Acinetobacter baumannii (15.4%), Klebsiella pneumoniae (11.2%), Pseudomonas aeruginosa (10.5%), Escherichia coli (9.6%), Staphylococcus epidermidis (3.0%) and other six categories.

2. The experimental virulence gene analysis of 6 types of infection-causing pathogens, compared with the control group, the experimental groups: Infection-related genes esP, gelE, cylA, ACE of Enterococcus, infection-related genes baP, ompA, csuA of Acinetobacter baumannii, infection-related genes iroN, htrA of Klebsiella pneumoniae, infection-related genes exoS, exoT, exoU, exoY of Pseudomonas aeruginosa, the infection-related gene eaeA of Escherichia coli, the infection-related genes icaA, U43366 of Staphylococcus epidermidis, and other virulence gene expression levels were higher, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ).

3. The comparative analysis of ACE gene polymorphism between the two groups showed that the alleles (Allele) and genotype frequencies (GF) of ACE rs4291 and rs4646994 were significantly different ( $P < 0.05$ ). The frequency of TT genotype and

the frequency of DD genotype of rs4646994 were significantly higher in the experimental group than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The results of ACE cell activity showed that AT and TT genotype (TT > AT) were significantly higher than AA genotype in experimental group and control group, while DD genotype was higher than DI and II genotype (DI > II) There is a significant decline; Kaplan-Meier survival curve assessment showed that SS patients with TT or DD genotype had a higher lethality rate of 7 d-30 d days than non-carriers; SS risk factors of single-variable and multivariate analysis showed that low-grade organ failure (SOFA) score, rs4291, serum ACE and rs4646994 and other factors were higher risk and adverse prognosis of SS patients.

### **Conclusion**

Infective pathogens of CRCSI in CVC catheter patients in this region are mainly composed of 6 kinds of enterococci, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. The virulence gene analysis of pathogens showed that the high expression level of infection-associated virulence genes in pathogens of CVC catheters may be related to the occurrence of infection. Among the 16 virulence genes with high expression, there is a clear correlation between ACE gene and SS. This result indicates that ACE virulence gene may become an important clinical predictor.

**Key words:** CVC; CRBSI; Biological characteristics; ACE; Virulence gene

## 中英文缩略词对照表

缩略语	英文名称	中文名称
CVC	Central Venous Catheter	中心静脉置管
CRBSI	Catheter-Related Blood Stream Infections	导管相关性血流感染
RA	Radiofrequency Ablation	射频消融术
NICU	Neonatal Intensive Care Unit	新生儿重症监护病房
NNIS	National Hospital Infection Monitoring System	国家医院感染监测系统
ICU	Intensive Care Unite	重症监护病房
CDCP	Centers Disease Control and prevention	疾病控制与预防中心
JCAHO	Joint Commission on Ac-creditation of Health Care Organization	医疗机构评审鉴定联合会
HIS	Hospital Information System	医院信息系统
LIS	Laboratoty Information System	检验信息系统
TPN	Total Parenteral Nutrition	完全胃肠外营养
VAP	ventilator-associated pneumonia	呼吸机相关肺炎
APACHEII	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation	急性生理学和慢性健康评估II
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reactio-Restriction Fragment Length Polymorphism	聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性

## 中英文缩略词对照表（续）

缩略语	英文名称	中文名称
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
CNS	Coagulase-negative staphylococci	凝固酶阴性葡萄球菌
Sepsis	Sepsis	脓毒症
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome	全身炎症反应综合征
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome	多器官功能障碍综合征
SS	Septic Shock	脓毒性休克
RAS	Renin Angiotensin System	肾素血管紧张素醛固酮系统
SNPs	single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
SOFA	Lower sepsis-related organ failure assessment	低序贯性器官衰竭
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
ACE	Angiotensin I-Converting Enzyme	血管紧张素转化酶
EG	Endogenous Glucocorticoids	内源性糖皮质激素
GP	Gene Polymorphisms	基因多态性
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium	哈迪-温伯格平衡定律

# 目 录

摘 要.....	I
中英文缩略词对照表.....	VI
前 言.....	1
第一部分 CVC 置管者 CRBSI 的细菌生物学特性研究.....	4
1 研究材料与方法.....	4
1.1 研究对象.....	4
1.2 试剂和仪器.....	4
1.3 实验方法.....	5
2 研究结果.....	8
2.1 CVC 置管概况及 CRBSI 发生率.....	8
2.2 CVC 置管者 CRBSI 的相关影响因素.....	9
2.3 CVC 置管者 CRBSI 的单因素分析.....	9
2.4 不同材质导管与 CRBSI 发生率的分析.....	10
2.5 CVC 置管者 CRBSI 发生的局部与全身的致病因素分析.....	10
2.6 CVC 置管者 CRBSI 致感染病原菌特点分析.....	12
2.7 CVC 置管者 CRBSI 致感染病原菌分型及耐药性鉴定.....	14
3 讨论.....	20
4 小结.....	24
第二部分 CVC 置管者与未置管者主要致感染病原菌毒力基因的检测与分析.....	26
1 研究材料与方法.....	26
1.1 研究材料.....	26
1.2 研究方法.....	26
1.3 主要仪器及试剂.....	31
2 实验结果.....	32
2.1 研究对象基本信息.....	32
2.2 六类病原菌毒力基因实验结果.....	33
3 讨论.....	37
4 小结.....	40

第三部分 CVC 置管者 ACE 基因与脓毒性休克的相关性研究.....	41
1 研究材料与方法.....	41
1.1 研究材料.....	41
1.2 研究方法.....	42
1.3 主要仪器及试剂.....	44
2 实验结果.....	44
2.1 研究对象基本信息.....	44
2.2 ACE rs4291/rs4646994 标记的基因分型.....	45
2.3 HWE 分析结果.....	46
2.4 ACE 基因标记位点 rs4291/rs4646994 分型结果.....	47
2.5 ACE 基因多态性与 ACE 活性相关性分析.....	47
2.6 ACE 基因多态性与 SS 患者存活率之间的相关性分析.....	48
2.7 ACE 基因标记 rs4646994 和 rs4291 单倍型分析.....	49
2.8 SS 患者 7 d-30 d 死亡率的相关因素分析.....	49
2.9 SS 患者死亡率的相关危险因素分析.....	50
2.10 ACE 不同基因型 SS 患者的预后分析.....	50
3 讨论.....	52
4 小结.....	53
结 论.....	54
不足与展望.....	54
参考文献.....	55
综 述.....	63
综述一 CVC 置管与导管相关性血流感染的研究现状.....	63
参考文献.....	74
综述二 导管相关性血流感染致病菌的毒力基因研究综述.....	78
参考文献.....	83
综述三 脓毒性休克的相关研究进展.....	86
参考文献.....	90
附 录.....	94
在学期间的获奖和研究成果.....	97
致 谢.....	99

## 前 言

中心静脉导管(Central Venous Catheter, CVC)是将导管直接通过皮肤穿刺进入颈内静脉、锁骨下静脉或股静脉,并将导管沿着穿刺点方向顺着血管走向直接插至腔静脉。20 世纪初, Bleichroder 首次将 CVC 技术应用于人体<sup>[1]</sup>, 如图 1 所示,

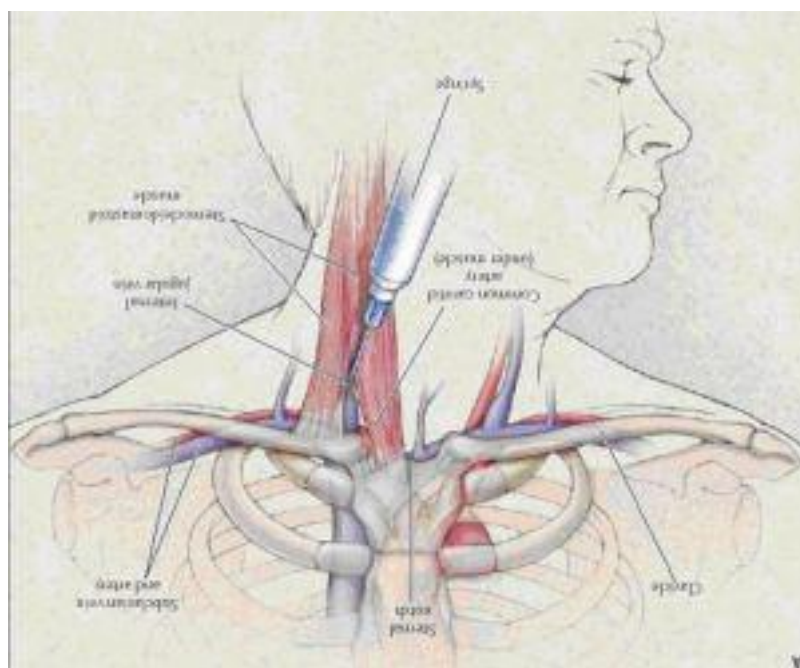


图 1 CVC 置管示意图

Fig1 Schematic diagram of CVC catheterization

在此后的 30 多年里, CVC 技术的应用范围得到了进一步的扩展, 广泛应用于对临床危重症患者的救治、中心静脉压的监测、快速大量补液和血制品输注、完全胃肠外营养 (Total Parenteral Nutrition, TPN)、肿瘤患者的化疗药物输注、血液透析 (Hemodialysis)、心脏起搏器电极植入、射频消融术 (Radiofrequency Ablation, RA) 及治疗心律失常等诸多方面。由于 CVC 技术属于微创性操作, 而导管作为置入血管内的异物, 需要留置一定的时间<sup>[2]</sup>, 因此使得人体感染的几率增加, 由以上原因而产生的感染, 称之导管相关性血流感染 (Catheter Related Blood Stream Infections, CRBSI) <sup>[2-4]</sup>。据最新研究统计结果, 在美国, 每年放置各类血管导管的频次超过 1.5 亿, 其中 CVC 超过 500 万次, 发生 CRBSI 者超过 20 万人次, CRBSI 的平均发生率约为 8.0/千导管日<sup>[5]</sup>。据美国国家医院感染监控

系统 (National Hospital Infection Monitoring System, NNIS) 报告显示, 超过 85% 的首发菌血症 (Bacteremia) 被认为与 CRBSI 有关<sup>[6-7]</sup>。因此, CRBSI 已成为血管导管留置者较为常见且处理十分棘手的相关并发症, 不但严重影响置管者疾病的预后, 而且大大增加了置管者及家属的心理压力与经济负担。

CRBSI 的发生并非单一因素所致。引发 CRBSI 感染的病原菌种类较多, 但临床以 G<sup>+</sup>菌最为常见。大量研究发现, 致感染菌以凝固酶阴性葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌等居多。病原菌致感染的机制较为复杂, 生物被膜是病原菌存在与致病的先决条件, 其形成是一个复杂的连续性的过程, 涉及多种毒力基因, 而毒力基因又决定了其致病性的强弱。对 CRBSI 致感染比例较高的病原菌毒力基因进一步分析, 有助于明确 CRBSI 发生及预防诊治的关键点。

同时, CRBSI 的发生也与其他因素存在重要的相关性, 例如, 置管者自身的状况、导管材质的选择、置管前的评估、操作者的专业技能水平、置管过程中的环境、导管留置的时间及置管后的管理及维护等诸多因素, CRBSI 的发生实为多种复杂因素综合作用的结果<sup>[8]</sup>。

发生 CRBSI 的患者如治疗不当或治疗不及时, 则很快会发展为严重的全身系统性反应--脓毒症 (Sepsis), 也称为全身炎症反应综合征 (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), 其临床症状表现为患者机体出现一系列病理及生理性的感染变化, 如低血压或血乳酸升高<sup>[9]</sup>, 且往往会引发多种并发症<sup>[10]</sup>, 若进一步发展至循环系统出现异常, 如血管内容量损耗、周围血管舒张、心肌抑制及代谢增加, 会导致机体氧的供需发生不平衡, 进而出现机体组织缺氧或休克, 发展成为严重的脓毒症。在此种情况下即便给予患者足量补液复苏, 也无法纠正持续性低血压的发生, 以及少尿、急性意识状态改变及器官功能障碍 (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) 等症状的伴发, 称之为脓毒性休克 (Septic Shock, SS)<sup>[11-12]</sup>。脓毒症的发生及发展在很大程度上取决于内源性糖皮质激素 (Endogenous Glucocorticoids, EG)<sup>[13]</sup>。早期的许多研究表明, 有多种信号通路和基因参与 SS 的发生与发展过程, 其中参与 SS 的基因多态性 (Gene Polymorphisms, GP) 在 SS 和 Sepsis 中起着关键作用<sup>[14-16]</sup>。有研究指出, 不同的基因多态性被证明与重度 Sepsis 和 SS 的发生有关联, 比如肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF), 但是另外一些也有可能和 SS 的死亡率上升有关系, 比如 $\beta_2$  肾上腺素能受体 (ADRB2 基因)<sup>[17]</sup>。此外, 有研究报告指出, 推测血管紧张素转换酶 (ACE I) 等位基因携带者更易发展为 Sepsis<sup>[16]</sup>。时至今日, 国际上关于 SS 的流行病学、危险因素及转归等的研究已有不少<sup>[7,18-21]</sup>, 尤其是在过去的十余年中, 有关重度脓毒症和 SS 的防治, 临床工作者已经做了大量的研究调查并获得了积极的结果, 但是关于感染早期血流动力学的研究依然存在着

巨大的挑战空间<sup>[22-24]</sup>。即便如此，在基础性和临床性研究都已经有了实质性进展的今天，面对 SS 复杂的病理及生理等诸多的相关因素，对其与机体的反应、与致感染病原菌的毒力基因之间的关系，尚待进行更深入的研究。此外，SS 的临床表现错综复杂，疾病的严重程度、并发症和致感染病原菌与基因多态性在炎症和抗炎反应中的交互作用，诸多因素综合决定了 SS 的发展结果。因此，如何指导临床对 SS 的发生、发展以及疾病预后尽早做出预测性的诊断，成为困扰临床的一大难题。

本研究通过大样本病例的回顾性研究，分析并明确 CVC 置管者 CRBSI 发生的流行病学特征及致感染病原菌的细菌生物学特性。对回顾性研究分析中所占比例较高的 6 类致感染病原菌，分组对其毒力基因与致感染的特性进行深入的研究，从病原菌致感染的基因表达层面，更加明晰 CVC 置管者 CRBSI 发生规律。为临床尽早掌握 CVC 置管者 SS 发生、发展及预后提供重要参考，通过结合 CVC 置管者 CRBSI 致感染病原菌的细菌生物学特性，对留置 CVC 导管的 SS 患者进行毒力基因 ACE 与发病过程的相关性研究，为临床评估 CVC 置管者 SS 的发生、疾病严重程度以及预后提供一定的预测指导。

## 第一部分 CVC 置管者 CRBSI 的细菌生物学特性研究

CVC 导管的留置对于罹患严重疾病的患者而言，集治疗优势与严重感染挑战于一体。因 CVC 导管的留置而并发 CRBSI 也成为诸多研究者关注的焦点。大量研究表明，CRBSI 的发生并非单一因素所致，既包含致感染的病原菌生物学的相关特性，同时也与患者自身的状态、专业技术人员的操作水平、导管材质的选择等诸多因素密切相关。

本部分通过对大样本临床病例数据的回顾性研究，分析留置 CVC 导管者发生 CRBSI 的流行病学特征及导致感染病原菌的生物学特征，为 CVC 留置者 CRBSI 的防治提供一定的依据。

### 1 研究材料与方法

#### 1.1 研究对象

1.1.1 CVC 置管者 CRBSI 细菌生物学特性菌株来源为 2012 年 1 月-2015 年 12 月共 16,841 例 CVC 置管者送检的外周静脉血或导管尖端，同时送检血培养分离菌。所有标本的采集均由病区具备执业资质的专业人员完成，送检由专业运输人员完成，检验工作均由检验中心有资质的检验师按流程要求完成，一系列工作均遵循严格的 SOP 要求。

1.1.2 采用回顾性调查研究方法，通过查阅 2012 年 1 月-2015 年 12 月间 ICU 全部住院患者的出院病历，包括病程记录、病情记录单、生命体征记录单、医嘱单、化验单及特殊检查报告单等全部病案记录，与医院感染报告卡及科室医院感染病例报告本记录相结合，研究患者住院情况及 CRBSI 的相关过程。

#### 1.2 试剂和仪器

##### 1.2.1 试剂

血培养瓶为法国生物梅里埃公司的 Bact/Alert3D120 型号。

##### 1.2.2 实验仪器

法国生物梅里埃公司 Bact/Alert3D12 全自动血培养仪；安徽恒星 HX-21 半自动细菌鉴定仪；英国 OXOID 公司干粉自制真菌显色平板；美国 Becton Dickinson 公司 Bactec 9120 血培养仪；德国 Siemens 公司生产的 Microscan

WalkAway 96SI 全自动细菌鉴定药敏系统。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 CRBSI 细菌的培养及鉴定

1.3.1.1 根据《全国临床检验操作规程》第 3 版的麦氏改良法进行 CVC 导管微生物进行半定量培养<sup>[25]</sup>, 培养完成后琼脂平板上细菌生长 $\geq 15$  CFU 则认为有生物学意义。培养仪器及鉴定仪器分别来自美国 Becton Dickinson 公司生产的 Bactec 9120 血培养仪和德国 Siemens 公司生产的 Microscan WalkAway 96SI 全自动细菌鉴定药敏系统。根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)规定, 对分离的菌株采用 Kirby-Bauer 纸片琼脂扩散法测定临床上常用抗菌药物的耐药性; 用大肠埃希菌(ATCC25922)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)进行药敏质控; 结果判定依据 CLSI2008 年版指南。

1.3.1.2 将血培养放于全自动血培养仪, 阳性结果出现后接种血平板和巧克力平板。

1.3.1.3 将培养出的病原微生物进一步鉴别细菌类型。

1.3.1.4 药敏试验采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法, 药敏试验判断标准采用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)判断标准。以敏感(S)、中介(I)、耐药(R)报告结果。细菌耐药率的计算:  $\text{耐药率} = \text{组内耐药菌株数} / \text{组内检测总株数} \times 100\%$ 。对耐甲氧西林(MRCNS)株的监测根据 NCCLS 的规定, 采用头孢西丁纸片扩散法检测, 按全国临床检验操作规程第 3 版进行操作判读。

#### 1.3.2 质量控制

由于 CRBSI 也属于医院感染的一种类型, 在感染监测过程中建立了医院感染控制办公室及医院质量管理办公室, 三级医院临床科室建立感染监控网络, 对医护人员进行预防、感染控制等方面的相关知识培训, 将感染意识时刻牢记并体现在实际工作中。每科室要设置感染监测医生和护士, 定期填写本科室感染报告卡。有医院感染管理专职人员根据感染报告卡进行感染病例的登记工作, 定期检查, 不定期抽查, 防止漏报。另有专职人员对检验科中微生物鉴定的阳性结果进行追踪调查, 及时发现医院感染聚集现象, 能够对医院感染的爆发、流行做出预警或预判, 做好应急措施准备。

#### 1.3.3 CRBSI 感染诊断标准

1.3.3.1 如果对血培养进行定量分析, 需要将 CVC 导管接口部位留取的检测对象的血标本进行培养, 菌落数达到外周静脉血培养的 3 倍以上。

1.3.3.2 至少一次导管培养半定量或导管阳性定量, 分别每导管 $\geq 15$  CFU 和

≥1,000 CFU，另外将外周静脉血和导管节段微生物也培养至阳性。

1.3.3.3 在 48 小时内，将带有血管内导管或取出血管内导管后没有明显的血源性感染症状和明显的感染源。

#### 1.3.4 数据信息的提取

数据信息从医院信息系统（Hospital Information System, HIS）、检验信息系统（Laboratory Information System, LIS）中提取，由信息中心网络工程师，依据本研究的具体要求，以“中心静脉置管”、“中心静脉导管”、“CVC”“导管置入”、“导管放入”、“导管放置”、“导管留置”、“留置导管”和“血管导管”等为关键词从 HIS 及 LIS 系统中完成数据的查询及调取。

#### 1.3.5 CRBSI 主要感染病原菌耐药性分子机制分析

研究中所有引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成，PCR 产业经过纯化后送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

##### 1.3.5.1 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 spa 基因分型

设计 spa 引物，引物序列如表 1.1 所示，PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司纯化并双向测序，测序结果经 BioEdit 软件处理后，与数据库 (<http://www.ridom.de/spaserver/>) 中公布的碱基重复序列比较，根据重复序列的编号和排列方式确定 MRSA 菌株的 spa 型别。

##### 1.3.5.2 CNS 的耐药基因分析

采用 PCR 方法检测 CNS 的耐药基因β-内酰胺类耐药基因 blaz 基因；大环内酯类耐药基因 ermA、ermC 和氨基糖苷类耐药基因 aac6-aph2、aacA-aacC；喹诺酮类耐药基因 qnrA、qnrC、qnrD，和 qnrB；耐药消毒剂基因 qacA、qacB、smr 等进行 PCR 扩增，并对结果进行统计。引物序列如表 1.1 所示

##### 1.3.5.3 鲍曼不动杆菌菌株基因型分析

设计随机多态性核苷酸序列（RAPD1）引物，引物信息见表 1.1，通过 PCR 扩增，通过电泳检测，利用电泳指纹图谱进行分型，并进行聚类分析。

##### 1.3.5.4 肺炎克雷伯菌菌株基因型分析

设计随机多态性核苷酸序列（RAPD2）引物，引物信息见表 1.1，通过 PCR 扩增，通过电泳检测，利用电泳指纹图谱进行分型，并进行聚类分析。

##### 1.3.5.5 大肠埃希菌血清学分型

大肠埃希菌诊断分型血清为宁波天润生物制品研究生产，操作方法参考使用说明进行。

本实验中 PCR 方法具体步骤为：用目的基因的 PCR 采用 25 μl 反应体系，其中 DNA 5 μl，Buffer 缓冲液 2.5 μl，Mgcl<sub>2</sub> 2 μl，dNTP 0.5 μl，上下游引物各 0.5 μl，Taq 酶 0.2 μl，双蒸水 13.8 μl。PCR 反应程序为 95°C 变性 15 S，根

据引物  $T_m$  值设置退火温度 ( $T_m-5^\circ\text{C}$ )，退火 30s， $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s，共扩增 36 个循环。PCR 产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1.1 PCR 引物序列

Table 1.1 PCR primer sequences

基因	引物序列
mecA	前引物 (F): TCCAGATTACAACCTCCACCAGG 后引物 (R): CCACTTCATATCTTGTAACG
blaz	前引物 (F): TCTAATTCAAACAGTTCACATGCC 后引物 (R): AGAAGCGGTAAACCCCTCTGAGA
ermA	前引物 (F): AGAAGCGGTAAACCCCTCTGAGA 后引物 (R): TCCCGTGCTGTAGGCATCT
ermC	前引物 (F): GCTCAGGAAAAGGGCATTTTACCC 后引物 (R): TGGCAGTTACGAAATTACACCTCTGT
aac6-aph2	前引物 (F): TTCATGTCCGCGAGCACCCC 后引物 (R): CCCGCTTTCTCGTAGCA
aacA-aacC	前引物 (F): ACTGTGATGGGATACGCGT 后引物 (R): GACTCTTCCGCCATCGCTCT
qnrA	前引物 (F): ATTTCTCCGCCAGGATTTG 后引物 (R): GATCGGCAAAGGTTAGGTCA
qnrC	前引物 (F): GGGTTGTACATTTATTGAATCG 后引物 (R): CACCTACCCATTTATTTTCA
qnrD	前引物 (F): CGAGATCCAATTTACGGGAATA 后引物 (R): AACAAGCTGAAGCGCCTG
qacA	前引物 (F): GCTGCATTTATGACAATGTTG 后引物 (R): AATCCACCTACTAAAGCAG
qacB	前引物 (F): CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT 后引物 (R): CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG
smr	前引物 (F): AAACAATGCAACACCTACCAC 后引物 (R): AACGAACTACGCCGACTATG
RAPD1	前引物 (F): GAGGGTGGCGGTTCT 后引物 (R): ACGTCTTATCAGGCCTAC
RAPD2	前引物 (F): ACCAGCCTCAGCAGCCGGTTA 后引物 (R): TTCGCCGCAATCATCCCTAGC

#### 1.4 数据处理及分析

将 CVC 导管细菌鉴定所得的研究数据和从 HIS 和 LIS 系统提取所得到的信息数据建立 SPSS 19.0 数据库; 将 CRBSI 研究中实验组和研究组所得到的数据也建立 SPSS 19.0 数据库, 按要求进行数据的处理及结果的分析。

## 2 研究结果

### 2.1 CVC 置管概况及 CRBSI 发生率

通过对 2012 年-2015 年 16,841 例 CVC 置患者的置管概况及 CRBSI 发生率进行的回顾性统计分析, 结果显示, CVC 置管的总例数逐年增加, CRBSI 的发生率分别为 7.9/千导管日、7.6/千导管日、6.9/千导管日、6.4/千导管日, 发生率的趋势为逐年下降。结果见表 1.2

表 1.2 CVC 置管概况及 CRBSI 发生率

Table1.2 The general situation of CVC catheterization and the incidence of CRBSI

年份	总置管例数(n)	发生感染例数(n)	置管总天数(d)	感染发生率/千导管日
2012	3,575	458	57,621	7.9
2013	3,984	478	62,630	7.6
2014	4,400	475	68,081	6.9
2015	4,882	488	75,539	6.4

此外, 对成人与儿童患者的 CVC 置管概况及 CRBSI 的发生率也分别作了统计分析, 结果如表 1.3 所示, 2012 年-2015 年儿童 CVC 置管者的总例数亦逐年增加, 儿童 CRBSI 的发生率在分别为 7.8/千导管日、7.5/千导管日、6.7/千导管日、6.3/千导管日。而成人 CRBSI 的发生频率在 2012 年到 2015 年, 如表 1.4 所示, 分别为 8.3/千导管日、8.0/千导管日、7.3/千导管日和 6.8/千导管日, 但笔者分析发现, 无论是成人还是儿童患者 CRBSI 发生率总体趋势基本一致, 呈现逐年下降的走势。

表 1.3 儿童 CVC 置管概况及 CRBSI 发生率

Table1.3 The general situation of CVC catheterization and the incidence of CRBSI in children

年份	总置管例数(n)	发生感染例数(n)	置管总天数(d)	感染发生率/千导管日
2012	1,067	128	15,421	7.8
2013	1,123	171	21,375	7.5
2014	1,357	169	23,150	6.7
2015	1,431	182	26,765	6.3

表 1.4 成人 CVC 置管者概况及 CRBSI 发生率

Table 1.4 The general situation of CVC catheterization and the incidence of CRBSI in adults

年份	总置管例数(n)	发生感染例数(n)	置管总天数(d)	感染发生率/千导管日
2012	2,508	330	42,200	8.3
2013	2,861	307	41,255	8.0
2014	3,043	306	44,931	7.3
2015	3,451	306	48,774	6.8

## 2.2 CVC 置管者 CRBSI 的相关影响因素

对 CVC 置管者相关病例资料及医院相关部门感染控制资料进行了回顾性分析,结果显示,CVC 置管者 CRBSI 的影响因素包括:患者合并多种并发症(88%),导管维护者感控依从性不良(5.4%),置管前评估不佳(4.2%),患者自我管理不良(2.1%),其他相关因素(0.3%)。结果如图 1.1 所示。

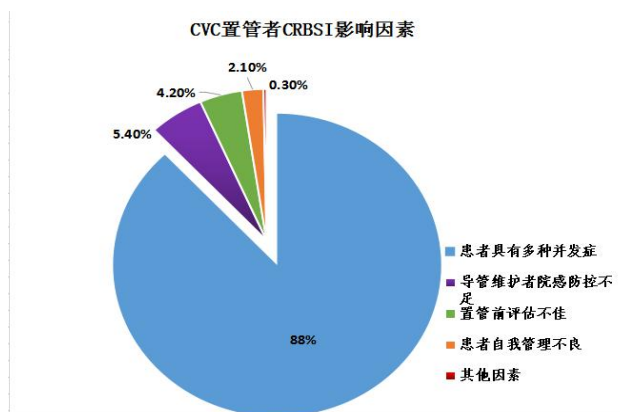


图 1.1 CVC 置管者 CRBSI 影响因素汇总

Fig 1.1 Summary of influencing factors of CRBSI in patients with CVC catheterization

## 2.3 CVC 置管者 CRBSI 的单因素分析

回归分析采用单因素条件 logistic 回归分析法,包括 CVC 置管者的循环系统疾病、肺部疾病、糖尿病、肿瘤性疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、性别、年龄、Lac>2 mmol / L、APACHE II 评分、抗生素使用、置管时间、消化道出血、过敏史等 14 个相关因素,分析各因素与 CRBSI 危险因素的关系。结果显示,循环系统疾病、年龄、Lac>2 mmol / L、APACHE II 评分、消化道出血、置管时间、长期免疫抑制治疗等 7 个因素成为可能的危险因素,如表 1.5 所示。

表 1.5 CVC 置管者 CRBSI 的单因素分析

Table 1.5 Single factor analysis of CRBSI in patients with CVC catheterization

基础疾病及危险因素	Wald $\chi^2$ 值	OR 值	OR 的 95% CI	P 值
循环系统疾病	5.467	3.312	1.232-8.781	0.016*
肺部疾病	0.155	1.304	0.399-4.175	0.567
肿瘤性疾病	2.698	1.271	0.398-4.156	0.087
糖尿病	1.774	2.156	0.687-8.132	0.156
肾脏疾病	1.134	2.142	0.589-9.467	0.186
肝脏疾病	1.365	3.908	0.375-30.57	0.146
性别	4.267	0.366	0.376-10.58	0.347
年龄	10.56	7.642	0.429-3.195	0.012*
抗生素使用	0.78	1.021	0.478-5.146	0.397
Lac>2 mmol/L	2.89	2.367	0.787-7.142	0.032*
APACHEII 评分	10.46	1.168	0.689-8.465	0.001**
置管时间	2.49	1.452	0.487-6.175	0.042*
消化道出血	5.67	4.456	0.365-20.57	0.016*
长期免疫抑制治疗	2.58	4.371	0.356-10.58	0.006**

\*表示  $P<0.05$  \*\*表示  $P<0.01$

#### 2.4 不同材质导管与 CRBSI 发生率的相关性分析

回顾性分析同时对送检的导管样本所用的材质进行了分类,并对其与 CRBSI 发生概率之间的相关性进行了统计分析,结果如表 1.6 所示,在 16,841 例样本中,使用硅胶材质的 CVC 导管者为 10,487 例,其中发生了 CRBSI 的为 1,542 例,发生率为 14.9%,使用聚氨酯材质的 CVC 导管者为 6,354 例,其中发生了 CRBSI 的患者为 357 例,发生率为 5.6%,差别有统计学意义。

表 1.6 不同材质 PICC 与 CRBSI 发生率相关性分析

Table 1.6 Correlation analysis of the incidence of CRBSI with different PICC materials

组别	例数(n)	CRBSI 发生情况(n,%)	P
硅胶 PICC 组	10,487	1,542 (14.9)	
聚氨酯 PICC 组	6,354	357 (5.6)	
合计	16,841	1,899 (11.3)	0.000**

\*\*表示  $P<0.01$

#### 2.5 CVC 置管者 CRBSI 发生的局部与全身的致病因素分析

为进一步分析 CVC 置管者 CRBSI 局部感染和全身感染的致病因素,综合整理了所收集的 16,841 例临床病例资料,对发生了 CRBSI 的 CVC 置管者依据局部感染和全身感染进行了分组,并对数据分析发现,局部感染与年龄、置管时间、糖尿病等因素具有较大的相关性,如表 1.7 所示。而全身感染除了与年龄、置管

时间、糖尿病等因素相关外，还与循环系统疾病、APACHEII 评分、长期免疫抑制治疗等因素存在较大的相关性，如表 1.8 所示。

表 1.7 CRBSI 局部感染因素分析

Table1.7 Analysis for factors of local infection in CRBSI

基础疾病及危险因素	Wald $\chi^2$ 值	OR 值	OR 的 95% CI	P 值
循环系统疾病	3.457	2.658	1.432-5.256	0.322
肺部疾病	0.135	1.245	0.425-3.568	0.653
肿瘤性疾病	1.435	1.135	0.362-3.256	0.432
糖尿病	3.215	2.461	0.687-8.132	0.001**
肾脏疾病	1.467	1.958	2.314-6.525	0.143
肝脏疾病	2.104	3.465	0.324-5.262	0.315
性别	3.201	0.148	0.235-9.483	0.256
年龄	8.451	6.325	0.325-3.325	0.013*
抗生素使用	0.665	1.325	0.423-3.808	0.352
Lac>2 mmol/L	1.985	2.148	0.254-6.254	0.132
APACHEII 评分	8.460	1.352	0.365-6.524	0.201
置管时间	3.712	2.354	0.325-5.215	0.014*
消化道出血	4.353	4.325	0.352-18.25	0.226
长期免疫抑制治疗	3.125	3.952	0.432-6.584	0.338

\*表示  $P<0.05$  \*\*表示  $P<0.01$

表 1.8 CRBSI 全身感染因素分析

Table1.8 Analysis for factors of CRBSI systemic infection

基础疾病及危险因素	Wald $\chi^2$ 值	OR 值	OR 的 95% CI	P 值
循环系统疾病	4.328	2.325	1.212-6.325	0.023*
肺部疾病	0.188	1.230	0.568-3.785	0.689
肿瘤性疾病	2.365	1.175	0.412-3.125	0.069
糖尿病	1.675	2.035	0.352-7.625	0.012*
肾脏疾病	1.254	1.768	0.367-8.451	0.268
肝脏疾病	1.236	3.658	0.638-20.152	0.432
性别	4.156	0.345	0.258-20.325	0.157
年龄	10.36	6.532	0.256-5.621	0.002**
抗生素使用	0.158	1.325	0.521-4.231	0.243
Lac>2 mmol/L	2.358	1.324	0.685-7.254	0.132
APACHEII 评分	9.438	2.025	0.598-7.654	0.018*
置管时间	2.351	1.325	0.645-3.465	0.001**
消化道出血	5.362	4.325	0.582-5.284	0.236
长期免疫抑制治疗	2.352	3.378	0.468-5.214	0.003**

注：以同时期入院，未感染 CRBSI 的患者作为对照；\*表示  $P<0.05$  \*\*表示  $P<0.01$

## 2.6 CVC 置管者 CRBSI 致感染病原菌特点分析

回顾性综合分析发现，CVC 置管者 CRBSI 的病原菌类型具有以下特点：纳入研究的 16,841 例临床病例，16,507 例为单一病原菌感染，331 例为双重感染，3 例为三重感染。对致感染病原菌的分离培养及鉴定结果如图 1.3 (A-B) 所示，格兰染色如图 1.4 (A-B)，其中主要的 G<sup>+</sup> 包括金黄色葡萄球菌、粪肠球菌；鉴定出的主要 G<sup>-</sup> 包括鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌，如图 1.3 (C-F) 所示，格兰染色如图 1.4 (C-F)，总计分离病原菌 16,905 株，检出时间为 2-60 d，平均 15 d。病原菌中 G<sup>+</sup> 者 8,709 株 (51.4%)，G<sup>-</sup> 者 7,875 株 (46.7%)，真菌 321 株 (1.9%)。结果如图 1.2 和表 1.9 所示。

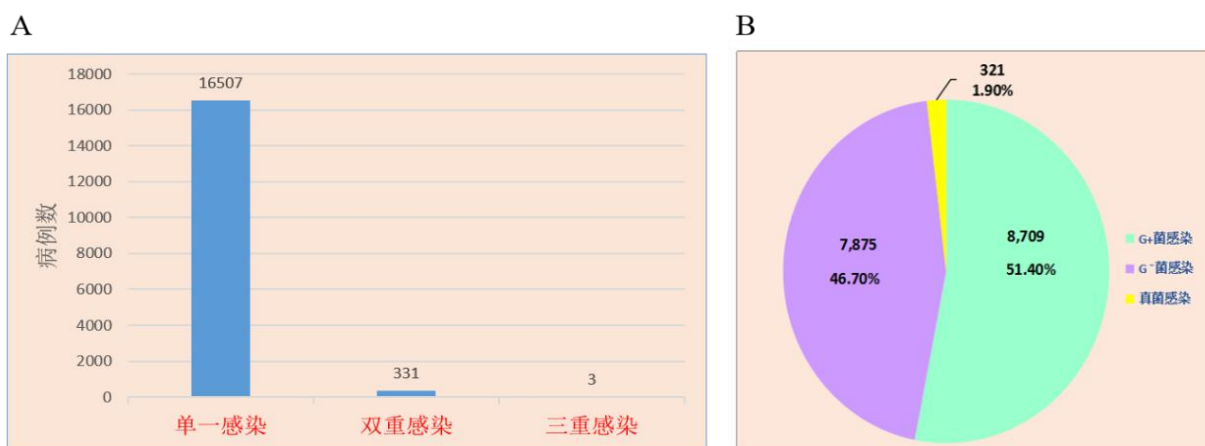


图 1.2 CRBSI 感染细菌生物学特性。(A) CRBSI 感染病原菌特性描述；(B) CRBSI 病原菌类型特征

Fig1.2 Biological characteristics of infected bacteria for CRBSI. (A) Characterization of pathogenic bacteria in CRBSI infection (B) The characteristics of pathogenic bacteria of CRBSI

表 1.9 CRBSI 病原菌分类描述

Table 1.9 The characteristics of pathogenic bacteria of CRBSI

病原菌	株数(n)	构成比(%)
G <sup>+</sup> 球菌	8,709	51.4
MRSA	4,382	26.0
CNS	2,811	16.5
肠球菌	1,008	5.9
表皮葡萄球菌	508	3.0
G <sup>-</sup> 杆菌	7,875	46.7
鲍曼不动杆菌	2,598	15.4
肺炎克雷伯杆菌	1,881	11.2
铜绿假单胞菌	1,776	10.5
大肠埃希菌	1,620	9.6
真菌	321	1.9
白色假丝酵母菌	273	1.6
近平滑假丝酵母菌	48	0.3
合计	16,905	100

注：MRSA 为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，CNS 为凝固酶阴性葡萄球菌

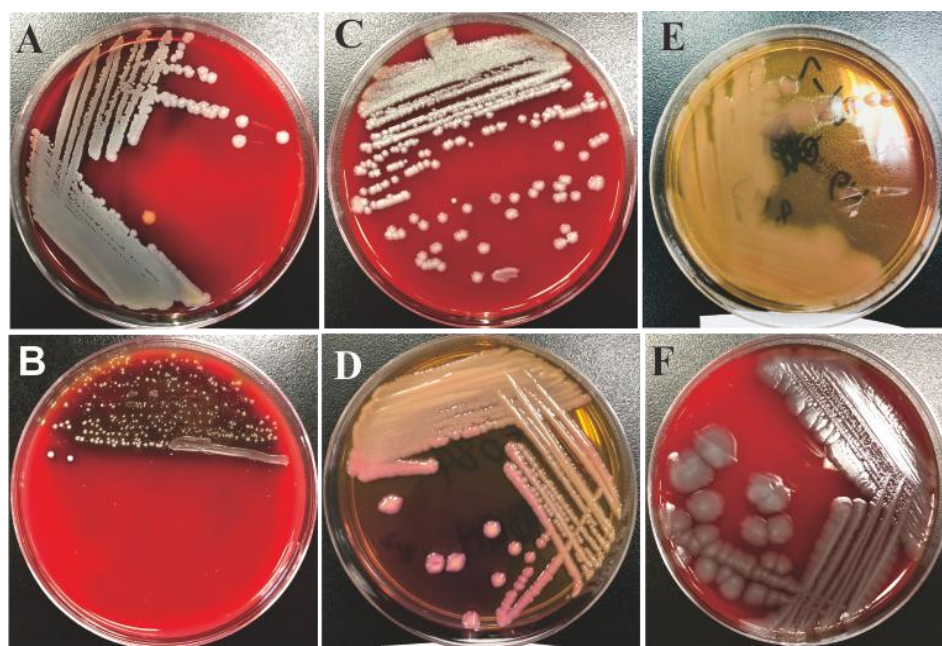


图 1.3 CRBSI 感染病原菌分离培养鉴定(A)金黄色葡萄球菌；(B)粪肠球菌；(C)鲍曼不动杆菌；(D)肺炎克雷伯杆菌；(E) 铜绿假单胞菌；(F)大肠埃希菌

Fig1.3 Isolation, culture and identification of pathogenic bacteria for CRBSI. (A)Staphylococcus aureus; (B)Enterococcus faecalis; (C)Acinetobacter Bauman; (D)Klebsiella pneumonia; (E) Pseudomonas aeruginosa; (F) Escherichia coli.

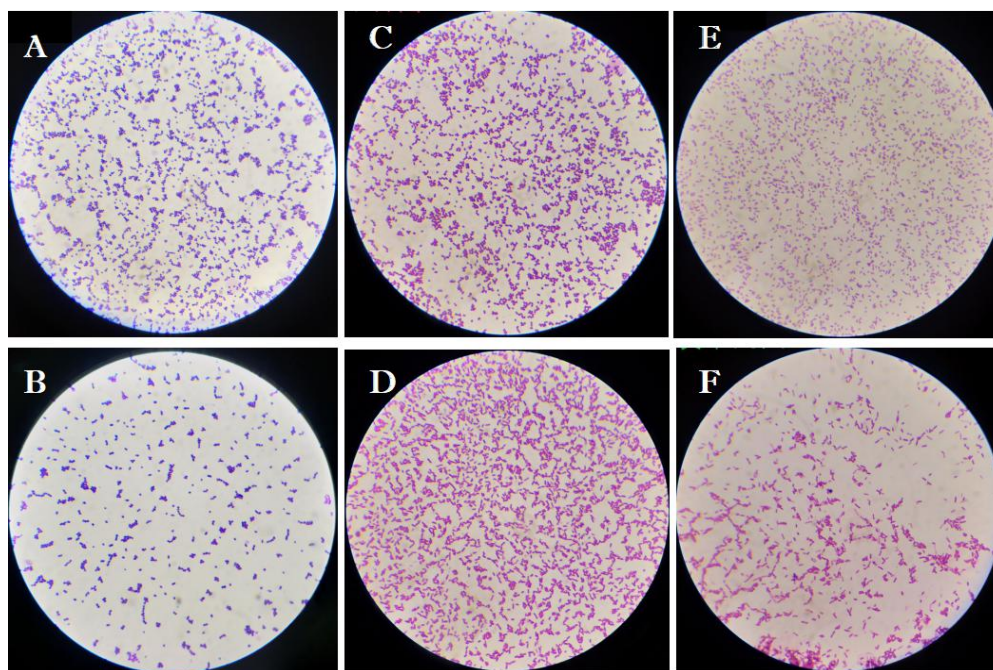


图 1.4 CRBSI 感染病原菌格兰染色 (A)金黄色葡萄球菌; (B)粪肠球菌; (C)鲍曼不动杆菌; (D)肺炎克雷伯杆菌; (E)铜绿假单胞菌; (F)大肠埃希菌

Fig1.4 Gram stain of pathogenic bacteria for CRBSI. (A)Staphylococcus aureus; (B)Enterococcus faecalis; (C)Acinetobacter Bauman; (D)Klebsiella pneumonia; (E) Pseudomonas aeruginosa; (F) Escherichia coli.

## 2.7 CVC 置管者 CRBSI 致感染病原菌分型及耐药性鉴定

### 2.7.1 CVC 置管者 CRBSI 相关 G<sup>+</sup>球菌分型及耐药性鉴定

通过初步分析发现, G<sup>+</sup>球菌占总致感染病原菌的 51.4%, 其中, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌占 G<sup>+</sup>球菌的大部分, 分别为 26%和 16.5%, 为发现对临床更具有指导意义的研究结果, 研究选取 G<sup>+</sup>球菌中占绝大部分的两种菌进行更进一步的详细分析。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是金黄色葡萄球菌的一类独特菌株, 能抵抗甲氧西林及其他抗 $\beta$ -内酰胺酶的抗生素, 而且耐药发展迅速, 是引起医院内感染的主要病原菌之一, 由于大量抗生素的使用导致其耐药性越来越强, MRSA 耐药机制复杂、独特, 其 *mecA* 基因是甲氧西林耐药性的遗传决定因子。*mecA* 基因存在于一个大小约 21~67 kb 的具有移动能力的外来 DNA 片段上, 这个 DNA 片段被命名为 SCC*mec*, SCC*mec* 主要由 *mec* 基因复合物、位点特异性重组酶基因及重复序列组成, 是 MRSA 多重耐药性产生的重要遗传学基础。根据 SCC*mec* 结构的不同可以将其分为不同基因型和亚型, 本研究通过 SCC*mec* 基因型对 MRSA 菌株进行分类, 根据 *spa* 分

型结果, 4382 份菌株共包含 13 个基因型, 以 t311 为主, 占 45.8%。其他型别为 t6418 (14.6%)、t002 (9.3%)、t030 (8.1%)、t037 (5.8%)、t2592 (4.7%)、t127 (2.3%)、t421 (2.3%)、t601 (2.3%)、t062 (1.2%)、t3388 (1.2%)、t164 (1.2%)、t12007 (1.2%), 如表 1.10 所示。

表 1.10 MRSA 菌株 spa 分型结果

Table1.10 The results of spa genotype for MRSA strains

基因型	菌株数	占比(%)
t311	2007	45.8
t6418	641	14.6
t002	408	9.3
t030	356	8.1
t037	255	5.8
t2592	207	4.7
t127	100	2.3
t421	100	2.3
t601	100	2.3
t062	52	1.2
t3388	52	1.2
t164	52	1.2
t12007	52	1.2

对上述菌株耐药性进行的鉴定结果表明, MRSA 对夫西地酸、替考拉宁、万古霉素、喹奴普汀均表现出敏感性, 对青霉素、苯唑西林均表现出较强的耐药性。结果如表 1.11 所示。

表 1.11 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性鉴定

Table1.11 Identification of drug resistance of methicillin resistant Staphylococcus aureus

抗菌药物	耐药株(n)	占比(%)	敏感株(n)	占比(%)
青霉素	4,195	95.73	187	4.27
苯唑西林	4,215	96.19	167	3.81
夫西地酸	72	1.64	4,310	98.36
四环素	2,431	55.48	1,951	44.52
利福平	2,516	57.42	1,866	42.58
喹奴普汀	254	5.80	4,128	94.20
替考拉宁	72	1.64	4,310	98.36
诺氟沙星	2,478	56.55	1,904	43.45
万古霉素	163	3.72	4,219	96.28

凝固酶阴性葡萄球菌 (Coagulase-negative staphylococci, CNS) 为革兰阳性菌, 该类细菌为球形或近似球形, 呈葡萄串状排列, 无鞭毛, 无芽孢, 革兰染色呈紫色阳性反应, 该类细菌属于需氧型细菌, 耐盐, 对培养基营养要求不高, 在液体培养时呈均匀浑浊生长分布, 菌落成中等大小、圆形, 在血平板培养部分出现溶血现象。该类细菌主要包括表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人型葡萄球菌、腐生葡萄球菌和华纳葡萄球菌等。

采用 PCR 方法对 CNS 的毒力基因、耐药基因和耐消毒剂基因进行检测, K-B 试纸片法对药敏性进行检测。CNS 毒力基因的分布情况及耐药现状的回顾性分析结果显示, CNS 毒力基因检测中检测率最高的为 *fnbp*, 占 17.5%, 其次为 *seb* 占 16%, *tsst* 占 15%, CNS 中有 56% 菌株含有 1 种毒力基因, 有 20.7% 的菌株含有 2 种及以上的毒力基因, 结果如表 1.12 所示。

表 1.12 CNS 的毒力基因型分布

Table 1.12 Distribution of virulence genotypes of CNS

基因型	检出率(%)
<i>fnbp</i>	17.5
<i>seb</i>	16
<i>tsst</i>	15
<i>see</i>	2.4
<i>sec</i>	2.5
<i>seg</i>	2.6
<i>seb+sec</i>	7.4
<i>spa+fnbp</i>	6.4
<i>sdrCED+sec</i>	3.8
<i>sspa+seb+fnbp</i>	3.1
总数	76.7

对分离所得的 CNS 病原菌进行的耐药性鉴定结果表明, 该类细菌对青霉素和氨苄西林的耐药性高达 90%, 对环丙沙星、阿莫西林、克林霉素的耐药性达到 70% 以上, 对头孢唑啉、头孢呋辛、头孢曲松、四环霉素的耐药性在 40% 左右, 对左氧氟沙星、复方新诺明、利福平耐药性较低, 对利奈唑胺、万古霉素几乎没有耐药性, 结果如表 1.13 所示。

表 1.13 凝固酶阴性葡萄球菌耐药性鉴定

Table 1.13 Identification of antimicrobial resistance of coagulase negative Staphylococcus

抗菌药物	耐药株(n)	占比(%)	敏感株(n)	占比(%)
青霉素	2,528	89.93%	283	10.07%
氨苄西林	2,507	89.19%	304	10.81%
环丙沙星	1,993	70.90%	818	29.10%
阿莫西林	1,963	69.83%	848	30.17%
克林霉素	1,978	70.37%	833	29.63%
头孢唑啉	1,176	41.84%	1,635	58.16%
头孢呋辛	1,185	42.16%	1,626	57.84%
头孢曲松	1,210	43.05%	1,601	56.95%
四环霉素	1,126	40.06%	1,685	59.94%
左氧氟沙星	516	18.36%	2,295	81.64%
复方新诺明	558	19.85%	2,253	80.15%
利福平	571	20.31%	2,240	79.69%
利奈唑胺	236	8.40%	2,715	96.58%
万古霉素	139	4.94%	2,672	95.06%

### 2.7.2 CVC 置管者 CRBSI 相关 G-球菌分型及耐药性鉴定

回顾性分析结果表明，与 CRBSI 相关的致感染菌中，G-球菌约占 46.7%，其中鲍曼不动杆菌占比 15.4%，肺炎克雷伯杆菌占比 11.2%，铜绿假单胞菌杆菌占比 10.5%，大肠埃希菌占比 9.6%。

本项回顾性分析采用随机多态性核苷酸序列 (RAPD) 方法对 2,598 例鲍曼不动杆菌的菌株进行了分型，利用 NTsys2.1e 分析系统进行分析表明，按照 80% 的相似系数，2,598 个鲍曼不动杆菌可以分为四个类型，其中 I 型 2,015 株，II 型 346 株，III 型 142 株，IV 型 95 株，这些病原菌各菌株耐药性鉴定的回顾性分析结果如表 1.14 所示，这些菌株只对头孢哌酮表现出相对高的敏感性，而对其他几种抗菌药物都有很高的耐药性。

表 1.14 鲍曼不动杆菌耐药性鉴定

Table1.14 Identification of drug resistance of Acinetobacter Bauman

抗菌药物	耐药株(n)	占比(%)	敏感株(n)	占比(%)
头孢吡肟	2,330	89.68%	268	10.32%
哌拉西林	2,412	92.84%	186	7.16%
头孢哌酮	831	31.99%	1,767	68.01%
氨苄西林	2,378	91.53%	220	8.47%
庆大霉素	2,219	85.41%	379	14.59%
环丙沙星	2,410	92.76%	188	7.24%
亚胺培南	2,319	89.26%	279	10.74%
美罗培南	2,501	96.27%	97	3.73%

本研究的回顾性分析采用 RAPD 法,对 1,881 个肺炎克雷伯菌株进行基因分型,分型结果大致可以将这些菌株分为三个类型,其中 I 型 1,021 株,II 型 452 株,III 型 408 株。同时对这些菌株的耐药性进行鉴定。结果如表 1.15 所示,其中对美罗培南、亚胺培南的敏感率最高在 90%以上;对阿米卡星、头孢哌酮、哌拉西林、左氧氟沙星的敏感率也均在 80.0%以上。耐药率最高的是头孢唑林,为 82.8%。其次为头孢呋辛和氨苄西林,分别为 74.0%、72.1%。

表 1.15 肺炎克雷伯菌耐药性鉴定

Table1.15 Identification of drug resistance of klebsiella pneumoniae

抗菌药物	耐药株(n)	占比(%)	敏感株(n)	占比(%)
阿米卡星	358	19.03%	1,523	80.97%
左氧氟沙星	339	18.02%	1,542	81.98%
头孢哌酮	350	18.61%	1,531	81.39%
哌拉西林	164	8.72%	1,517	80.65%
头孢唑林	1,558	82.83%	323	17.17%
头孢呋辛	1,392	74.00%	489	26.00%
亚胺培南	150	7.97%	1,731	92.03%
氨苄西林	1,356	72.09%	525	27.91%
美罗培南	169	8.98%	1,712	91.02%

本项回顾性分析通过对菌落状态的观察,对 1,776 个铜绿假单胞菌菌株进行的基因分型结果显示,其中粘稠假单胞菌 1,024 株,非黏稠性假单胞菌 752 株。对所有菌株进行的抗药性鉴定,结果如表 1.14 所示,对亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮保持较好的敏感性,耐药率 < 20%,对其他抗生素耐药率均 > 50%以上。

表 1.16 铜绿假单胞菌耐药性鉴定

Table1.16 Identification of drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

抗菌药物	耐药株(n)	占比(%)	敏感株(n)	占比(%)
妥布霉素	977	55.01%	799	44.99%
左氧氟沙星	1,049	59.07%	727	40.93%
头孢哌酮	284	15.99%	1,492	84.01%
哌拉西林	1,208	68.02%	568	31.98%
左氧氟沙星	1,172	65.99%	604	34.01%
头孢唑林	1,190	67.00%	586	33.00%
头孢呋辛	1,296	72.97%	480	27.03%
亚胺培南	249	14.02%	1,527	85.98%
氨苄西林	1,385	77.98%	391	22.02%
美罗培南	213	11.99%	1,563	88.01%

大肠埃希菌是以往临床研究中 CRBSI 的主要致病菌，在本项回顾性的分析中约占 9.6%。对这些菌株的分型研究也是利用传统的血清分型法，分型结果如表 1.17 所示，共有 12 个血清分型，其中 41 个菌株没有分型结果。

表 1.17 大肠埃希菌血清学分型

Table1.17 Serological classification of *Escherichia coli*

血清型别	株数(n)	占比(%)
O142K86	405	25.00%
O126K71	198	12.22%
O44K74	180	11.11%
O127K63	178	10.99%
O26K60	151	9.32%
O55K59	122	7.53%
O86K61	103	6.36%
O125K70	55	3.40%
O111K58	46	2.84%
O114K90	38	2.35%
O128K67	60	3.70%
O119K69	43	2.65%
未分型	41	2.53%

对这些菌株耐药性的回顾性分析结果如表 1.18 所示, 大肠埃希菌对亚胺培南和哌拉西林耐药性最低, 对氨苄西林和头孢唑林的耐药性较高, 都在 70%以上, 其它抗生素的耐药性也都在 40%以上。

表 1.18 大肠埃希菌耐药性鉴定

Table 1.18 Identification of drug resistance of *Escherichia coli*

抗菌药物	耐药株(n)	占比(%)	敏感株(n)	占比(%)
亚胺培南	1,377	85.00%	243	15.00%
哌拉西林	1,458	90.00%	162	10.00%
阿米卡星	745	45.99%	713	44.01%
左氧氟沙星	826	50.99%	794	49.01%
氨苄西林	1,182	72.96%	438	27.04%
头孢唑林	1,231	75.99%	389	24.01%
复方新诺明	1,069	65.99%	551	34.01%
头孢他啶	729	45.00%	891	55.00%
头孢噻肟	939	57.96%	581	35.86%
氨基糖苷	1,004	61.98%	616	38.02%

### 3 讨论

CVC 导管的留置由于其操作快捷、方便、安全系数高, 目前已在 ICU 诊断中成为重要的治疗手段, 特别是在输液、血流动力学监测、静脉营养支持等方面, 但在利用 CVC 导管为患者带来治疗优势的同时, 也潜藏着感染的危险。因其是一种有创诊疗手段, 容易引发 CRBSI 和其它并发症, 这也成为目前医院中具有潜在致命危险的最常见的感染性疾病之一<sup>[26]</sup>。大量临床统计数据显示, 在英国每年有接近 200,000 人置入 CVC 导管<sup>[27]</sup>, 在 ICU 内 CRBSI 的发生率在 7%~10%左右<sup>[28]</sup>。据美国医疗机构评鉴联合会 (Joint Commission on Accreditation of Health Care Organization, JCAHO) 统计, 美国每年有 250,000 到 500,000 的 CVC 导管相关血源性感染, 死亡率为 20%-30%<sup>[29-30]</sup>, 医院 ICU 中每年发生 CRBSI 的人次在 8 万左右, 发生 CRBSI 的频率为 2.9~11.3/千导管日<sup>[8]</sup>, 在新生儿重症监护病房 (Neonatal Intensive Care Unit, NICU) CRBSI 的发生率为 0.6-2.5/千导管日<sup>[30]</sup>。据美国疾病控制与预防中心 (Centers Disease Control and prevention, CDCP) 统计, ICU 患者医院获得性感染约 20%为血流感染, 其中近 87%与 CVC 有关, 且 ICU

的 CRBSI 的病死率为 20~60%<sup>[31]</sup>。本研究结果显示, CVC 导管培养感染率为 6.4~7.9/千导管日, 平均为 5.7/千导管日, CRBSI 的发生比率与全世界范围内统计结果基本相一致。

CRBSI 的发生是一系列复杂的综合因素共同作用的结果, 首要因素为致感染的病原菌。大量研究结果显示, 导致 CRBSI 发生的常见致病菌为 G<sup>+</sup>菌, 病原菌类型主要包括: 凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌、念珠菌<sup>[31]</sup>。

本研究显示, 其中凝固酶阴性葡萄球菌中的表皮葡萄球菌所占比例较大, 分析原因可能是由于所纳入研究的全部 CRBSI 病例都有导管尖端或节段的培养进行证实, 都为确诊病例, 而其他研究中的研究对象大多采用临床标准进行界定, 这可能包含了一部分原发 CRBSI 的病例患者, 这些研究结果也与我们团队在 2010 年的报道结果相一致, 但也略有不同, 本研究中鲍曼不动杆菌排名第二, 分析原因可能是由于所选研究对象的基础情况、抗菌药物压力等差异导致病原菌分布有一定差异<sup>[32]</sup>。近些年来 CNS 在 CRBSI 中的角色日益凸显, 可能原因有: 该类细菌极易在表皮或导管表面残留、定植, 其中气管插管、中心静脉插管导尿等侵袭性操作应用的增多也是血培养中最为常见的污染菌。本研究结果显示, CRBSI 病原菌的特点: 纳入研究的 16,841 例患者中, 16,507 例患者是由一种病原菌感染, 331 例双重感染, 3 例为三重感染。此次研究共分离病原菌 16,905 株, 检出时间为 2~60 d, 平均 15 d。病原菌中 G<sup>+</sup>者 8,709 株 (51.4%), G<sup>-</sup>者 7,875 株 (46.7%), 真菌 321 株 (1.9%), 与这一结论高度相符。鲍曼不动杆菌的比例较高, 与一些现有的研究结果相一致, 究其原因, 很多留置 CVC 患者病情较为严重, 很大比例的患者合并多种并发症, 尤其是 ICU 患者, 甚至是给予呼吸机辅助呼吸治疗, 一旦发生感染, 首先要考虑肺部的感染。

本研究结果同时显示, CNS 的检出率呈逐年递增的趋势, 并且 MRCNS 的检出比例要高于 CNS 的检出率, 这个研究结果与前人的相关研究结果相一致<sup>[33-34]</sup>, 而且从耐药性检测试验可以看出, CNS 对多种抗菌药物的耐药率呈高水平, 对青霉素和氨苄西林耐药率最高, 达 90%以上, 对头孢唑啉、头孢呋辛、头孢曲松、四环霉素的耐性在 40%左右, 对左氧氟沙星、复方新诺明、利福平耐药性较低, 对利奈唑胺、万古霉素几乎没有耐药性。有研究证实以表皮葡萄球菌为主的 CNS 正逐渐成为患者难治性感染的重要病原菌之一, 所以这些病原菌也成为导管相关性血行感染的重要病原菌。在前人的研究中, 这些病原菌对苯唑西林的耐药性达到了 60%以上, 并且呈现出多重耐药的特征<sup>[35]</sup>, 在我们的研究中 CNS 也呈现出多重耐药特质, 对青霉素、苯唑西林、四环素和利福平都有很强的耐药性, 由此可以看出, CNS 类病原菌的耐药性较强, 所以为了减少置管过程中此类病原菌的感染概率, 应该将侵入性操作的次数降到最低, 如果一旦发生此类感染, 要根

据药敏实验的结果合理选择抗生素, 尽量避免联合抗生素和不合理抗生素使用的情况发生, 在临床中, 如果没有发生感染避免尽量减少或不使用预防抗生素的使用, 这样可以降低抗生素对病原菌抗性的选择压, 避免了耐药菌株的出现<sup>[36-37]</sup>。

表皮葡萄球菌的耐药机制非常复杂, 根据之前的研究可以将其耐药机制总结为: (1) 生物膜的形成。(2) 耐药基因的作用。该病原菌携带 *mecA* 基因, 这一基因编码一种低亲和力的青霉素结合蛋白, 这类蛋白可以对所有 $\beta$ -内酰胺类抗生素如青霉素、头孢霉素等产生耐药性, 并且 *mecA* 基因可以通过基因转座子或质粒在菌株间进行传播, 使其它菌株也产生类似的耐药性<sup>[38]</sup>, 另有研究发现, 这类病原菌的质粒或基因中含有氨基糖苷类和喹诺酮类的耐药基因, 所以对这两类抗生素也产生耐药性, 这也是这类病原菌产生耐药性的原因, 因此导致临床上对这类病原菌的治疗更加困难, 这也是在大多数研究中表皮葡萄球菌占感染病原菌比例较高的主要原因。此外, 有研究从眼部病理标本中分离出的表皮葡萄球菌对加替沙星和莫西沙星都具有很强的耐药性, 进一步分析发现, 这主要是由于 *gyrA* 和 *parC* 基因突变导致的<sup>[39]</sup>。另有耐药性实验发现, 这两个基因的突变还与对喹诺酮类药物敏感性降低有很大的关系<sup>[40]</sup>。(3) 酶功能作用。在研究中发现, 有 80% 的表皮葡萄球菌都会产生 $\beta$ -内酰胺酶,  $\beta$ -内酰胺酶通过其蛋白活性中心的丝氨酸位点与 $\beta$ -内酰胺环相结合, 从而打开 $\beta$ -内酰胺环, 导致抗生素失去活性, 而产生很强的耐药性。目前, 关于凝固酶阴性葡萄球菌耐药性日趋严重的报道屡见不鲜, 加之这类病原菌耐药机制非常复杂, 已经成为临床治疗的棘手问题, 因此在临床中, 特别是 CVC 置管过程中坚持长期的细菌耐药性检测, 根据病原菌药敏实验结果选择合适的抗菌药物, 并全面掌握抗菌药物的适应症是切实可行的策略。

肠球菌是一类圆形或椭圆形呈链状排列的  $G^+$  球菌, 在自然界中广泛分布。近些年的大样本研究发现, 该菌多在人体感染伤口、呼吸道及泌尿道等部位中存在, 尤其是随着近些年临床中由于治疗所需的侵袭性操作的广泛应用, 免疫抑制剂的使用, 以及广谱抗生素的大量使用, 由肠球菌引发的感染日益增多, 是美国医院血流感染的第四大常见病原菌<sup>[6]</sup>。根据 NNIS 数据, 300 多家参与医院的 ICU 中超过 28% 的肠球菌对万古霉素耐药<sup>[41]</sup>。

肠球菌因 *esP*、*gelE*、ACE 等毒力基因的作用, 具有天然固有和后天获得的耐药性, 对临床治疗中药物的选择带来了极大的困难。内在本质上, 肠球菌因含有青霉素结合蛋白(PBPs), 通过合成一些细胞壁成分, 使得其有很强的耐受或抵制 $\beta$ -内酰胺类抗生素的能力, 表现为临床治疗中对青霉素酶敏感青霉素(低水平)、青霉素酶抗性青霉素、头孢菌素、萘啶酸、氨基糖苷类、大环内酯类以及克林霉素和氨基糖苷类低水平具有内在抵抗性。同时, 肠球菌具有获得性的耐药

性,包括 $\beta$ -内酰胺酶、氯霉素、四环素、利福平、氟喹诺酮、氨基糖苷类(高水平)和万古霉素的耐药性。肠球菌所致的感染常常发生在老年或者虚弱患者人群,因其引发的菌血症所致的可归因死亡率为 31%-37%<sup>[42]</sup>。对临床 CVC 置管者而言,该菌所引发的感染所带来的问题不断攀升。

有统计研究发现,鲍曼不动杆菌的耐药性越来越强,呈现一种耐药程度高、耐药性复杂的发展趋势。通过耐药实验研究发现,鲍曼不动杆菌对米诺环素表现出较大的敏感性,而对美罗培南的敏感性只有 50%,并且对其它抗生素都表现出很强的耐药性<sup>[43-44]</sup>,使我们在临床医学中对这种菌的灭菌面临很大的调整,而且这类细菌对生长的营养条件要求并不高,还表现出对消毒剂的高耐抗性,所以该菌能够在医院中长期存活。如果单纯靠增加抗菌药物浓度,反而会加速其变异,使其进化出更强的抗药性,这也是临床医学中比较棘手的问题。

其他病原菌的耐药性相对较低,并且对不同抗生素的敏感性差异巨大。如在前人的研究中发现肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素最为敏感,表现出耐药率为零的现象,并且对其它抗生物如阿米卡星、替卡西林、头孢哌酮、舒巴坦、克拉维酸、哌拉西林、他唑巴坦的耐药率在 20%~44%之间,对像头孢唑啉、头孢吡肟、氨苄西林、头孢西丁的耐药率几乎为 100%,而对其它抗生素的抗药性大约在 50%左右。基于每种菌对抗菌药物敏感程度不同,需要对不同的菌施以不同的抗菌药物处理,只有这样才能真正达到灭菌的效果<sup>[45]</sup>。对假单胞菌属的研究发现,其耐药机制非常复杂,关系到外膜蛋白的损伤、碳青霉烯酶的特性以及药物通过解毒系统排出等复杂的机制。有研究组通过对不同抗菌药物筛选实验发现假单胞菌对哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南最敏感,其耐药率约仅为 14%,对亚胺培南的耐药率为 29%左右,对左氧氟沙星的耐药率为 43%左右,可以发现对后两种药物的耐药性相对较高,所以针对假单胞菌的相关灭菌时应选用合适的抗菌剂。

另外有研究通过铜绿假单胞菌对左氧氟沙星耐药性研究发现,其耐药率约为 43%。提示临床在抗生素的选用时要更加慎重,特别是对第三代头孢菌素的使用上,在针对产生 ESBL 的菌株时要慎用青霉素类、头孢菌素类、单环类抗菌药物而改选用亚胺培南等碳青霉烯类抗菌剂<sup>[46]</sup>。 $G^+$ 细菌应作为预防和控制的主要目标,但多重耐药  $G^+$ 细菌引起的感染也应予以高度关注。导管尖端和血培养已成为诊断 CRBSI 必不可少的手段,亦可及时反映治疗效果。因此,通过血和导管尖端培养及时掌握本地区、本科室 CRBSI 病原菌分布及其对抗菌药物的耐药现象和动态,对合理应用抗菌药物具有重要指导意义。同时根据病原菌药敏结果选择合适抗菌药物治疗,避免滥用抗菌药物,减少耐药菌株的产生,这样既可迅速控制感染,又可预防耐药菌株的增加和扩散。ICU 内 CRBSI 的病死率仍然较高,老年、发病时病情程度、复数菌感染是患者不良预后的高危险因子,临床上应积

极筛查，为早期判断及干预创造时机。

本研究结果还显示，影响 CRBSI 临床用药效果的因素中，奈唑胺、奎奴普丁/达福普丁的耐药性几乎为零，但是在 IDSA 指南中并不建议将利奈唑胺作为治疗 CRBSI 的首选，而建议对 MSRA 导致的这种持续性菌血症或者是使用万古霉素治疗失败的患者可以选用上述几种抗菌剂进行治疗，由于葡萄球菌对青霉素类、大环内酯类和一代青霉素的耐药率约为 63%，所以在治疗葡萄球菌引发的感染时尽量避免用上述几种抗菌剂。在临床上要根据感染菌株的不同类型选择不同的抗菌剂，只有这样才能达到最好的治疗效果，同时避免药物选择不当而导致的治理不利。

此外，CRBSI 的发生也与一些客观条件密切相关，如社会经济发展不平衡、不同的社会年代、不同的医院规模、不同的专科设置、置管时的环境、置管者的感控依从性、置管后患者自我管理等相关，同时也与不同的实验设计、不同疾病构成等有关<sup>[31,47]</sup>。分析或许存在以下原因：（1）国内对导管相关性血流感染进行统计时，多只考虑单一因素，而没有考虑导管置留对感染率造成的影响。（2）临床对于规范送检的要求尚存在不统一之处，即送检必须要同时具备导管尖端标本和外肘静脉血标本，而非单一标本。（3）统计数据的不完整性。本研究显示，影响 CRBSI 发生的因素位居首位的是患者自身合并多种并发症，其次为置管者感控依从性尚欠缺，以及置管前的评估不到位，这三类原因将作为今后指导临床对 CRBSI 预防及诊治策略的切入点，重点进行防范和改进，以提升 CVC 置管的安全性，降低 CRBSI 的发生率。

## 4 小结

大样本临床病例的回顾性研究，明确了 CVC 置管者 CRBSI 发生的流行病学特征，为进一步指导临床 CRBSI 的预防及诊治工作，提供了较为重要的参考价值。对 CVC 置管者 CRBSI 发生的病原菌生物学特性分析的结果显示，CVC 置管者 CRBSI 的致感染病原菌以肠球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌等 6 类为主。

同时，本项研究也存在不足之处。首先，该部分研究为回顾性资料分析、单中心调查研究，可能会造成研究结论的局限性。不过 APACHE II 评分为把握总体病情提供了客观参照，部分补偿了某些重要因素，如血流动力学不稳定等。其次，参照本次研究，在单因素分析中循环系统基础疾病、性别及消化道出血在两组间也存在显著差异的情况，之所以未能通过多元 logistic 回归可能与病例规模过小有关。由于样本量有限，该研究中并未设定基于不同入院诊断的亚组进行分

析,有可能造成多因素交互作用分析的偏倚。最后,在入住 ICU 的老年患者所占比例较高,并不能反映全国或全世界各医院的情况,可能部分解释了与文献中所报道的病死率相比我院的 CRBSI 病死率偏高。在今后的工作中,将进一步健全本单位、本地区医院 CRBSI 的病原学特点及发生率等相关的数据系统,多中心进行致感染病原菌分布、药物敏感性及感染因素等的实时监测,总结相关感染发生的主要原因,及时找出相应的解决办法,以期更好地降低 CRBSI 的发生率。

SCCmec 是 MRSA 的耐药性基因岛与耐药基因传递、多重耐药性关系密切<sup>[48-49]</sup>, MRSA 已成为社区和医院人群感染的常见致病菌,由于其致病能力强,耐药谱广,会对公众的健康造成严重感染,并使临床抗感染面临极大困难,由此备受医学界关注。更由于不同国家、不同地区间流行的 MRSA 基因型别不同,且菌株型别不断变异,熊祝嘉等人对 7 所医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学及耐药性研究,发现每个医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的基因型都不尽相同<sup>[50]</sup>,我们的研究结果也证实了相似的结果,以 t311 基因型最多,占 45.8%,因此,在抗生素选择时可以根据本医院病原菌基因型进行有目的的选择,避免抗生素的滥用。本医院凝固酶阴性葡萄球菌的毒力基因的分布情况分析表明,毒力基因分布差异较大,检测率最高的为 *fnbp*, 占 17.5%,其次为 *seb* 占 16%, *tsst* 占 15%,并且 CNS 中有 32.5%菌株含有 1 种毒力基因,这说明不同菌株对抗生素抗性有所差异,这与前人的研究结果基本一致<sup>[51-52]</sup>。随机多态性核苷酸序列 (RAPD) 基因型分型法已广泛应用细菌分型和基因型的鉴定中,本研究通过 RAPD 法对鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌基因型进行鉴定并进行了聚类分析,也表明基因型与抗药性方面也存在一定的相关性,这为后期临床抗生素的科学应用提供了理论依据。

综上所述,CVC 置管者发生 CRBSI,不仅仅与致感染病原菌的流行病学特征及病原菌的生物学特性、机体自身的状况、环境等因素密切相关,同时也与病原菌自身生物学特性存在重要的关联性。研究表明,病原菌的毒力基因是其引起机体发生感染的重要原因之一<sup>[53]</sup>,故此对于 CVC 置管者 CRBSI 占比较高的 6 类病原菌毒力基因与其致感染的相关性研究需要更进一步深入的研究。

## 第二部分 CVC 置管者与未置管者主要致感染病原菌毒力基因的检测与分析

CVC 置管者 CRBSI 的发生是多种因素综合作用所致，致感染的病原菌是首要因素，菌类自身的生物学特性与机体之间的相互作用，是导致感染发生的关键点。其次，也与置管者自身状况、置入导管的选择、置管前的准备工作、准确的评估、置管者的操作水平、置管过程中的质量控制、导管留置的时长以及导管留置后的管理及维护等诸多因素密切相关<sup>[53-55]</sup>。

病原菌致病性的强弱取决于其毒力，同种病原微生物不同菌株或菌株不同程度的致病能力称为毒力，构成毒力的物质称为毒力基因<sup>[6]</sup>。目前，对于大多数致感染的病原菌而言，较多的研究主要集中在分子流行病学和耐药机制等方面<sup>[6,22,56-59]</sup>，而对其毒力基因与特定状态的人体是否发生感染之间的相关性，进行的研究则尚处于起步阶段。本研究将进行 CVC 置管者与未置管者主要致感染病原菌毒力基因的检测与分析的相关研究。

### 1 研究材料与方法

#### 1.1 研究材料

##### 1.1.1 研究对象

2017 年 9 月-2018 年 9 月，将入住 ICU 的患者，100 例留置 CVC 导管的患者作为实验组，100 例未留置 CVC 导管的患者为对照组，进行前瞻性的研究。

##### 1.1.2 排除标准

①孕妇；②年龄<18 岁者；③慢性器官衰竭者；④肿瘤确诊者。

##### 1.1.3 伦理审查

通过伦理委员会审批（批件号：2018A-106）。

#### 1.2 研究方法

##### 1.2.1 血液样本的提取

实验组与对照组个体均在 ICU 内，由具有执业资质的专业人员采集外周静脉血样本 5 ml。送检由专业运输人员完成，实验工作均由研究团队有资质的专业

人员按流程要求完成，一系列工作均遵循严格的 SOP 要求。

## 1.2.2 RNA 提取

### 1.2.2.1 RNA 提取实验前的准备

(1) 尽量使用一次性塑料器皿，一次性无酶微量离心管及枪头；若使用玻璃器皿，应在使用前在 160°C 下干热灭菌 2 小时以上；不能干热灭菌的器皿用 0.1%DEPC 水溶液在 37°C 下处理 12 小时，然后再 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

(2) 使用试剂须用 0.1%DEPC 处理的灭菌水配制后再进行高温高压灭菌。

(3) 实验过程中务必使用一次性塑料手套和口罩，以避免 RNase 污染。

### 1.2.2.2 样品的研磨和匀浆

(1) 将 0.5 ml 样品移至 EP 管中，添加 1 ml Trizol Reagent;

(2) 用移液枪缓慢吸打混合液至完全裂解;

### 1.2.2.3 Total RNA 的提取

(1) 向上述的匀浆裂解液中加入氯仿 300  $\mu$ l，盖紧 EP 管盖，混合至溶液乳化呈现乳白色;

(2) 室温静置 5 分钟;

(3) 12,000 $\times$ g、4°C 离心 15 分钟，小心取出离心管，RNA 存在于上层清液中;

(4) 吸取上清液移至新的 EP 中（勿要吸出白色中间层）;

(5) 向上清中加入等体积的异丙醇，上下颠倒 EP 管充分混匀后，室温下静置 8-12 分钟;

(6) 12,000 $\times$ g、4 °C 离心 10 分钟，试管底部会出现肉眼可见的 RNA 沉淀块。

### 1.2.2.4 RNA 沉淀的清洗

弃上清，加入等量的 75%乙醇（用 DEPC 水和无水乙醇配制），使用 Vortex 振荡清洗沉淀后，7,500 $\times$ g、4°C 离心 5 分钟，弃上清。

### 1.2.2.5 RNA 的溶解

倒置 EP 管于干净滤纸上，室温干燥沉淀 3-5 分钟。沉淀干燥后，加入 40  $\mu$ l 的 DEPC 水溶解沉淀。

### 1.2.2.6 RNA 纯度分析（吸光度分析）

打开紫外分光光度计，100  $\mu$ l DEPC 水清洗测量杯 2 次，取 4  $\mu$ l 上述所提 RNA 加入 96  $\mu$ l DEPC 水（25 倍稀释）；测量 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>、OD<sub>320</sub> 吸光值，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.8~2.0 范围内较好。

$$\text{RNA 浓度 (ug/ul)} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times \text{稀释倍数} \times 0.04$$

### 1.2.2.7 去除基因组 DNA 反应

按表 1.1 在冰上配制反应液，其中按反应数+2 的量配制 Master Mix，再分装到每个反应管中，最后加入 RNA 样品。将反应液放在 42°C 水浴箱中 2 分钟，4°C 保存。

表 1.1 反应液配制

Table 1.1 Preparation of reaction solution

试剂	使用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
Total RNA	≤1 μg
Rnase Free dH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl

### 1.2.2.8 反转录反应

按表 1.2 在冰上配制反应液。先按反应数+2 的量配制 Master Mix，再分装 10 μl 到每个反应管中，轻轻混匀后立即进行反转录反应。将反转录液放入反转录仪中，设定反应体系（37°C 15 分钟后 85°C 5 秒），4°C 20 分钟，-20°C 保存。

表 1.2 反转录液配制

Table 1.2 Preparation of reverse transcript

试剂	使用量
表 1.1 的反应液	10.0 μl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 μl
RT Primer Mix	1.0 μl
5×PrimeScript Buffer 2	4.0 μl
Rnase Free dH <sub>2</sub> O	4.0 μl
Total	20 μl

} Master Mix

## 1.2.3 荧光定量 PCR 反应

### 1.2.3.1 引物

引物设计及合成均由宝生物（大连）生物有限公司完成，具体引物序列如下：

表 1.3 PCR 引物序列

Table1.3 PCR primer sequences

基因	引物序列
Esp	前引物 (F) : CACACGGAAAGTACCCCATTCT 后引物 (R) : TGCCAGTGCTCTTATCTAAAG
agg	前引物 (F) : CGCTTTGTCTTCTCCCTTGT 后引物 (R) : CCGATGCCCAGGTTCTTCT
asal	前引物 (F) : CTGTTCTGGGCTTCGCTGT 后引物 (R) : TCCCGTGCTGTAGGCATCT
gelE	前引物 (F) : CGCAATGTTATCCCGTCGTT 后引物 (R) : AGGTGGTGGTGGTTCGCTTT
cylA	前引物 (F) : ATGGTCATGGTACACAAGTTGCT 后引物 (R) : ATAGAGTTTCCATCTGTCCCAT
Exos	前引物 (F) : TGGTGGCATCCACAGTGA 后引物 (R) : TTTGTCCCGCATCCAGTTC
exoT	前引物 (F) : GCAGTTGGACGGCGATT 后引物 (R) : CTTTGACAGCGGAGAGA
exou	前引物 (F) : CTTGGCGGGTAGGCTCAAGT 后引物 (R) : GGCGATACAGAGAGGGGAAG
exoy	前引物 (F) : TGAGCGAGGACGGATTCTATG 后引物 (R) : GGTGAAACATCTCCCTGTGCT
eaeA	前引物 (F) : GAGGTTTAGGGATCTTCCTG 后引物 (R) : ATACTGCGTGGTCGGGTCTT
stx2	前引物 (F) : GACGTGGACCTCACTCTGAA 后引物 (R) : ATTCTCCCCACTCTGACACCA
plc-N	前引物 (F) : TGCCGATATGCAGGACGA 后引物 (R) : TTCACCCAACCACCACGA
bimS	前引物 (F) : CCCCTACCTCCCTACAGAC 后引物 (R) : GATACGCCGCAACTCTTGG
abal	前引物 (F) : CCAAATCTCCTCCCACCAT 后引物 (R) : TGTCGTCCCAGCCACTTTC
CsuA	前引物 (F) : CTTCTATGGGAATACGTTG 后引物 (R) : TCGTGTCTGCGTTTTTCATCC
ompA	前引物 (F) : ACGCTGGTGTGTTGGTGCTTT 后引物 (R) : CTGGCTTGTATTGGTCTTTG
bap	前引物 (F) : AGCCACAGTTGATGCCGTAG 后引物 (R) : CAAGTCCAGCAAGCGATACA
mecA	前引物 (F) : GGGTATTGCTCTTCTTCTTTTCT 后引物 (R) : GTGGACAGGGAGGTTTATGGA
icaA	前引物 (F) : TGTGTGTGTGTGTGTGTGTTT 后引物 (R) : ATTCATCGCTCCAGACCTCCT
ACCESSION U43366	前引物 (F) : TGACAATGCCTTTCCTGTTTTG 后引物 (R) : CCCATAAGCCTGTTTCATACAT
ybts	前引物 (F) : AGCATATCCTTCTGTCAAAGAAGC 后引物 (R) : GAACCGACATTAATCTTCAACCAC
iron	前引物 (F) : ACAGGTTGAGCGTATCGAAGT 后引物 (R) : TTGGAGGGACGTTTGGTAATG
htrA	前引物 (F) : AGTTTAGGTCTGGCGTTGTC 后引物 (R) : GCATCACCTTCTCCAGCATC

基因	引物序列
ACE	前引物 (F): ACGGAGCAGGCCAACATCAAGCA 后引物 (R): TTTGATTGCCGCTTGCCCTCGCCTT
表皮葡萄球菌 16S 序列	前引物 (F): GAGTTTGATCMTGGCTCA 后引物 (R): CTAHAGGGTATCTAATCCT
鲍曼不动杆菌 16S 序列	前引物 (F): ATGACCAGCCACACTGGAA 后引物 (R): CTCCTCCCCGCTGAAAGTG
大肠埃希菌 16S 序列	前引物 (F): GCCCCTTCCAGATTACTTTATAT 后引物 (R): TGCTTAATATATTTTCTTTATATG
铜绿假单胞菌 16S 序列	前引物 (F): ATCAAGTACAGTTAGTCT 后引物 (R): ACGATTCAAAGCTAACTG
肠球菌 16S 序列	前引物 (F): GAGTAAATCCATGAACGA 后引物 (R): CGCTGATGGTATCGATTCAT
肺炎克雷伯 16S 序列	前引物 (F): ATGACCAGCCACACTGGAA 后引物 (R): CTCCTCCCCGCTGAAAGTG

### 1.2.3.2 配制 PCR 反应液

按下列组分配制 PCR 反应体系 (在冰上进行)

表 1.4 PCR 反应体系配制

Table1.4 Preparation of PCR reaction system

试剂	使用量
SYBR Premix Ex TaqII	12.5 $\mu$ l
PCR Forward Primer(10uM)	1.0 $\mu$ l
PCR Reverse Primer(10uM)	1.0 $\mu$ l
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	8.5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

### 1.2.3.3 进行 Real Time PCR 反应

ViiA7Dx 实时荧光定量 PCR 仪进行 Real Time PCR, 反应条件如下:

表 1.5 PCR 反应条件

Table1.5 PCR reaction conditions

温度时间	循环数
95°C, 30 s	1 个循环 (预变性)
95°C, 5 s	40 个循环 (PCR 反应)
62°C, 30 s	
95°C, 15 s	1 个循环 (产物溶解)
60°C, 30 s	
95°C, 15 s	

### 1.2.4 统计方法

应用 SPSS 19.0 软件进行数据处理及结果的分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示；计数资料以频数表示；计算每个样本实验组与对照组中目的基因的  $\Delta Ct$ :  $\Delta Ct = \text{average Ct} - \text{average of HK genes' Ct}$ ，计算对照组目的基因的  $\Delta Ct$  的均值，计算实验组中每个样本目的基因的  $\Delta\Delta Ct$ :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct'$ ，最终通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算每个样本实验组与对照组目的基因表达的差异性。采用 Graphpad prism6.0 进行统计学分析并作图。

### 1.3 主要仪器及试剂

仪器名称	厂家
紫外可见分光光度计	上海美谱达公司
Centrifuge	美国 Thermo
纯水系统	美国 Millipore
电热型恒温水槽	上海森信仪器厂
超净台	上海上净净化设备有限公司
PCR 仪	美国 BIO-Rad
7900 Fast Real-Time PCR System	美国 Applied Biosystems
ViiA 7 Real-time PCR System	美国 Applied Biosystems
TRIZOL 试剂	Invitrogen
氯仿、异丙醇、100%乙醇	上海化学试剂有限公司
无 RNA 酶的糖原	Ambion
RNeasy®MinElute™ 纯化试剂盒	Oiagen
10mM TE、Tris-HCL、0.4M MOPS	华美生物工程公司
0.1M 乙酸钠、甲醛	上海化学试剂有限公司
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen
RNase Inhibitor	Epicentre
2*SuperArray PCR master mix	Cat. No. 330522
PCR Array	Qiagen

## 2 实验结果

### 2.1 研究对象基本信息

两组研究对象的基本资料如下：实验组包含 53 位男性和 47 位女性，平均年龄为  $49.05 \pm 6.07$  岁；对照组包括 62 位男性和 38 位女性，平均年龄为  $50.02 \pm 6.20$  岁，统计分析显示，两组在年龄及性别比例上均无明显差异，排除了性别和年龄差异对实验结果的影响。结果见表 2.1。

表 2.1 研究对象基本资料

Table 2.1 Basic information of research objects

基本资料	实验组 (n=100)	对照组 (n=100)	<i>P</i>
年龄(岁)	49.05 ± 6.07	50.02 ± 6.20	0.381
性别(男/女)	53/47	62/38	0.198
感染来源(n, %)			
外周血液	21 (21.00)	13(13.00)	0.132
肺部	30(30.00)	25(25.00)	0.527
腹部	35(35.00)	18(18.00)	0.010
伤口	8(8.00)	42(42.00)	0.000
其他部位	6(6.00)	2(2.00)	0.279
致感染的病原菌			
肠球菌	24 (24.00)	18(18.00)	0.600
鲍曼不动杆菌	22(22.00)	20(20.00)	0.862
肺炎克雷伯杆菌	19(19.00)	24(24.00)	0.491
铜绿假单胞菌	12(12.00)	9(9.00)	0.645
大肠埃希菌	10(10.00)	11(11.00)	1.000
表皮葡萄球菌	9(9.00)	12(12.00)	0.645
其他菌	2(2.00)	3(3.00)	1.000
混合感染	1(1.00)	2(2.00)	1.000
未知感染	1(1.00)	1(1.00)	1.000

## 2.2 6 类病原菌毒力基因实验结果

### 2.2.1 肠球菌毒力基因实验结果

通过检测肠球菌的感染相关基因 *esP*、*agG*、*asaL*、*gelE*、*cylA*、*ACE* 在各实验组的表达水平。结果显示，与对照组相比，各实验组的感染相关基因 *esP*、*gelE*、*cylA*、*ACE* 的表达水平较高，且差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )，*agG*、*asaL* 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。表明在留置 CVC 导管组中 *esP*、*gelE*、*cylA*、*ACE* 的表达水平高于未留置 CVC 导管组，说明 *esP*、*gelE*、*cylA*、*ACE* 等基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。结果见图 2.1。

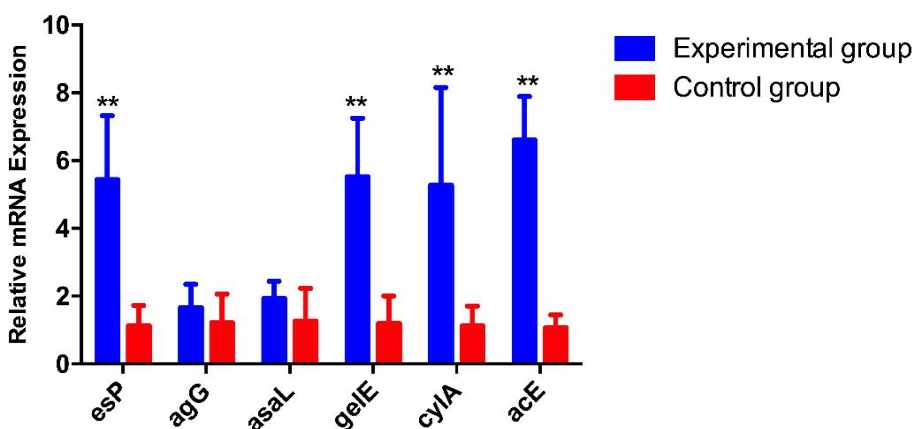


图 2.1 肠球菌毒力基因表达水平

Fig2.1 Enterococcus Virulence gene expression level

\*\*表示  $P<0.01$

### 2.2.2 鲍曼不动杆菌毒力基因实验结果

通过检测鲍曼不动杆菌的感染相关基因 *plcN*、*baP*、*ompA*、*csuA*、*abaL*、*bimS* 在各实验组的表达水平。结果显示，与对照组相比，各实验组的感染相关基因 *baP*、*ompA*、*csuA* 的表达水平较高，且差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )，*plcN*、*abaL*、*bimS* 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。表明在留置 CVC 导管组中 *baP*、*ompA*、*csuA* 的表达水平高于未留置 CVC 导管组，说明 *baP*、*ompA*、*csuA* 等基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。结果见图 2.2。

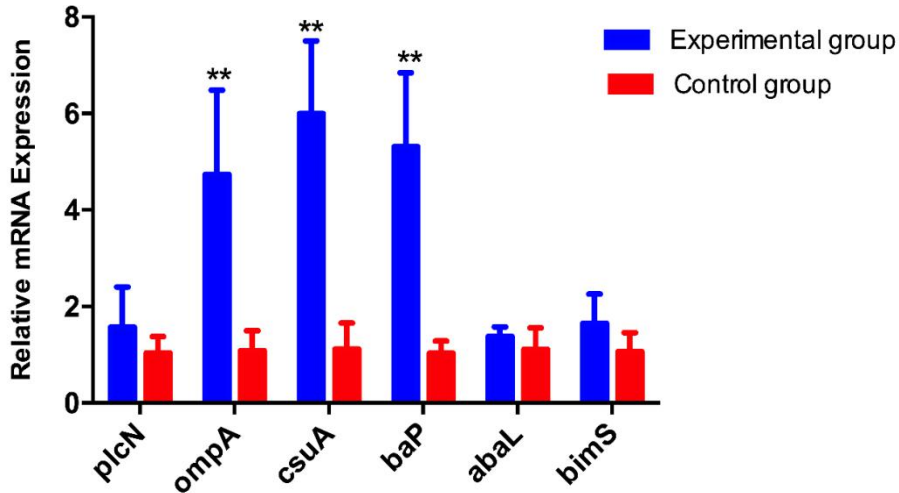


图 2.2 鲍曼不动杆菌毒力基因表达水平

Fig2.2 Acinetobacter baumannii Virulence gene expression level

\*\*表示  $P < 0.01$

### 2.2.3 肺炎克雷伯杆菌毒力基因实验结果

通过检测肺炎克雷伯杆菌的感染相关基因 *iroN*、*htrA*、*ybtS* 在各实验组的表达水平。结果显示，与对照组相比，各实验组的感染相关基因 *iroN*、*htrA* 的表达水平较高，且差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，*ybtS* 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。表明在留置 CVC 导管组中 *iroN*、*htrA* 的表达水平高于未留置 CVC 导管组，说明 *iroN*、*htrA* 等基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。结果见图 2.3。

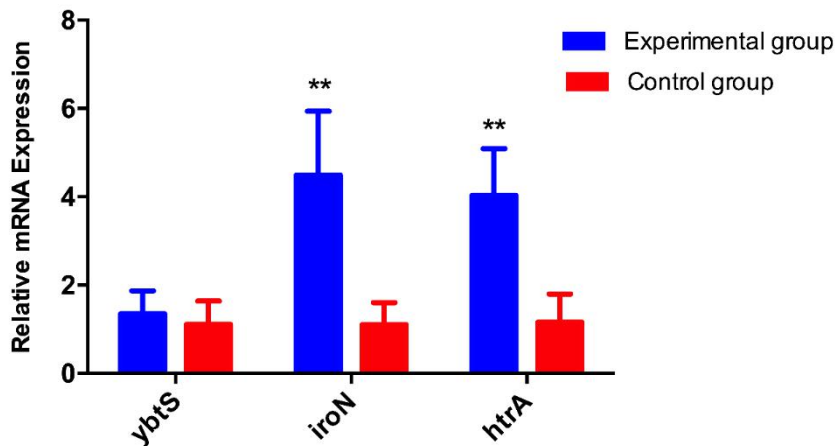


图 2.3 肺炎克雷伯杆菌毒力基因表达水平

Fig2.3 Klebsiella pneumoniae Virulence gene expression level

\*\*表示  $P < 0.01$

#### 2.2.4 铜绿假单胞菌毒力基因实验结果

通过检测铜绿假单胞菌的感染相关基因 *exoS*、*exoT*、*exoU*、*exoY* 在各实验组的表达水平。结果显示，与对照组相比，各实验组的感染相关基因 *exoS*、*exoT*、*exoU*、*exoY* 的表达水平较高，且差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。表明在留置 CVC 导管组中 *exoS*、*exoT*、*exoU*、*exoY* 的表达水平高于未留置 CVC 导管组，说明 *exoS*、*exoT*、*exoU*、*exoY* 等基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。结果见图 2.4。

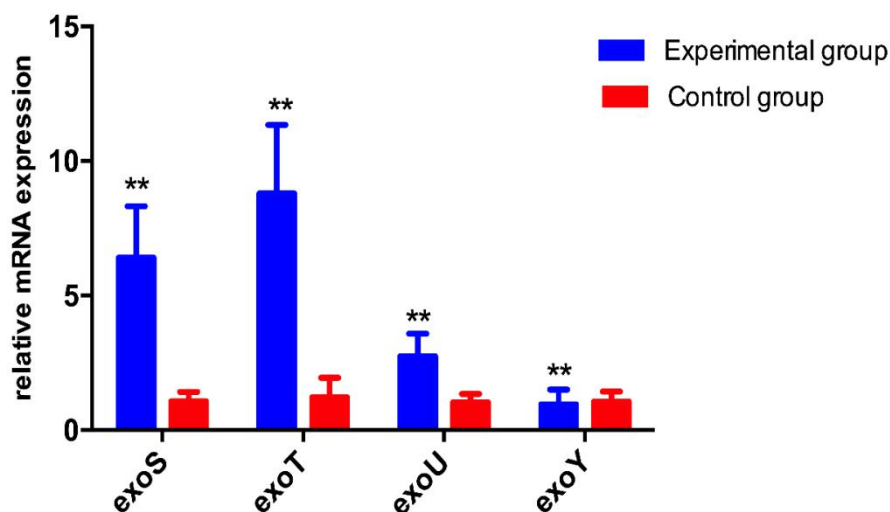


图 2.4 铜绿假单胞菌毒力基因表达水平

Fig2.4 *Pseudomonas aeruginosa* Virulence gene expression level

\*\*表示  $P<0.01$

#### 2.2.5 大肠埃希菌毒力基因实验结果

通过检测大肠埃希菌的感染相关基因 *eaeA*、*sT* 在各实验组的表达水平。结果显示，与对照组相比，各实验组的感染相关基因 *eaeA* 的表达水平较高，且差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。*sT* 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。表明在留置 CVC 导管组中 *eaeA* 的表达水平高于未留置 CVC 导管组，说明 *eaeA* 基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。结果见图 2.5。

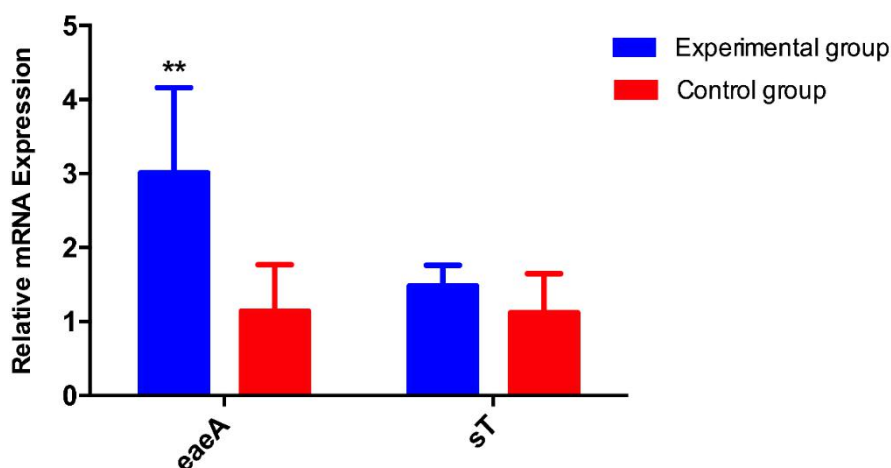


图 2.5 大肠埃希菌毒力基因表达水平

Fig2.5 Escherichia coli Virulence gene expression level

\*\*表示  $P < 0.01$

### 2.2.6 表皮葡萄球菌基因实验结果

通过检测表皮葡萄球菌感染相关基因 *mecA*、*icaA*、U43366 在各实验组的表达水平。结果显示，与对照组相比，各实验组的感染相关基因 *icaA*、U43366 的表达水平较高，且差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，*mecA* 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。表明在留置 CVC 导管组中 *icaA*、U43366 的表达水平高于未留置 CVC 导管组，说明 *icaA*、U43366 等基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。结果见图 2.6。

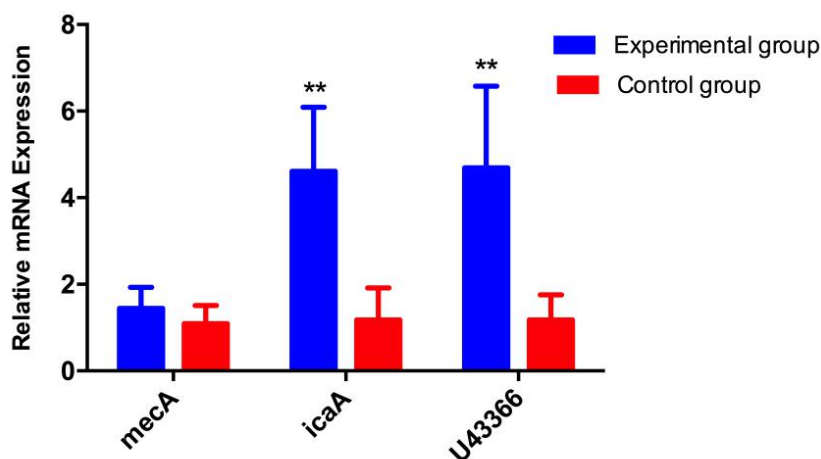


图 2.6 表皮葡萄球菌毒力基因表达水平

Fig2.6 Staphylococcus epidermidis Virulence gene expression level

\*\*表示  $P < 0.01$

### 3 讨论

CVC 置管者发生 CRBSI 的致感染病原菌所有发生概率中, 由革兰氏阴性菌大肠杆菌属、肠球菌、克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌等所引起的比例约占 15~20%<sup>[6]</sup>, 另外像束状杆菌、棒状杆菌、微球菌、芽孢杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌等引起的 CRBSI 的报道也有很多, 大面积烧伤、烫伤患者中比较常见的是铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌<sup>[6]</sup>。本研究的回顾性分析也显示, 肠球菌所占比例最高, 其次为鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌, 另外, 铜绿假单胞菌、大肠埃希菌在致感染菌群中也占有一定的比例。

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)血源性感染是常见的院内感染之一, 尤其以 ICU 患者和免疫低下人群易发。鲍曼不动杆菌毒力基因 *ompA*、*baP* 均与病原菌对宿主细胞的黏附密切相关, *ompA* 是目前功能研究最透彻的毒力因子之一<sup>[60]</sup>。该特点一定程度上决定了鲍曼不动杆菌具有很强的生存及定殖能力, 同时与其他多种毒力基因的共同作用下, 极易引起院内感染的爆发和持续流行, 加之其多重耐药菌株、甚至全耐药菌株的日益增多, 更加剧了临床的治疗难度, 使得感染患者的病死率居高不下。本研究结果显示, 鲍曼不动杆菌的感染相关基因 *baP*、*ompA*、*csuA* 在留置 CVC 导管者体内呈现高表达水平, 说明这些毒力基因可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。这与目前的许多研究结果相一致<sup>[61-65]</sup>。

肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是引起医院及社区感染的主要病原菌, 在人体抵抗力下降时极易引起罹患肺炎、泌尿生殖道感染及败血症<sup>[66-67]</sup>。研究表明, 肺炎克雷伯杆菌 *iroN* 为铁载体基因, 铁离子在细菌生长繁殖中发挥重要作用<sup>[68]</sup>, *htrA* 为温度依赖性热休克蛋白, 其表达量的高低决定肺炎克雷伯杆菌毒力高低。本研究针对肺炎克雷伯杆菌的感染相关基因进行的检测结果显示, 该菌的毒力基因 *iroN*、*htrA* 在留置 CVC 导管者中表达水平高于未留置 CVC 导管者, 说明在留置 CVC 导管患者中肺炎克雷伯杆菌的繁殖力增强, 其致病性增强。

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种非发酵 G-杆菌, 是医院感染致病菌分离率最高的几种院内获得性细菌之一<sup>[68-70]</sup>。*exoS*、*exoT*、*exoU* 基因编码的毒性蛋白是铜绿假单胞菌发挥毒性作用的重要因素, 尤其当毒力基因 *exoS* 和 *exoT* 表达率高时, 提示该菌的耐药性和毒力均较高<sup>[71-73]</sup>。据鞠晓红等<sup>[74]</sup>的研究表明, 在铜绿假单胞菌的毒力基因的检测中, 53.97% 的菌株同时携带两种毒力基因 (*exoS*+*exoU*), 是研究组中检出率最高的基因型, 由此推测, 这两种基因型与医院感染具有较大可能性。本研究结果也显示, 留置 CVC 导管者的 *exoS*、

exoT、exoU、exoY 这四个毒力基因的表达水平高于未留置 CVC 导管者,说明在留置 CVC 导管患者中铜绿假单胞菌的致病力明显增强。

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)主要寄生于人体皮肤和黏膜上,因其通过黏附在如静脉留置导管等植入性医疗器械表面形成生物被膜而造成持续性感染,具有迁延不愈的特征,是人体留置生物材料引起的医院感染最重要的病原菌之一,占比高达 39%<sup>[75-76]</sup>。表皮葡萄球菌引起感染的重要因素为在植入性材料表面形成生物膜,以抵抗人体自身免疫及抗菌药物的作用<sup>[77]</sup>,非常难以清除,对临床防治 CRBSI 带来了巨大的困难。表皮葡萄球菌的 *mecA* 基因主要编码生成低亲和力的青霉素结合蛋白异构体,从而导致该类致病菌对 $\beta$ -内酰胺类药物的耐药<sup>[75-76]</sup>, *icaA* 基因编码一种多糖胞间黏附素膜蛋白,这种膜蛋白具有 N-乙酰葡聚糖转移酶活性,并且也是该菌生物膜形成所必须的成分之一<sup>[78-82]</sup>。本研究通过检测表皮葡萄球菌感染相关基因 *mecA*、*icaA*、U43366 在各实验组的表达水平,结果显示,留置 CVC 导管者的毒力基因 *icaA*、U43366 的表达水平高于未留置 CVC 导管组,说明 *icaA*、U43366 等基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性,由此可见置管后患者表皮葡萄球菌的耐药性和感染能力可能均有所提高。

大肠埃希菌是人畜共患的重要的肠道致病菌,其所产生的特定的毒力因子如黏附素 *eaeA*、侵袭素 *ibeA* 等与其致病性密切相关,可对肠道上皮细胞产生“黏附和抹平”(Attaching and effacing, A/E) 的特征性组织病理效应,即细菌与肠道上皮细胞紧密黏附,被感染细胞微绒毛消失<sup>[83-87]</sup>。鉴于这一特点,临床对大肠埃希菌所致感染的鉴别诊断就显得尤为重要。由于 *eaeA* 基因的多态性特点,《感染性腹泻诊断标准》,将肠致病性大肠埃希菌的 PCR 作为临床鉴别诊断的指标,陈强等对大肠埃希菌紧密黏附基因的分型进行的研究结果,也对这一指标进行了补充<sup>[88-89]</sup>。本研究通过检测大肠埃希菌的感染相关基因的表达水平,发现留置 CVC 导管者 *eaeA* 毒力基因的表达水平高于未留置 CVC 导管者,说明 *eaeA* 基因的高表达水平可能与留置 CVC 导管患者的感染具有一定的相关性。

肠球菌(*Enterococcus*)是一种普遍存在于自然界中的革兰氏阳性球菌( $G^+$ ),据 2013 年中国 CHINET 细菌耐药监测结果显示,肠球菌在  $G^+$ 引起的院内感染率中排第二位,仅次于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)<sup>[90]</sup>,被列为医院内菌血症和尿路感染的主要原因<sup>[91-92]</sup>。肠球菌正在成为医院获得性感染的重要原因<sup>[93-94]</sup>。

肠球菌引起的置管感染逐年上升,多重耐药性菌株日益增多<sup>[53,95-96]</sup>,因此,对肠球菌的深入研究,有助于指导临床预防由此引起的 CRBSI 和临床抗菌药物的选择。

本研究对两组研究对象中肠球菌主要的致病基因 *esP*、*agG*、*asaL*、*gelE*、*cylA*、ACE 的表达量通过 PCR 荧光定量进行了分析,结果显示,与对照组相比,CVC 置管组肠球菌中 *esP*、*gelE*、*cylA*、ACE 等 4 个致病基因的表达水平明显高于对照组。*esP* 基因编码肠球菌表面蛋白,*gelE* 编码明胶酶,*cylA* 为细胞溶解素激活基因,由此可见,对于 CVC 置管者而言,肠球菌的致病力可能高于非置管患者。这一结果也说明,部分致病基因在某些条件下可能处于沉默状态,国外有学者研究发现肠球菌在致病基因在健康人群中大量处于沉默状态,这可能由于基因操纵子部分缺失或者是致病基因在只有在体内某些特殊环境下才能表达<sup>[97]</sup>。

有研究对肠球菌 *esP* 基因与万古霉素耐药性相关性进行了研究,结果表明 *esP* 的检测率与万古霉素的耐药性成一定的正相关性<sup>[98]</sup>。本研究发现 *esP* 基因表达水平在实验组中明显升高,表明 CVC 置管者肠球菌的耐药性升高,这可能与置管过程中使用抗菌药物导致病原菌的多重耐药性有关,同时 *esP* 蛋白的独特结构会改变蛋白的表达形式,使细菌细胞壁表面结构发生改变,从而使肠球菌能够逃避免疫攻击,在强大的抗菌药物选择压力下能够继续增殖<sup>[20]</sup>。

此外,本研究针对肠球菌致感染者的 ACE I (Angiotensin Converting Enzyme) 基因的表达水平进行了分析,结果发现 ACE 基因在两组研究对象中表达水平差异性明显。ACE 是一种单一多肽链组成的膜结合糖蛋白,可将无活性的血管紧张素 I 转换为有活性的血管紧张素 II (Ang II),并灭活具有血管扩张活性的缓激肽 (BK)<sup>[99]</sup>。广泛存在于全身各组织,因其活性中心含有金属元素锌,又叫金属蛋白酶,属二羧肽酶,相对分子质量约为分子量约为 90-160 kb。血管内皮细胞和心脏中均有大量 ACE 分布,在肺、肾、肝、附睾、前列腺等组织的血管内皮细胞或上皮细胞以及血浆、尿等体液中也可检出 ACE<sup>[100]</sup>。ACE 是肾素血管紧张素醛固酮系统 (MS) 中的关键酶,它通过将 Ang I 转化为 AngII 和灭活缓激肽促使血管收缩,引起肾小球内压增加,肾小球损伤。AngII 还是一种促肾生长因子,它能刺激系膜细胞和血管平滑肌细胞增生及肥大;并可促进肾小球细胞外基质生成,与系膜扩张密切相关;它在肾小管及间质纤维化的发生发展中也起重要作用<sup>[101]</sup>。此外,AngII 还能促进转化生长因子、血小板衍生生长因子、纤维母细胞生长因子的合成及白介素 26、内皮素、血小板活化因子的释放,增强上述作用<sup>[102]</sup>。近年来,随着研究的不断拓展与深入,ACE 基因的多态性与临床感染性疾病的相关性也越来越多,研究发现,ACE 基因插入/缺失多态性与儿童急性链球菌感染有很强的相关性,在此方向进行深入研究十分必要且具有十分重要的价值及意义。

## 4 小结

为进一步研究病原菌的毒力基因与特定状态的人体发生感染之间的相关性，本研究选取了留置 CVC 导管者发生 CRBSI 占比较高的：肠球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌等 6 类致感染的病原菌毒力基因进行检测，结果表明：esP、gelE、cylA、ACE、baP、ompA、csuA、iroN、htrA、exoS、exoT、exoU、exoY、eaeA、icaA、U43366 等 16 个毒力基因的高表达水平，可能与留置 CVC 导管患者的感染发生具有一定的相关性。

此外，研究分析也发现，由肠球菌感染所引起的 CRBSI 患者体内 ACE 基因的表达量明显升高，提示 ACE 基因多态性及表达量可能与感染的发生具有较强的相关性。因此，下一步的研究可以针对 ACE 基因多态性与 CRBSI 感染的相关性展开深入研究。

## 第三部分 CVC 置管者 ACE 基因与脓毒性休克的

### 相关性研究

通过前两部分的研究,进一步明确了 CVC 置管者 CRBSI 相关流行病学的特点及细菌生物学特征。针对部分 CVC 留置患者发生 CRBSI 治疗不及时或治疗不当而继发了脓毒症 (Sepsis) 或更甚者出现了脓毒性休克 (SS), 这些变化均是机体对病原菌感染所做出的一系列严重的系统性反应, 常常引发多种并发症, 且致死率较高, 大量实验研究证明, 不同个体的基因多态性与脓毒性休克 (SS) 的发生、发展及预后也存在一定的相关性, 例如 ACE I 基因不同的等位基因携带者发生脓毒症 (Sepsis) 的概率要高于未携带者。本部分拟通过对 ACE 基因多态性与脓毒性休克之间的相关性进行研究, 以明确 ACE 基因多态性多与 SS 的发生、发展及结果之间存在的相关性, 并明确 SS 发生的高危因素及影响结局转归的相关因素, 为临床及早防治 SS 患者提供一定的科学依据。

## 1 研究材料与方法

### 1.1 研究材料

#### 1.1.1 研究对象

2009 年 10 月到 2016 年 12 月, 将入住 ICU、留置 CVC 导管且发生了 CRBSI 符合脓毒血症 (Sepsis) 诊断标准的 238 位患者作为实验组, 将在我院体检中心进行体检的 242 位正常人群作为对照组。

#### 1.1.2 排除标准

①怀孕者; ②<18 岁者; ③慢性器官衰竭者; ④肿瘤确诊者; ⑤免疫力低下者; ⑥代谢病者; ⑦2 周内有过输血史者; ⑧骨髓移植者; ⑨急性中毒 15 日以内者。

#### 1.1.3 临床诊断要点

所有受试对象都需符合: 2001 年 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS 国际脓毒症定义会议对于脓毒症 (Sepsis) 的定义和要求<sup>[103]</sup>。

#### 1.1.4 疾病严重程度分类

采用: 急性生理学和慢性健康评分 II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, APACHE II) 和脓毒症相关器官衰竭评分 (Sepsis-related Organ Failure

Assessment,SOFA) 数值<sup>[104]</sup>(Chen et al., 2014)。

### 1.1.5 伦理要求

通过伦理委员会审批 (批件号: 2009A-011)

## 1.2 研究方法

### 1.2.1 ACE 基因多态性检测

#### 1.2.1.1 血液样本的提取:

实验组患者在 24 h 监护内采集外周静脉血样本 5 ml, 对照组个体在身体检查中采集外周静脉血样本 5 ml。血液样本中加入 2%EDTA, 在 1 小时内离心(3000 rpm / min, 4°C, 10 min), 将血浆分离, 用于基因组 DNA 提取。所有环节工作人员均由符合资质要求的专业人员遵循严格的 SOP 要求完成。

#### 1.2.1.2 DNA 样本的提取:

(1) TKM1 溶液: 10 mM Tris-Hcl PH 7.4; Mgcl<sub>2</sub> 2.03 g; Kcl 0.74 g; 20 mM EDTA 0.6 g。TKM2 溶液: TKM1 溶液中加入 0.4 M Nacl, 10%SDS, NP-40。

(2) 破坏红细胞: 在 5 ml 加抗凝剂的全血中, 加入 5 ml 的 TKM 在振荡器上充分混匀, 3000 rpm/min 离心 10 分钟, 将 TKM1 加入离心所得的沉淀中, 混匀, 离心, 如此反复 3~5 次, 直到上清液由红色变为无色。

(3) 破坏白细胞: 将 0.8 ml 的 TKM2 加入含有白细胞沉淀的试管中, 并将白细胞悬浮, 再加入 50  $\mu$ l 10%的 SDS 和 0.3 ml 的饱和氯化钠, 轻轻摇动并将其混匀, 然后用酚氯仿继续提取, 将上清液取出后放到另一管中, 染后加入等量预冷异丙醇, 在超低温冰箱中沉淀 10 分钟, 75%的乙醇洗涤后, 13000 rpm/min 离心 10 分钟, DNA 干燥, 溶于 100  $\mu$ l 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 缓冲液中。

#### 1.2.1.3 DNA 含量的分析

通过紫外分光光度计对 DNA 含量进行分析, 通过 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值对所提取的 DNA 进行质量检测 and 定性分析。

#### 1.2.1.4 引物设计:

首先从基因库中获取 ACE 基因序列, 使用 Primer 6.0 软件对基因多态性位点 rs4291 和 rs4646994 设计 PCR 引物。引物序列如表 1.1 所示。

表 1.1 PCR 引物序列

Table 1.1 PCR primer sequences

基因	引物序列
rs4291	前引物: ACGTTGGATGGCAGAGGAAGCTGGAGAAAG 后引物: ACGTTGGATGTCGGGTGTTCCGGCAAAC TG
rs4646994	前引物: CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 后引物: GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT

### 1.2.1.5 基因分型:

采用 PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法检测 ACE 基因位点 rs4291 的多态性, 具体步骤为: 用目的基因的 PCR 采用 25  $\mu$ l 反应体系, 其中 DNA 5  $\mu$ l, Buffer 缓冲液 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l, dNTP 0.5  $\mu$ l, 上下游引物各 0.5  $\mu$ l, Taq 酶 0.2  $\mu$ l, 双蒸水 13.8  $\mu$ l。PCR 反应程序为 95°C 变性 15 S, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 30 s, 共扩增 36 个循环。PCR 产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 在检测扩增成功的 PCR 产物中加入限制性内切酶 Hha I, 37°C 孵育 30 分钟, 酶切完全后用 2.5% 的琼脂糖胶对酶切产物进行检测, 其中基因型为 AA 在电泳后条带大小为 137 bp, 基因型为 TT 电泳条带大小为 114 bp, 基因型为 AT 的电泳后有 137 bp、114 bp 和 23 bp 三条条带。

rs4646994 位点基因分型: ACE 基因第 16 内含子位点 rs4646994 基因型检测: ACE 基因扩增的产物有一段 287 bp 的 Alu 重复序列, 存在 I / D 的多态性从而导致了三种基因型, 插入型纯合子(II)为长度 490 bp 的片段, 缺失型纯合子(DD)为长度 190 bp 的片段, I / D 型杂合子(ID)有两条长度分别为 490 bp 和 190 bp 的两条片段。

通过统计分析检测 ACE 基因型与脓毒症休克(SS)患者预后之间的相关性。

## 1.2.2 ACE 活性检测

1.2.2.1 血液样本收集: 空腹采集受试对象 3 ml 血液样本。

1.2.2.2 血液样本处理: 血液样本采集 30 min 后, 在 57°C 下离心分离(3000 r/min)出血清。用酶联免疫吸附双抗体夹心法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)原理定量测定血清 ACE 水平。用抗人 ACE 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 ACE 与单抗结合, 加入生物素化的抗人 ACE, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的亲合素与生物素结合, 加入底物工作液显蓝色, 最后加终止液硫酸, 在 450 nm 处测 OD 值, ACE 浓度与 OD 值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中的 ACE 浓度。

## 1.2.3 统计方法

应用 SPSS 19.0 软件进行数据处理及结果的分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示; 计

数资料以频数表示；基因型及等位基因频率用计数法统计；两组间均数比较用  $t$  检验；方差不齐时则采用近似  $t$  检验；多组计量资料应用单因素方差分析；多样本均数两两比较采用 LSD- $t$  检验法；研究对象与哈迪-温伯格平衡定律（Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE）的符合程度、基因型和等位基因间的关系采用  $\chi^2$  检验方法。

### 1.3 主要仪器及试剂

仪器和试剂名称	厂家
PCR 仪	Eppendorf 公司
小型台式离心机	Eppendorf 公司
紫外分光光度计	Thermo 公司
电泳仪	北京君意东方电泳设备有限公司
移液器	Eppendorf 公司
凝胶成像仪	Bio-rad 公司
氯仿、异丙醇、100%乙醇	上海化学试剂有限公司
Taq 酶	大连宝生物有限公司
DNA marker	北京索莱宝科技有限公司
Hha I	大连宝生物有限公司
琼脂糖	Amresco 公司
Goldview	北京索莱宝科技有限公司

## 2 实验结果

### 2.1 研究对象基本信息

两组研究对象的基本资料如下：实验组包含 133 位男性和 105 位女性，平均年龄为  $52.09 \pm 7.06$  岁；对照组包括 128 位男性和 114 位女性，平均年龄为  $52.96 \pm 5.32$  岁，通过统计分析发现，两组在年龄和性别比例上都没有明显差异，这就排除了性别和年龄差异对实验结果的影响。实验组的研究对象在进入 ICU 7 天后的 APACHE II 数值和最低 SOFA 数值，以及 30 天观察期内的感染特征，结果见表 2.1；与对照组相比，实验组研究对象的血液中 ACE 活性明显要明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )，结果见表 2.1。

表 2.1 研究对象基本资料

Table 2.1 Basic information of research objects

基本资料	实验组 (n=238)	对照组 (n=242)	P
年龄 (岁)	52.09 ± 7.06	52.96 ± 5.32	0.128
性别 (男/女)	133/105	128/114	0.511
APACHE II	32.10 ± 12.37	—	—
SOFA	9.02 ± 2.77	—	—
感染来源(n,%)		—	—
肺部	73 (43.28)	—	—
腹部	53 (24.37)	—	—
外周血液	49 (30.67)	—	—
伤口	28 (14.71)	—	—
其他部位	35 (15.97)	—	—
致感染的病原菌		—	—
G <sup>+</sup> 菌	69 (43.70)	—	—
G <sup>-</sup> 菌	93 (74.37)	—	—
混合感染	55 (28.57)	—	—
未知感染(n,%)	21 (10.08)	—	—
ACE 活性 (U/l)	53.59 ± 6.48	46.81 ± 5.92	<0.001**

注: APACHE II, 急性生理与慢性健康评估 II; SOFA, 脓毒症相关脏器衰竭评估表; ACE, 血管紧张素转酶;

\*\*表示  $P < 0.01$

## 2.2 ACE rs4291/rs4646994 标记的基因分型

利用 PCR-RFLP 技术对 ACE 基因标记 rs4291、rs4646994 进行基因分型, 如图 2.1A 所示, 如果基因型为 AA 型, 则 PCR 产物经酶切后仍然只有一条 137 bp 的电泳条带, 而 TT 基因型在 PCR 扩增、酶切后有 114 bp 和 23 bp 两条电泳条带, AT 基因型则有 137 bp、114 bp 和 23 bp 三条电泳条带, rs4646994 分子标记为插入/缺失标记, ACE 基因在其第 16 个内含子上因存在或丢失 287 bp 的 DNA 片断, 从而导致插入 (D) 或缺失 (I) 的基因多态性, 如图 2.1B 所示, DD 基因, PCR 产物只有一条 190 bp 的电泳条带, II 基因型 PCR 产物只有一条 490 bp 的条带, DI 基因型 PCR 产物有 190 bp 和 490 bp 两条条带。

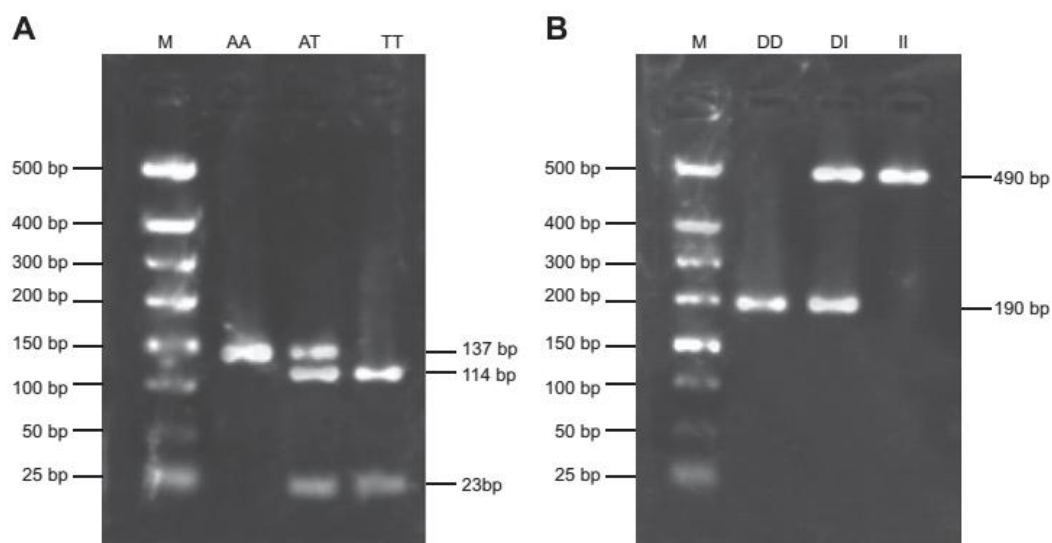


图 2.1 ACE rs4291/rs4646994 标记的基因分型结果。(A) ACE rs4291 标记的基因分型结果；(B) ACE rs4646994 标记的基因分型结果

Fig2.1 Genotyping results of ACE rs4291/rs4646994. (A) Genotyping results of ACE rs4291;(B) Genotyping results of ACE rs4291 rs4646994

### 2.3 HWE 分析结果

对实验组和对照组的 rs4291/rs4646994 基因频率都进行了 HWE Pearson  $\chi^2$  检验。统计结果显示观察数量与预期数量几乎一致，表明 rs4291/rs4646994 基因频率符合 HWE ( $P > 0.05$ )，并显示出良好的代表性。结果见表 2.2。

表 2.2 ACE 基因多态性的 HWE 测定结果

Table 2.2 HWE analysis result for ACE gene polymorphism

SNP	基因型	实验组				对照组			
		O	E	$\chi^2$	P	O	E	$\chi^2$	P
rs4291	AA	59	60	0.102	0.95	105		1.385	0.5
	AT	122	119			100	112		
	TT	57	59			37	31		
rs464699	DD	52	49	0.308	0.857	35	32	0.843	0.656
	DI	112	118			102	112		
	II	74	71			105	98		

注: SNPs, 单核苷酸多态性; O, 观测组编号; E, 预测组编号; ACE, 血管紧张素转化酶

## 2.4 ACE 基因标记位点 rs4291/rs4646994 分型结果

HWE Pearson  $\chi^2$  拟合优度检验的结果表明：与对照组相比，实验组的 rs4291 等位基因和基因频率，AT 基因型存在显著差异 ( $P < 0.05$ )；实验组 TT 基因的频率为 49.58%，对照组为 35.95%，实验组 T 等位基因的频率 49.58%，对照组则为 35.95%，实验组明显更高；实验组 TT 基因的频率为 49.58%，对照组为 35.95%，实验组 A 等位基因的频率 50.42%，对照组则为 64.05%，对照组明显更高，两组存在显著差异 ( $P < 0.05$ )；实验组的 rs4646994 基因型和等位基因以及 DI 基因型都与对照组有明显不同 ( $P < 0.05$ )；实验组的 DD 基因频率 (21.85% vs 14.46%) 和 D 等位基因 (45.37% vs 35.53%) 明显高于对照组，而 I 等位基因频率 (54.63% vs 64.47%) 明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2.3。

表 2.3 比较分析两组中的 ACE 等位基因和基因型频率

Table 2.3 Comparative analysis for ACE allele and genotype frequency

位点/基因型	对照组 (n = 242)	实验组 (n = 238)	X <sup>2</sup> 值	P
rs4291				
AA	105 (43.39)	59 (24.79)		Ref
AT	100 (41.32)	122 (51.26)	13.64	< 0.001
TT	37 (15.29)	57 (23.95)	14.69	< 0.001
A	310 (64.05)	240 (50.42)		Ref
T	174 (35.95)	236 (49.58)	18.22	< 0.001
rs4646994				
DD	35 (14.46)	52 (21.85)	7.976	0.005**
DI	102 (42.80)	112 (47.06)	4.727	0.03*
II	105 (43.39)	74 (31.09)		Ref
D	172 (35.53)	216 (45.37)	9.651	0.002**
I	312 (64.47)	260 (54.63)		Ref

注: Ref, 参照; \*\*表示  $P < 0.01$ ; \*表示  $P < 0.05$

## 2.5 ACE 基因多态性与 ACE 活性相关性分析

对 ACE 基因 rs4291 和 rs4646994 的多态性与 ACE 酶活性进行相关性分析发现：AA 基因型的细胞中 ACE 酶活性最低，AT 基因型次之，TT 基因型细胞中 ACE 酶活性最高。DD 基因型 ACE 酶活性最高，DI 次之，II 基因型的细胞 ACE 活性最低，结果见表 2.4。

表 2.4 不同 ACE 基因型细胞中 ACE 酶活性比较

Table2.4 Comparison of ACE enzyme activity of cells with different ACE genotypes

基因位点/基因型	ACE 活性 (U/L)	P
rs4291		
AA(n=105)	49.75 ± 5.47	Ref
AT(n=100)	53.85 ± 5.18	< 0.001
TT(n=37)	57.00 ± 7.81	< 0.001
rs4646994		
DD(n=35)	60.05 ± 5.06	Ref
DI(n=102)	53.27 ± 5.45	< 0.001
II(n=105)	49.53 ± 5.17	< 0.001

注: Ref, 参照

## 2.6 ACE 基因多态性与 SS 患者存活率之间的相关性分析

238 位 SS 患者依据预后情况被分为死亡组 (人数 n=73)和存活组(人数 n=165); 死亡组的 rs4291 TT 和 rs4646994 DD 基因型频率明显高于存活组; 在 rs4291 中, 死亡组的 T 等位基因频率为 72.6%, 高于存活组的 39.39%, 而 A 等位基因频率 (27.40%) 低于存活组的 60.61% ( $P < 0.05$ ); 在 rs4646994 中, 死亡组的 D 等位基因频率(65.07%) 高于存活组的 36.67%, 而 I 等位基因频率 34.93% 低于存活组的 63.33% ( $P < 0.05$ )。结果见表 2.5。通过以上分析可以发现, rs4291 T 等位基因和 rs4646994 D 等位基因存在的情况下 SS 患者的死亡率明显升高。

## 2.5 不同 ACE 基因标记位点基因型频率与存活率的相关性

Table2.5 The correlation between the genotype frequency and the survival rate of two ACE gene marker

基因位点/基因型	存活组 (n = 165, 69.33%)	死亡组 (n = 73, 30.67%)	$\chi^2$	P
rs4291				
AA	57 (34.55)	2(7.69)		Ref
AT	86 (52.12)	36(49.31)	16.36	< 0.001
TT	22 (13.33)	35(34.62)	44.92	< 0.001
A	200 (60.61)	40(27.40)		Ref
DD	20 (12.12)	32(43.84)	31.7	< 0.001
DI	81 (49.10)	31(42.47)	5.2	0.023*
II	64 (38.78)	10(13.69)		Ref
D	121 (36.67)	95(65.07)	32.94	< 0.001
I	209 (63.33)	51(34.93)		Ref

注: SNPs, 基因单核苷酸多态性,; Ref, 参照; \*表示  $P < 0.05$

## 2.7 ACE 基因标记 rs4646994 和 rs4291 单倍型分析

实验组和对照组的 ACE rs4646994/rs4291 位点的单倍型分析都由一项软件完成（排除低于 0.03 的单倍型频率）。分析结果表明：两组中的 AI、TD 和 AD 单倍型频率都不同 ( $P < 0.05$ )。TD 单倍型是 SS 的危险因素，而 AI 和 AD 单倍型则是 SS 的保护因素。两组的 TI 单倍型频率没有表现出不同 ( $P > 0.05$ )。结果见表 2.6 所示。

表 2.6 ACE 基因位点 rs4646994 和 rs4291 之间的单倍型分析结果

Table 2.6 Haplotype analysis of ACE gene loci rs4646994 and rs4291

单倍型	实验组	对照组	P	OR	95% CI
A I	130 (0.273)	166 (0.344)	0.017*	0.715	0.543-0.942
A D	110 (0.231)	143 (0.296)	0.022*	0.714	0.535-0.954
T I	130 (0.273)	145 (0.300)	0.352	0.875	0.662-1.158
T D	106 (0.223)	28 (0.059)	< 0.001**	4.557	2.949-7.041

注: OR, 优势比, CI, 可信区间, ACE, 血管紧张素转化酶; \*\*表示  $P < 0.01$ ; \*表示  $P < 0.05$

## 2.8 SS 患者 7 d-30 d 死亡率的相关因素分析

238 位 SS 患者，其中有 42 位在 7 d 内死亡。APACHE II 分值的高低、血清中 ACE 水平和 rs4646994 是否为 DD 基因型都会增加 SS 患者的死亡率；低分值的 SOFA 数值和 rs4291AA 基因型会降低 SS 患者的死亡率 ( $P < 0.05$ )；休克时期是不相关因素 ( $P > 0.05$ )。至于 30 天的死亡率，单变量分析指出休克时间长，高 APACHE II 和 ACE 血清水平，以及 rs4646994 DD 基因增加了死亡率。而 SOFA 数值低，rs4291 的基因型为 AA 时死亡率低。结果见表 2.7。

表 2.7 重度感染患者 7-30 天死亡率的相关因素分析

Table 2.7 Analysis of related factors of 7-30 days mortality in severe infected patients

因素	7 d		P	30 d		P
	存活	死亡		存活	死亡	
SS	5.91±2.18	6.40±2.08	0.608	5.59±2.09	6.91±2.08	< 0.001
APACHE II 得分	30.92±12.26	37.62±11.46	0.001**	30.84±12.63	34.97±11.32	0.017*
SOFA 分值	8.63±2.72	10.84±2.27	< 0.001	8.39±2.74	10.43±2.29	< 0.001
rs4291						
AA vs AT/TT	59/137	0/42	0.018*	57/108	2/71	< 0.001
rs4646994						
DD vs DI/II	29/167	23/19	< 0.001	20/145	32/41	< 0.001
血清 ACE	52.70±6.28	57.76±5.78	< 0.001	52.81±6.22	55.36±6.74	< 0.001

注: SS: 脓毒性休克; APACHE II: 急性生理和慢性健康评估 II; SOFA: 脓毒性相关的器官衰竭; ACE: 血管紧张素转化酶; \*表示  $P < 0.05$

## 2.9 SS 患者死亡率的相关危险因素分析

将以上所有影响因素纳入多变量分析中，结果指出：低分值的 SOFA 数值和 rs4291 会降低 SS 患者的死亡率，而 rs4646994 和作为 SS 患者危险因素，高水平的血清 ACE 会增加死亡率 ( $P<0.05$ )。结果见表 2.8。

表 2.8 重度感染患者死亡相关危险因素的分析

Table 2.8 Analysis of risk factors of death in patients with severe infection

因素	$\beta$	S.E.	Wald	<i>P</i>	OR	95% CI
APACHE II score	0.008	0.015	0.134	0.714	1.006	0.976-1.036
SOFA score	-0.238	0.07	11.469	0.001**	0.788	0.687-0.905
rs4291	-2.465	0.897	7.544	0.006**	0.085	0.015-0.494
rs4646994	0.889	0.38	5.479	0.019*	2.432	1.156-5.117
血清 ACE	0.07	0.031	5.065	0.024*	1.073	1.009-1.140

注: SS: 脓毒性休克; APACHE II: 急性生理和慢性健康评估 II; SOFA: 脓毒性相关的器官衰竭; ACE: 血管紧张素转化酶, OR, 优势比, CI, 可信区间; \*\*表示  $P<0.01$ ; \*表示  $P<0.05$

## 2.10 ACE 不同基因型 SS 患者的预后分析

本研究对 238 位 SS 患者进行了为期 1 个月的临床追踪, 期间有 77 位患者死亡。7 d 的死亡率和 30 d 的死亡率分别是 17.65% 和 30.67%。采用 Kaplan-Meier 生存曲线方法评估不同的 rs4291、rs4646994 基因型之间的关联, 以及其与 SS 患者 7 d 和 30 d 预后之间的相关性。分析结果显示: 不同基因型表现出的存活曲线显著不同。相较于非携带 rs4291 TT 或 rs4646994 DD 基因型的患者, 携带这些基因的患者其死亡率更高 ( $P=0.005$ ;  $P<0.001$ )。结果见图 2.2。

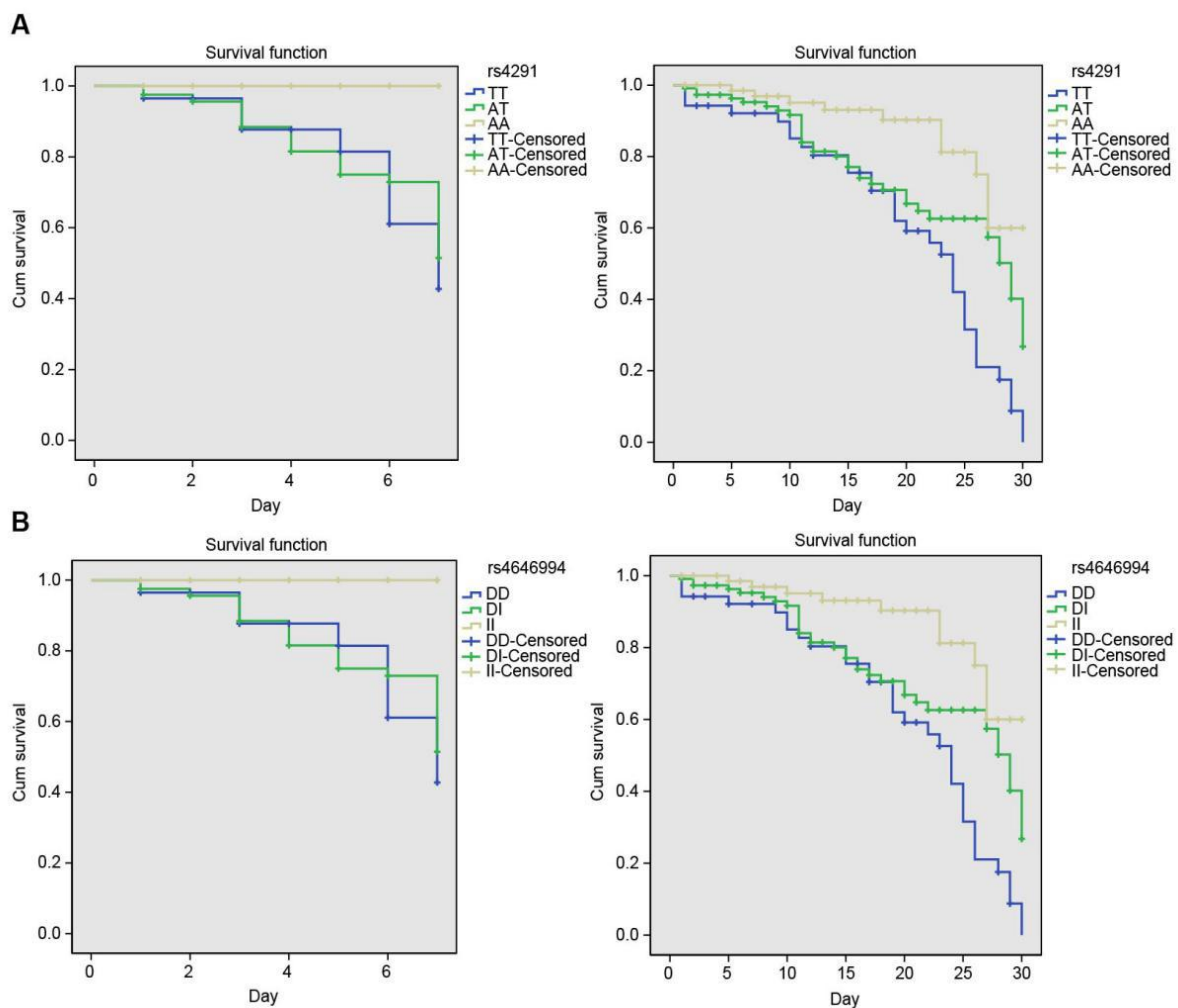


图 2.2 不同 ACE 基因型 SS 患者的预后分析

Fig2.2 Prognostic analysis of SS patients with different ACE genotypes

### 3 讨论

ICU 的重症患者往往由于自身合并多种并发症, 机体抵抗力下降, 面对病原菌的入侵会做出一系列严重的系统性反应, 在这种状况下应该及时治疗, 否则会引发 SS, 导致死亡率会明显升高。留置 CVC 导管在救治患者发挥积极作用的同时, 其引发的 CRBSI, 往往会加剧这种恶劣的发展趋势。SS 是环境因素与遗传因素共同作用的复杂性疾病, 发病有其独特特点, 可以发现细菌或有高度可疑感染灶的存在。虽然脓毒症是由感染引起的, 一旦发生, 其病理生理发生发展遵循其自身的过程和规律, 所以从本质上讲 SS 是机体对感染性因素的反应, 因对其发病机制研究的局限性, 无特异治疗方法, 更加凸显早期及时治疗的重要性。鉴于 SS 患者病情多变, 治疗方案需要根据病情的变化做出及时调整。因此, 及时掌握病情的严重程度及走向, 对疾病的预后进行早期预测, 有助于制定最佳临床治疗方案, 阻断疾病的进展, 预防某些并发症的发生, 有效降低病死率, 同时避免过度医疗, 减轻患者经济负担。早期的许多研究指出, 基因多态性很有可能在 SS 中起着关键作用。不同的基因多态性被证明与重度脓毒症和 SS 的发生、发展及预后存在一定相关<sup>[14-15,105]</sup>。ACE 基因的基因多态性与多种炎症疾病的易感性存在着一定关系, 血管紧张素 II 通路 (Antiotensin II Pathway) 在 SS 的发生中起着重要的作用<sup>[106]</sup>。CVC 作为异物物质对血管壁的持续刺激作用导致免疫反应、炎症反应等, 释放炎症因子促进血管平滑肌细胞的迁移和增殖。实验表明, ACE 基因在促进血管平滑肌细胞生长过程中起着重要的作用, 主要促使血管紧张素 II 的产生、抑制醛固酮的降解和缓激肽释放, 有研究发现 ACE 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin Angiotensin System, RAS)中的一个关键酶, ACE 基因位于染色体 17q23, 其 16 内含子上因存在或丢失 287 bp 的 DNA 片断, 从而导致插入 (I) 或缺失 (D) 的基因多态性。血管紧张素 I 转化酶(ACE)的作用是催化血管紧张素 I (无活性) 转化成血管紧张素 II(AT-II 有活性), 因此 ACE 酶活性越高, AT-II 的含量越高。AT-II 具有调节血管舒张的作用, 能够收缩全身尤其是肾部的血管, 在作用于肾器官时, 能够刺激肾小球和近曲上管细胞, 使细胞增殖, 诱使膜细胞、近端小管上皮细胞胶原和非胶原蛋白含量上升, 增强了系膜细胞摄取大分子物质的能力, 降低了其清除能力, 最终导致糖尿病肾病 (DKD) 的发生, 所以 ACE 的水平在肾内血管紧张素调节中发挥着重要的功能, 越来越多的研究表明 ACE 基因的多态性与多种疾病有着密不可分的关系, 如 2 型糖尿病、冠状动脉粥样硬化、阿尔兹海默症等, 国内外许多学者对 SS 的发生和 ACE 基因的多态性做了很多研究, 研究表明 ACE 基因的缺失型与血清中 ACE 活性水平高低具有很高的相关性, 并能增加 SS 的危险性与 I/D 多态性一起在心血管疾

病的发展中发挥着关键性的作用<sup>[101]</sup>。一些研究指出, ACE I/D 基因多态性与改变 ACE 的效果有关联, 而 ACE 抑制剂会抑制重度脓毒症患者的器官衰竭<sup>[105,107-110]</sup>, 经 ACE 抑制剂治疗后的患者会在短期和长期内降低死亡率<sup>[111-112]</sup>。

本研究对 ACE 基因多态性与 SS 患者的预后进行了相关性分析, 发现 SS 患者的预后与 ACE 基因的 rs4291 和 rs4646994 位点的多态性具有显著相关。当患者 rs4291 的基因型为 TT 和 rs4646994 的基因型为 DD 时, 患者因 SS 致死的概率更高; 此外还发现 ACE 基因 rs4291/rs4646994 位点的基因型和等位基因频率在两组中有显著差异, 对血清细胞中的 ACE 酶活性进行分析, 发现患病组的 ACE 酶活性要显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 这与前人的研究结果相一致。

本研究中研究对象中死亡组的 rs4291 TT 和 rs4646994 DD 基因型频率显著高于存活组 ( $P<0.05$ )。此外, 本研究 Kaplan-Meier 生存曲线的评估结果表明, 携带 rs4291 TT 基因型和 rs4646994 DD 基因型的 SS 患者在 7 d 和 30 d 的死亡率相对比未携带者有所增加。

对于 SS 预后的高风险因素, 已经有相关的研究结果: SS 依然是全世界 ICU 患者主要的致死原因<sup>[113]</sup>, ACE II 的 I 型受体的蛋白增长与 SS 患者 28 d 的死亡率增长, 以及降低血压都有关联<sup>[114]</sup>。临床上对病危患者的死亡预估普遍使用 SOFA 数值, 高分值的 SOFA 数值普遍代表着严重的病情和不良的预后。很多研究也指出, SOFA 与至少另外一种评估指标两者相配合应用在 ICU 中可以有更好的预测价值<sup>[112,115-116]</sup>。本研究结果表明: 低分值的 SOFA 数值和 rs4291 可以降低 SS 患者的死亡率, 而 rs4646994 和高水平的血清 ACE 则会增加 SS 患者的死亡率。

## 4 小结

SS 是机体对病原菌感染所做出的一种严重的全身性系统反应, 本研究通过对 ACE 基因的多态性与 SS 之间的相互关系进行了探讨, 通过研究结果更加证明了二者之间存在显著相关性。同时, 明确了 SS 发生的高危因素及影响 SS 结局转归的相关因素, 为临床评估 SS 患者的病情严重程度及评价疾病预后提供了较好的预测价值, 对于 SS 的及时防治和临床治疗提供了理论依据。

但由于本研究尚存在样本数量及研究对象民族等因素的不足之处, 研究结果仍需要经过后期更加优化的研究设计、获取更大数量的样本, 以及囊括更多不同民族的研究对象等方面, 更深入地推进研究, 以期待在后续的研究中取得更多的科学依据支持。

## 结 论

CRBSI 是临床一个不可避免又亟待解决的问题，对其开展的研究从未间断过。本研究针对 CRBSI 的细菌生物学特性及其与 ACE 基因相关性所进行的研究，得出下述结论：

1. CVC 置管率呈逐年提升趋势，而 CRBSI 的发生率呈现逐年降低趋势，CRBSI 的发生率与全世界范围内统计结果基本相一致。

1. CRBSI 的致感染病原菌以肠球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌等 6 类为主。

2. 对肠球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌等 6 类病原菌的毒力基因分析结果表明，留置 CVC 导管者的病原菌致感染相关毒力基因的高表达水平可能与其感染的发生具有一定的相关性。

3. 在对 6 类病原菌呈现高表达的 16 个毒力基因中，ACE 基因与脓毒性休克之间存在明显的相关性分析表明，ACE 毒力基因有可能成为重要的临床预测指标。

## 不足与展望

基于我们目前的研究结果，仍有以下问题值得进一步深入研究：

1. 鉴于本研究工具或者方法所限，我们只对主要 CRBSI 致病菌的毒力基因、耐药分子机制进行了初步探索，而对其它致病菌的毒力基因表达情况、耐药性分子机制未能充分研究，有待进一步研究。

2. 本研究对主要致病菌的耐药分子机制进行了初步研究，其耐药性是否由分析的耐药基因所致还有待进一步的研究，未来可以通过基因敲除等技术对这些基因的耐药机制进行深一步的研究。

3. 本研究在致病菌中只选择了 6 类病原菌的毒力基因表达情况进行了初步分析，挑选出 16 个呈现高表达的病毒基因，其它毒力基因的表达情况需要进一步检测与分析。

## 参考文献

- [1] Jain, G., Allon, M., Saddekni, S., Barker, J.F., Maya, I.D. Does heparin coating improve patency or reduce infection of tunneled dialysis catheters [J]. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012, 4(11):1787-90.
- [2] Dimick, J.B., Pelz, R.K., Consunji, R., Swoboda, S.M., Hendrix, C.W., Lipsett, P.A. Increased use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit[J]. *Arch Surg.* 2011, 136:229-34.
- [3] Warren, D.K., Quadir, W.W., Hollenbeak, C.S., Elward, A.M., Cox, M.J., Fraser, V.J. Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital [J]. *Crit Care Med.* 2010, 34:2084-2089.
- [4] Siempos, I.I., Kopterides, P., Tsangaris, I., Dimopoulou, I., Armaganidis, A.E. Impact of catheter-related bloodstream infections on the mortality of critically ill patients:a meta-analysis [J]. *Crit Care Med.* 2009, 37:2283-2289.
- [5] McKnight, S. Nurse's guide to understanding and treating thromboticocclusion of central venous access devices [J]. *Medsurg Nurs.* 2011, 13(6):377-382.
- [6] Edwards J, R. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008 [J]. *Am J Infect Control.* 2010, 37(10):783-805.
- [7] Chen, Y Y, Yen, D H, Yang, YG , Liu, CY , Wang, F D, Chou, P. Comparison between replacement at 4 days and 7 days of the infection rate for pulmonary artery catheters in an intensive care unit [J]. *Crit Care Med.* 2013, 1(5):1353-1358.
- [8] O' Grady, N.P., Alexander, M., Dellinger, E.P. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections [J]. *Pediatrics.* 2012, 110(5):1-24.
- [9] Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. *Chest.* 2012, 101:1644-1655.
- [10] Yamamoto, Y., Harashima, A., Saito, H., Tsuneyama .K., Munesue ,S., Motoyoshi S, Han, D., Watanabe, T., Asano, M., Takasawa, S., et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products [J]. *Journal of Immunology.* 2011, 186(5):3248-3257.
- [11] Rangel-Frausto, MS., Pittet, D., Costigan, M., Hwang, T., Davis, C.S., Wenzel, R.P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study [J]. *JAMA.* 2005, 273:117-123.
- [12] Levy, MM., Fink, M.P., Marshall, J.C. 2001 SCCM / ESICM / ACCP / ATS / SIS international sepsis definitions conference [J]. *Intensive Care Med.* 2013, 29(4):530-538.
- [13] Chvojka, J., Matejovic, M. International guidelines for management of severe sepsis and septic shock [J]. *Vnitr Lek.* 2014, 60:59-67.
- [14] Boussekey, N., Cantrel, J., Dorchin, D.L., Devos, P., Meybeck, A., Chiche, A., Georges, H., Leroy, O. Epidemiology, prognosis, and evolution of management of septic shock in a French intensive care unit: a five years survey [J]. *Crit Care Res Pract.* 2010, (6):436-447.

- [15] Wang, X.T., Yao, B., Liu, D.W, Zhang, H.M. Central Venous Pressure Dropped Early is Associated with Organ Function and Prognosis in Septic Shock Patients: A Retrospective Observational Study [J]. Shock. 2015, 44:426-430.
- [16] Zapata,T.M., Arredondo-Garcia, J.L., Rivera-Luna, R., Klunder-Klunder, M., Mancilla-Ramirez, J., Sanchez-Urbina,R., et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism increases susceptibility to septic shock in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Infect Dis J. 2013, 32:136-139.
- [17] Kumar, A., Safdar, N., Kethireddy, S., Chateau, D.A. Survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study [J]. Critical Care Med. 2010 38:1651-1664.
- [18] 林瑾, 刘培, 庄渔舟, 等. 重症监护病房 419 例重度脓毒症患者的临床分析[J]. 中华危重病急救医学. 2014, 26(3):171-174.
- [19] Harrison, D.A., Welch, C.A., Eddleston, J.M. The Epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database[J]. Critical Care. 2006, 10(2):42-50.
- [20] Adrie, C., Alberti, C., Chai, X. Couturier, C. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition( community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost[J]. J Critical Care. 2005, 20(1):46-58.
- [21] Khwannimit, B, Bhurayanontachai, R. The epidemiology of and risk factors for, mortality from severe sepsis and septic shock in a tertiary-care university hospital setting [J]. Epidemiol Infect. 2009, 137(9):1333-1334.
- [22] Coba, V., Whitmill, M., Mooney, R., Horst, H.M., Brand, M.M., Digiovine, B., Mlynarek, M., McLellan, B., Boleski, G., Yang, J. Resuscitation bundle compliance in severe sepsis and septic shock: improves survival, is better late than never[J]. Intensive Care Med. 2011, 26:304-313.
- [23] Huet, O., Chin-Dusting, J.P. Septic shock: desperately seeking treatment[J]. Clinical Sci (London). 2014,126:31-39.
- [24]John, B.R., Loggins, J., Yanamandra, K. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism does not alter sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants[J]. J. Perinatol. 2005, 25:205-209.
- [25] 卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 东南大学出版社, 1991.
- [26] 周宏,姜亦虹,沈黎,等. 综合医院 ICU 中心静脉导管相关性血流感染发生率及危险因素[J].中华医院感染学杂志. 2012, (12):2512-2514.
- [27] National Institute for Health and Care Excellence Guidance on the use of ultrasound locating devices for placing central venous catheters[J]. NICE Technology Appraisal. 2012 (49).
- [28] Mermel, L.A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D.E., Flynn, P., O'Grady, N.P. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related

- infection: 2009. Update by the Infectious Diseases Society of America *Clin Infect Dis*[J]. *Clinical Infectious Disease*. 2009, 49(1):1-45.
- [29] The Joint Commission Variability of surveillance practices for central line-associated bloodstream infections and its implications for health care reform. *Joint Commission Benchmark*. 2011, 13(2): 6-8.
- [30] Mermel, L.A. Prevention of intravascular catheter-related infections. (Erratum: *Ann Intern Med* 133:395, 2000). *Ann Intern Med*. 2010, 132:391-402.
- [30] Dudeck, M.A., Weiner, L.M., Allen-Bridson, K., Malpiedi, P.J., Peterson, K.D., Pollock, D.A. National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2012, Device-associated module. *Am J Infect Control*. 2013, 41:1148-66.
- [31] Valls, J., Ferrer, R. Bloodstream infection in the ICU *E J Infect Dis Clin North Am*. 2009, 23 (3): 557-569.
- [32] Marsteller, J.A., Sexton, J.B., Hsu, Y.J., Hsiao, C.J., Holzmueller CG, Pronovost PJ, Thompson DA. A multicenter, phased, cluster-randomized controlled trial to reduce central line-associated bloodstream infections in intensive care units[J]. *Crit Care Med*. 2012, 40(11): 2933-2939.
- [33] Deng, J.K., Guo, X.L., Huang, Y.S., Li, W. Clinical analysis of coagulase negative *Staphylococcus* infection in a hospital[J]. *Chin J Infection Control*. 2009, 5(1):56-61.
- [34] Zhao, D.J., Fu, W.C., Zhang, B.X., Ren, Y.J. Cao, Y., Mao, Y., Yang, W. Monitoring of drug resistance of coagulase-negative *Staphylococci* in senile patients with pulmonary infection[J]. *China Trop Med*. 2008, 8(01):163-164.
- [35] Rosa, Jde. O., de Moura, J., Palos, M.A., Gir, E., Reis, C. Detection of *mecA* gene in oxacillin resistant coagulase-negative *staphylococci* isolated from the saliva of nursing professionals[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009, 42(4):398-403.
- [36] Shang, W., Yang, Y.Q., Wang, X.M. Distribution of coagulase negative *staphylococci* from trauma patients and its drug resistance[J]. *Chin J Nosocomiol*. 2011, 21(5):1030-1033.
- [37] Stefani, S. Evolution in the antibiotic susceptibility and resistance[J]. *Infez Med*. 2009, 17 (3):5-12.
- [38] Daisuke, U., Oishi, T., Yamane, K., Terada K. *Corynebacterium striatum* Bacteremia Associated with a Catheter-Related Blood Stream Infection[J]. *Case Rep Infect Dis*. 2017, 2017: 2682149.
- [39] Yamada, M., Yoshida, J., Hatou, S., et al. Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones[J]. *Br J Ophthalmol*. 2008, 92(6):848-851.
- [40] Moubareck, C., Meziane-Cherif, D., Courvalin, P. VanA-type *Staphylococcus aureus* strain VRSA-7 is partially dependent on vancomycin for growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009, 53:3657-3663.
- [41] Sakka V, Tsiodras S, Galani L, et al. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan. 14(1):14-21.

- [42] Anderson, A.C., Jonas ,D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., et al. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2015. 6:1534.
- [44] Kimura, M., Kawai, E., Yaoita, H., Ichinoi, N., Sakamoto, O., Kure, S. Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection with *Kocuria kristinae* in a Patient with Propionic Acidemia[J]. *Case Rep Infect Dis.* 2017, 2017:1254175.
- [45] Grik, K., Diefich, M.P., Pfaller, K., Miglioli, P.A., Allerberger, F. In vitro activity of fosfomyein in combination with various antistaphylococcal substances. *J Antimicrob Chemotller.* 2010, 48:209-217.
- [46] Arpatzi, A., Avlami, A., Papaparaskevas, J., Daikos, G.L., Stefanou, I., Katsandri, A., Vasilakopoulou, A., Chatzigeorgiou, K.S., Petrikkos, G.L. Incidence and risk factors for central vascular catheter-related bloodstream infections in a tertiary care hospital[J]. *New Microbiol.* 2012, 35(4):429-437.
- [47] Naomi, P. O' Grady, Mary, A., Lillian, A. Burns, E. Patchen, D. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections *American Journal of Infection Control* May 2011.
- [48] Zetola , N., Francis, J. S., Nuernberger, E. L., et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat [J]. *Lancet Infect Dis,* 2005, 5 (5): 275-286.
- [49] Higuchi, W., Takano ,T., Teng, L. J ., et al. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII[J]. *Biochem Biophys Res Commun,* 2008, 377(3):752-756.
- [50] 熊祝嘉, 肖盟, 王贺, 等. 中国 7 所教学医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学及耐药性研究[J]. *中国感染与化疗杂志,* 2012(1): 22-26.
- [51] Li, L., Zhou, L., Wang, L., et al. Characterization of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcal* isolates from bovine milk in Northwestern China[J]. *PloS One,* 2015, 10(3): e116699.
- [52] Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J. N., et al. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis[J]. *Vet Microbiol,* 2011,53( 3/4) : 285-292.
- [53] Tanya, S., Daniela, A., Encho, Savovb. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria[J]. *The Brazilian Journal of Infection Diseases,* 2016,20(2):127-133.
- [54] Karageorgopoulos, D.E., Falagas, M.E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis.* 2008, 8:751-762.
- [55] Naomi, P. O' Grady, Mary, A., Lillian, A. Burns, E. Patchen, D. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections *American Journal of Infection Control* May 2011,22(3):1900-1908.
- [56] Matthaios, P. O, Sevasti F., Eleanna, D., et al. Biofilm synthesis and presence of virulence factors among enterococci isolated from patients and water samples[J]. *J Med Microbiol,* 2015, 64(11): 1270-1276.

- [57] Neidig, A., Yeung, A.T., Rosay, T., et al. TypA is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BMC Microbiol*, 2013; 13: 77.
- [58] O' Grady, N.P., Alexander, M., Burns, L.A., Dellinger, E.P., Heard, S.O., Lipsett, P.A., et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections [J]. *American Journal of Infection Control*. 2011, 39(4):1-34.
- [59] Soares, R. O., Fedi, A. C., Reiter, K. C., et al. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates[J]. *Virulence*, 2014, 5(5): 634-637.
- [60] Brossard, K.A., Campagnari, A.A. The acinetobacter baumannii biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2012, 80 (1) : 228-233.
- [61] 张洋洋, 陈良安, 张庆, 等. 鲍曼不动杆菌毒力机制研究进展[J]. *河北医学*, 2017, 23(2):340-443.
- [62] De Gregorio, E., Del Franco, M., Martinucci, M., et al. Biofilm-associated protein: news from *Acinetobacter*[J]. *BMC Genomics*, 2015, 14(16):933.
- [63] Doi, Y., Murray, G.L., Peleg, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36(1):85-98.
- [64] Bentancor, L.V., Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., et al. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Bacteriol*, 2012, 194(15) : 3950-3960.
- [65] Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., et al. Biofilm- Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates[J]. *Front Public Health*, 2016, 24(4) : 105.
- [66] 陈洁, 邵鸿迎, 赵明, 等. 肺炎克雷伯菌毒力因子的分布特征及其对小鼠的致死性[J]. *中国科技论文*, 2015, 10(6):659-662.
- [67] Lau, Y. J., Hu, B.S., Wu, W. L., et al. Identification of a major cluster of *Klebsiella pneumoniae* isolates from patient with liver abscess in Taiwan[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(1):412-414.
- [68] Podschun, R., Ullmann, U. *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11(4):589-603.
- [69] Sato, H., Frank, D.W. Intoxication of host cells by the T3SS phospholipase *exoU*: PI(4,5)P<sub>2</sub>-Association, cytoskeletal collapse and late phase membrane blebbing[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e103127.
- [70] Howell, H.K., Logan, L.K., Hausera, A.R. Type III secretion of *exoU* is critical during early *pseudomonas aeruginosa* pneumonia [J]. *MBio*, 2013, 4(2):e00032.
- [71] Rangel, S.M., Diaz, M.H., Knoten, C.A. et al. The role of *exoU* in dissemination of *pseudomonas aeruginosa* during pneumonia[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(6): e10004945.
- [72] Karthikeyan, R.S., Priya, J.L., Leal, S.M. et al. Host response and bacterial virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* corneal ulcers[J]. *PLoS One*, 2013; 8(6):e64867.

- [73] Sullivan, E., Bensman, J., Lou, M. et al. Risk of Developing Pneumonia Is Enhanced by the Combined Traits of Fluoro-quinolone resistance and Type III Secretion Virulence in Respiratory Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Crit Care Med*, 2013,21(8):77-82.
- [74] 鞠晓红, 李瑶, 王月华, 等.铜绿假单胞菌毒力基因 *exoS*、*exoU* 临床分布及耐药性研究[J].*中国医院药学杂志*, 2017, 37(1):48-51.
- [75] Li, M.,Wang, X., Gao, Q., et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai,China[J].*J Microbiol*.2009,58(5):456-461.
- [76] 陈颖, 雷玉洁, 黄云超, 等.聚集相关蛋白基因与转化生长因子 $\beta$ 1 对肺癌相关生物材料表皮葡萄球菌生物膜形成的影响[J], *中国肺癌杂志*, 2014, 14(4):308-314.
- [77] Gad, G.F., El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., et al. Detection of *ica A*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2009,3(5):342-351.
- [78] Agarwal, A., Jain, A. Glucose & chloride induce biofilm production & *ica* operon in clinic isolates of *Staphylococci*[J]. *Indian J Med Res*, 2013,138: 262-266.
- [79] França, A., Freitas, A.I., Henriques, A.F. et al. Optimizing a qPCR gene expression quantification assay for *S.epidermidis* biofilms: A comparison between commercial kits and a customized protocol, 2012, 7(5) : e37480.
- [80] 李燕, 李冬冬, 陶传敏, 等.表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测与评价[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(4): 473-476.
- [81] 龚风云, 刘丽娜, 邢铭友, 等. 表皮葡萄球菌耐药与生物膜的相关研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(1):20-23.
- [82] 王醒, 江筱莉, 周昱薇, 等.纳米银/聚氨酯覆膜新型抗菌气管导管在家兔体内的抑菌效果研究[J].*中国医疗设备*, 2013, 28(8): 20-22.
- [83] McDaniel, T.K., Kaper, J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E.coli* K-12[J]. *Mol Microbiol*, 1997, 23(2):399-407.
- [84] Wales, A.D., Woodward, M.J., Pearson, G.R. Attaching effacing bacteria in animals [J].*J Comp Pathol*, 2005, 132 (1):1-26.
- [85] Gao, X., Bao, S.Z., Shi, J., et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of intimin polypeptides of enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J].*Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2008,32(4):316-318.
- [86] Wu, Z.X., Zhou, Y., Gong, S.J.,et al. Bioinformatics analysis of the intimin *eae* gene of enterohemorrhagic *E.coli*( EHEC) O157: H7[J].*Journal of Tropical Medicine*, 2008,8(2):93-96.
- [87] 李阳, 沈瀚, 张之烽, 等.尿培养产 C T X -M 大肠埃希菌的种系分型与毒力特点分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(8):1693-1695.
- [88] The Ministry of Health of the People's Republic of China. WS 271-2007 diagnostic criteria of infectious diarrhea[S].Beijing: The Ministry of Health of the People's Republic of China, 2007.
- [89] 陈强, 卢珊, 赵爱兰, 等.大肠埃希菌(EHEC/EPEC)紧密黏附素基因的分型分析[J].*疾病监测*, 2012, 27(2):93-97.

- [90] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 365-374.
- [91] Kafil, H. S., Mobarez, A. M., Moghadam, M. F. Adhesion and virulence factor properties of Enterococci isolated from clinical samples in Iran[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2013, 56(3): 238-242.
- [92] Heidari, H., Emaneini, M., Dabiri, H. et al. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients[J]. Microb Pathog, 2016, 90(10): 93-97.
- [93] Hossein, S. K., Ashraf, M, M., et al. Gentamicin induces efaA expression and biofilm formation in Enterococcus faecalis[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 92:30-35.
- [94] Hamid, H., Mohammad, E. et al. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 90:93-97.
- [95] Yang, J. Y., Park, J., Jiseon, K. et al. Lipoteichoic acid of enterococcus faecalis inhabits the differentiation of macrophages into osteoclasts[J]. J Endod, 2016, 42:570-574.
- [96] Haruaki, K., Naomi, I. et al. Evolution of resistance to cationic biocides in Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis[J]. J Dent, 2016, 47:18-22.
- [97] Luo, G., Lin, L., Ibrahim, A.S. et al. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant Acinetobacter baumannii infection[J]. PLoS One, 2012, 7(1):e29446.
- [98] Pan, Y.J., Fang, H.C., Yang, H.C., et al. Capsular polysaccharide synthesis region in Klebsiella pneumonia NT-UH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(14):4492-4501.
- [99] Hubert, C., Houot, A.M., Corvol, P., et al. Structure of the angiotensin 1-converting enzyme gene[J]. J Biol Chem, 1991, 266(23):15377-15383.
- [100] Forsyth, J.S., Reilly, J., Fraser, C.G., et al. Angiotensin converting enzyme activity in infancy is related to birth weight[J]. Arch Dis Fetal Neonatal Ed, 2004, 89(5):442-444.
- [101] Collins, M., Xenophontos, S.L., Cariolou, M.A., et al. The ACE gene and endurance performance during the south African Ironman Triathlon[J]. Med Sci Sports Exerc, 2004, 36 (8):1314-1320.
- [102] Matsumoto, A., Iwashima, Y., Abiko, A. et al. Detection of the association between a deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and advanced diabetic retinopathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 50(3):195-202.
- [103] Conti-Patara, A., de Araujo, C. J., de Mattos-Junior, E., de Carvalho, H.S., Reinoldes, A., Pedron, B.G., Patara, M., Francisco, T., Faustino, M., de Oliveira, C.M. et al. Changes in tissue perfusion parameters in dogs with severe sepsis/septic shock in response to goal-directed hemodynamic optimization at admission to ICU and the relation to outcome[J]. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 2012, 22:409-418.
- [104] Chen, Y.X., Li, C.S. Arterial lactate improves the prognostic performance of severity score systems in septic patients in the ED [J]. Am J Emerg Med. 2014, 32(9):982-986.

- [105] Zapata-Tarres, M., Arredondo-Garcia, J.L., Rivera-Luna, R., Klunder-Klunder, M., Mancilla-Ramirez, J., Sanchez-Urbina, R., Vazquez-Cruz, M.Y., Juarez-Villegas, L.E., Palomo-Colli, M.A. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism increases susceptibility to septic shock in children with acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Infect Dis.* 2013, 32:136-139.
- [106] Kothari, N., Bogra, J., Abbas, H., Kohli, M., Malik, A., Kothari, D., Srivastava, S., Singh, P.K. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock[J]. *Cytokine.* 2013, 61: 676-681.
- [107] Madach, K., Aladzsyi, I., Szilagy, A., Fust, G., Gal, J., Penzes, I., Prohaszka, Z. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study[J]. *Crit Care.* 2010, 14:79-83.
- [108] Urhan, K.M., Sucu, N., Sahan, F.S., Aytacoglu, B.N., Vezir, O., Bozali, C., Canacankatan, N., Kul, S., Tunctan, B. Role of ACE I/D gene polymorphisms on the effect of ramipril in inflammatory response and myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass grafts[J]. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014, 70:1443-1451.
- [109] Doerschug, K.C., Delsing, A.S., Schmidt, G.A., Ashare, A. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis[J]. *Crit Care.* 2010, 14(1):24-31.
- [110] Cogulu, O., Onay, H., Uzunkaya, D., Gunduz, C., Pehlivan, S., Vardar, F., Atlihan, F., Ozkinay, C., Ozkinay, F. Role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in children with sepsis and septic shock[J]. *Pediatr Int.* 2008, 50:477-480.
- [111] Graebin, P., Veit, T.D., Alho, C.S., Dias, F.S., Chies, J.A. Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients[J]. *Crit Care.* 2012, 16: 211-220.
- [112] Rahimi, Z. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy[J]. *J Nephrothol.* 2012, 1:143-151.
- [113] Cazalis, M.A., Lepape, A., Venet, F., Frager, F., Mougin, B., Vallin, H., Paye, M., Pachot, A., Monneret, G. Early and dynamic changes in gene expression in septic shock patients: a genome-wide approach[J]. *Intensive Care Med Exp.* 2014, 2(1):1-17.
- [114] Nakada, T.A., Russell, J.A., Boyd, J.H., McLaughlin, L., Nakada, E., Thair, S.A., Hirasawa, H., Oda, S., Walley, K.R. Association of angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene polymorphism with increased mortality in septic shock[J]. *Crit Care Med.* 39:1641-1648.
- [115] Qin, Y.H., Zhou, T.B., Su, L.N., Lei, F.Y., Huang, W.F., Zhao, Y.J. Association between ACE polymorphism and risk of IgA nephropathy: a meta-analysis[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone.* 2011, 12:215-223.
- [116] Kalita, J., Misra, U.K., Bindu, I.S., Kumar, B. and Mittal, B. Angiotensin-converting enzyme (rs4646994) and alpha ADDUCIN (rs4961) gene polymorphisms' study in primary spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Neurol India.* 2011, 59:41-46.

## 综 述

### 综述一 CVC 置管与导管相关性血流感染的研究现状

中心静脉导管 (central venous catheter, CVC) 在临床上主要用于抢救危重患者, 首先对锁骨下静脉、颈内静脉或骨静脉穿刺, 顺着穿刺点的方向按照血管的走向将导管插入到腔静脉的一种操作技术。该技术所用的导管粗大、允许更大的血流量和流速、导管的长度也比较短, 输入液浓度和 pH 值对其也没有影响, 对血管壁的刺激也很小, 基于上述优点该技术在临床上有广泛的应用, 例如治疗、输血、中心静脉压的检测、心血管疾病的介入治疗和肠外营养等。但它本身是一项有创性操作, 破坏了皮肤这一天然保护屏障, 随之带来了较多并发症, 其中最严重的并发症为导管相关性血流感染 (Catheter Related Bloodstream Infection, CRBSI), 这增加了患者的住院时间、费用, 影响了患者的生活质量, 预后较差并且死亡率也升高, 给患者及家人带来了巨大的压力<sup>[1-3]</sup>。CVC 分为长期导管和短期导管, 长期导管主要为那些需要长期静脉输液、化疗和血透的患者提供的静脉通道。短期的 CVC 是最常用的 CVC, 目前大部分的 CRBSI 都是由此类导管引起的<sup>[4]</sup>。在英国, 每年有接近 200,000 人置入 CVC 导管<sup>[5]</sup>。据美国医疗机构评鉴联合会统计, 美国每年有 250,000 到 500,000 的中心静脉导管相关血源性感染, 导致 20%-30% 的死亡率<sup>[6]</sup>; 而在其 ICU, 每年有 80,000 人次的 CRBSI 发生<sup>[7]</sup>, 且 ICU 的 CRBSI 平均发生率为 2.9~11.3/1000 导管日<sup>[8]</sup>; 在 NICU, CRBSI 的发生率为 0.6-2.5/千导管日<sup>[9]</sup>; 根据美国疾病控制与预防中心的数据统计显示, ICU 中约有 20% 会感染血流感染, 并且这些感染中约 87% 是与 CVC 置管相关, 由 ICU 而感染 CRBSI 并导致的最终死亡率约为 20%~60%<sup>[10]</sup>; Wu 等人研究显示 CRBSI 发生率为 8.0% (38/477), 相当于 5.6/千导管日<sup>[11]</sup>; 李骏等对 ICU 内 67 名中心静脉导管患者进行了相关研究<sup>[12]</sup>, 发现导致的 CRBSI 发生率进行了相关研究, 研究发现 CRBSI 的发生率为 6.8% 左右, 最终有 24 人死亡, 全部 ICU 中 CRBSI 的发病率为 3.82/千导管日, 而 CRBSI 的发生率约为 3.5%<sup>[13]</sup>。可见, CRBSI 的发生率参差不齐, CRBSI 的发生率与一些客观条件, 如社会经济发展不平衡、医院规模、科室设置、不同的年代、与不同的试验设计、不同的 CRBSI 的定义、及疾病构成有相关性, 与导管、患者自身因素、操作及维护都有很大的关系。

#### 1 CRBSI 的定义

根据美国传染病协会 (IDSA) 对导管定植 (catheter colonization, CC) 和 CRBSI 的定义<sup>[14]</sup>: CC 是指: 导管尖端 5 cm 节段半定量培养细菌计数 > 15CFU 或导管尖

端定量培养细菌计数>1000CFU/平皿。

CRBSI 是指带有血管内导管或者拔除血管内导管两天内，患者出现不明显的血源性感染症状体征但又无其他明显的感染源，并出现以下情况之一则可诊断 CRBSI：1、导管尖端和至少一份外周血培养出同一种致病菌。2、对于定量血培养，从导管接口部位留取的血标本培养，菌落数需至少是外周静脉血培养的 3 倍；且留自导管接口部位的血标本培养较外周静脉血标本提前至少 2h 检测到细菌。3、当有从两个不同导管腔获得的两份定量血培养，一份的血液样本菌落数至少是另一份的 3 倍。

### 1.1 CRBSI 的常见感染途径<sup>[10]</sup>

1.1.1. 皮肤定植菌直接从置管入口处顺着导管表面在导管尖端定植。

1.1.2 操作中手的接触与污染液体导致导管的直接污染。

1.1.3 身体其他的部位的感染，细菌通过血液到达导管的表面。

1.1.4 输液时液体的污染也会导致导管的污染。

#### 1.1.2 CRBSI 的病原学和发病机制

目前在国内，抗生素的应用率远高于国外。据调查，我国门诊感冒者使用抗生素的患者高达 75%，而在外科手术围术期应用抗生物的情况更是高达 95%，在住院患者中使用抗生素的比率接近 80%，而据统计，应该使用抗生素的比率仅为 22%，即使世界的评价使用抗生物水平也仅有 30%，通过上述数据分析也暗示了医院 CRBSI 的发生和转归都在发生明显变化，因此，对病原菌类型的确定和对应药物的选择就显得更加重要，在同一地区，或同一地区不同级别的医院中病原菌的差别也相当大。

### 1.2 CRBSI 的菌群特点

随年代不同，院内血液感染病原体的类型有所变化，因医院科室的环境、药物的应用以及医务人员的操作等血液感染病原体也存在差异。上世纪 80 年代，最常见的是金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌，而到 90 年代后是凝固酶阴性葡萄球菌和肠球菌更为多见，并且耐万古霉素的肠球菌和甲氧西林耐性葡萄球菌占绝大部分，超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠杆菌和肺炎克雷伯杆菌是主要的革兰阴性杆菌，并且研究发现，革兰氏阴性杆菌和念珠菌所导致的 CRBSI 的比例逐年递增<sup>[8]</sup>。尽管近年来从 ICU 分离出来金黄色葡萄球菌中 MASA 大于 50%，但可能由于一些措施的执行，由 MASA 导致的导管相关血源性感染几率有所下降。

大肠杆菌和克雷伯杆菌对于第三代头孢类的耐药性明显增强，另外，铜绿假单胞菌对亚胺培南和头孢他啶的耐药性也增加，白色念珠菌的上升主要是由于氟康唑耐药，也可能营养物质的输入有关，真菌对营养物质具有较强的黏附力。《美

国预防静脉导管相关感染指南》2011 版中说明 CRBSI 的最为常见菌株是肠球菌、念珠菌、凝固酶阴性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌,张淑香等通过对 72 例 CVC 相关感染患者的细菌鉴定,结果表明,其中绝大部分为真菌感染,高达 59.7%,金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌相对较低为 21%<sup>[14]</sup>,而杨大运等在研究中共分离出 53 株病原菌,其中最主要的是革兰阳性球菌,约占 50.94%,阴性菌占 22.64%,真菌占总菌种的 26.42%<sup>[15]</sup>,这与李骏等结果显示相接近<sup>[12]</sup>,但他们的研究发现革兰阳性菌以表皮葡萄球菌为主,鲍曼不动杆菌是最主要的革兰氏阴性菌。周宏等对 ICU 中 CRBSI 致病菌进行了排序,革兰氏阴性菌是最主要的致病为 66.7%,其次为革兰氏阳性菌和真菌<sup>[13]</sup>。为主要的致病菌,可能与 ICU 中病情危重需要大量使用第三代头孢类抗生素有关,导致体内正常菌群抑制和菌群失调,这也使得一些寄生人类皮肤和粘膜的正常菌群开始引起 CRBSI,比如棒状杆菌属纹状体菌<sup>[16]</sup>,它是一种正在兴起的医院感染病原体,但因它可以从血培养中作为常见污染物分离出来,因此很容易忽视它本身感染的诊断;克氏库克菌很少在临床样本中分离出来且被认为是非致病菌<sup>[17]</sup>;柯达酵母是一种罕见的酵母病原体<sup>[18]</sup>,很容易被错认定为念珠菌属,它高病死率,小孩容易发生这类菌的感染,而且目前也没有一种确切的治疗方法。因此这一些少见的导致 CRBSI 的菌群也应该得到注意。

## 2 CRBSI 的相关因素

### 2.1 患者自身因素

患者的年龄、抵抗力、化疗、白细胞数目高低以及各种基础性疾病都会影响 CRBSI 的发生概率,有数据统计分析表明,高龄、糖尿病都是发生 ICU 导管相关血流感染的高危因素。糖尿病患者本身免疫力就会降低<sup>[19]</sup>。癌症和化疗也被认为是 CRBSI 的危险因素<sup>[20]</sup>,癌症患者一般需要接受长期化疗,化疗会影响白细胞计数,而白细胞过低患者免疫力下降容易发生感染; Tarpatzi 等也表明使用皮质类固醇、糖尿病、实体器官肿瘤是 CRBSI 的发生的危险因素<sup>[21]</sup>。江丽萍等研究发现随着年龄的增长,引发患者导管相关性感染的概率也会升高,大于 80 岁的老人,其导管相关性感染的比例约为 12.43%,而与之形成鲜明对比的是,小于 40 岁的患者,其感染率仅为 2.78%<sup>[22]</sup>。宋瑰琦等研究显示患者的年龄、昏迷程度、直接与感染相关<sup>[23]</sup>;另外患者如果在置管时有脓毒症也是发生 CRBSI 的独立危险因素<sup>[24]</sup>,因为脓毒症本身就是全身炎症反应综合征,全身处于一个低免疫状态,置入 CVC 后细菌就更容易侵袭导管然后引发血源性感染。

### 2.2 医护人员医护操作技术不熟练及对相关知识掌握不够

置管医师的技术熟练程度与 CRBSI 的发生概率息息相关,刘鲁沂等对医师

置管熟练程度和相关脓毒性感染概率间的关系进行了研究, 研究表明, 相比技术操作熟练的医师, 置管经验少于 50 次的医师, 其置管导致的脓毒症发生的风险要高于两倍<sup>[25]</sup>, 有研究导管相关性感染与插管次数有关, 多次穿刺可造成血管壁的损伤产生炎性反应, 导致细菌的停留黏附<sup>[26]</sup>; 此外, 操作时间长短、无菌物和导管插入管暴露在外时间的长短都对感染有重要的影响。湛绍林等对 ICU 护士对《血管内导管相关感染预防指南(2011)》知识掌握情况进行调查发现护士对相关知识掌握甚少, 及格率非常低, 导致她们在护理 CVC 置管的患者的时候可能会存在问题, 这也是影响 CRBSI 发生的一个重要因素<sup>[27]</sup>。

### 2.3 导管因素

导管材质: 聚苯乙烯、聚乙烯、聚氨基甲酸乙酯和硅胶是现代医学所有导管的主要材质, 对材质的要求是质量优良、表明光滑, 这样可以避免细菌的微生物和纤维在导管表明聚集和残留, 不同材质的导管对患者病情影响较大, 如对使用以聚氯乙烯为材质的导管患者的观察发现, 其发生血栓性静脉炎的概率增加到 70%, 而与之对对照明显的是使用硅胶管的患者, 其发生概率仅为 20%<sup>[28]</sup>。

导管的官腔: CRBSI 的发生概率随着导管官腔数的增加而升高, 多个研究组通过临床统计学数据验证了这个结论<sup>[29]</sup>, 通过统计学分析表明 CVC 官腔数不同, 对患者 CRBSI 的发生概率也有明显不同 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 导管留置部位

在颈内静脉、锁骨下静脉和股静脉可以进行 CVC 导管留置。刘凤梅等建议无其他特殊因素, 首选锁骨下静脉, 研究中在锁骨下静脉进行 CVC 导管留置其感染率为 20%, 颈内静脉进行 CVC 导管留置其感染率为 35.6%, 股静脉进行 CVC 导管留置其感染率为感染率上升为 70%, 统计学分析表明, 这三种 CVC 导管留置方式具有明显的差异, 统计结果具有生物学显著差异 ( $P < 0.05$ )<sup>[30]</sup>, 与谢先会等研究结果相似<sup>[31]</sup>。Arvaniti K 等一项网状 meta 分析中表明对 ICU 成人的短期和无隧道导管来说, 与股静脉相比较, 颈内静脉和锁骨下静脉在降低 CRBSI 方面的风险是差不多的; 但锁骨下静脉细菌定植的风险最小, 如果考虑到定植风险, 除非是锁骨下静脉有禁忌, 锁骨下静脉都是最合适的穿刺位置<sup>[32]</sup>。

### 2.5 导管留置时间和置管地点

留置导管的时间越长, CRBSI 发生的概率就会越高, 其主要原因是由于导管在留置超过 24 h 后纤维蛋白鞘会将其包裹, 导致细菌等以纤维蛋白为基质进行大量繁殖<sup>[30]</sup>。刘凤梅等研究数据表明留置天数小于 1 周组感染率为 19.4%, 8 天~2 周组感染率则上升为 41.7%, >2 周组感染率达到惊人的 52.6%<sup>[30]</sup>, Hashimoto Y 等对胃肠道术后的患者的 CVC-BSI 进行研究得出留置时间>14 天的

相对<14 天的患者更容易导致 CRBSI<sup>[33]</sup>。周宏等人的研究结果也证明了导管留置时间和部位作为 CRBSI 的独立因素而存在<sup>[13]</sup>。

## 2.6 输入液体的类型

Peng S 等<sup>[34]</sup>发现诊断 CRBSI 前如果使用>3 种抗生素会使患者发生 CRBSI 的风险增加 7 倍；Hajjej Z 等也认为在插管前使用一种或多种抗生素会增加 CRBSI 的风险<sup>[24]</sup>，这主要是由于广泛的使用广谱抗生素，可抑制正常菌群和导致菌群失调，增加感染机会。研究发现全肠外营养（TPN）能增加 CVC-BSI 的发生风险，且随 TPN 时间增加发生风险也增加<sup>[35]</sup>；但研究表明肠外营养与导管细菌定植发生有很大关系并非 CRBSI，这些疑问有待进一步研究证明。有统计分析表明，输液类型作为中心静脉导管相关性感染的独立影响因子而存在<sup>[30]</sup>。静脉营养液与输血组感染率显著高于普通输液组，可能因为营养物质和血液都很粘稠且二者滴注的速度非常慢，会导致导管壁上有大量的残留，而为细菌的增殖提供便利。

## 2.7 操作维护中的因素

操作及维护中无菌操作不规范、导管固定不当、敷料更换不及时、冲封管技术不到位、配液或输液时对液体的污染等等都与 CRBSI 的发生相关。

## 2.8 多个静脉通路及导管的附加装置

CRBSI 的发生概率随着 CVC 置管的数量而不断增加，在多个中央导管存在的情况下，CRBSI 的发生风险甚至会增加 6 倍<sup>[34]</sup>，钟华等研究表明，附加连接装置可增加导管污染的机会：增加 1 个装，污染的发生率为 0.78%，增加 2 个装置，发生率增加为 1.51%。静脉通路越多，尤其的无菌操作不严格的情况下，感染的机会就越大<sup>[36]</sup>。

## 2.9 健康教育与随访质量

对于一些需要长期静疗或静脉营养的患者置入 CVC 导管回家后，对患者的健康教育和随访做的不好也会导致其 CRBSI 的风险增加<sup>[37]</sup>，作者指出最常见导致这类 CRBSI 的细菌为寄生于皮肤的微生物，因此突出了对患者的健康教育尤其是皮肤的卫生方面的重要性。

## 2.10 其他因素

导管相关的感染概率也入住 ICU 时间息息相关<sup>[23]</sup>，王莎莎等研究表明入住 ICU、使用呼吸机≥30d、气管置管≥2 次是感染发生的独立危险因素（ $P<0.05$ ）<sup>[38]</sup>，可能因为这些因素均可以影响患者的免疫功能及疾病转归。ICU 病房收治的患者，大多数病情复杂，合并多种疾病。在治疗中，广谱抗生素、激素、免疫抑制剂等药物的应用难以避免。尤其是广谱抗生素的使用，因此而造成的病原菌耐药率的

问题也日趋严重,甚至出现对多种抗生素耐药的“超级细菌”,使得感染性疾病的治疗难度进一步加大。

### 3 CRBSI 的诊断

CRBSI 的诊断主要依赖于其临床表现及实验室检查结果。

#### 3.1 临床表现

由于 CRBSI 的发病缺乏特异性特征,因此临床上多采用拟诊 CRBSI,临床上常见的临床性状包括发热、寒战或置管部位红肿、硬结或有脓液渗出。病情严重者可脏灌注入不足的表现,如低氧血症、高乳酸血症、少尿、甚至休克、弥漫性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC)、多脏器功能衰竭 (multiple organs dysfunction syndrome, MODS)。由于其缺少特异性和敏感性,所以不能以此为依据建立诊断。一些敏感性较高的临床表现,如发热(伴或不伴有寒颤)缺乏特异性,而在置管部位周围的炎症和化脓虽有较高特异性却缺少敏感性。有研究显示,存在 CRBSI 时,局部炎症表现却不常见。有作者认为,凝固酶阴性葡萄球菌为 CRBSI 的主要病原菌,该菌很少引起感染的局部或全身征象,这一现象很可能与此有关。若置管部位有明显的炎症表现,特别当病人同时伴有发热或严重全身性感染的临床表现时应该考虑 CRBSI 系由金黄色葡萄球菌或革兰阴性杆菌引起。在缺少实验室检查依据时,具有血行感染临床表现的病人,若拔除可疑导管后体温恢复正常,仅能作为 CRBSI 的间接证据。除此以外,还可伴有消化道症状,如恶心、呕吐等,于导管皮下隧道附近偶可见红斑、硬结、触痛或化脓。CRBSI 的临床表现还可以包括:低血压、心动过速、持续性细菌血症或真菌血症、败血症休克、中心静脉的化脓性血栓性静脉炎、动脉炎、血源性肺部感染和医院获得性心内膜炎、骨髓炎和其他迁徙性感染症状等。

CRBSI 的临床表现因原发病、病原菌和患者情况而有较大差异。年老体弱者、婴幼儿、基础情况差的患者可不发热,甚至表现为低体温、白细胞可不上升反而下降,因此对这类患者及免疫缺陷患者,临床怀疑有血行感染者,尤其是有低血压、少尿等脏灌注入不足等表现及血小板计数下降,有出血征象者,应及时抽取血培养,以明确诊断。CRBSI 引起的败血症特点是:插管部位外观正常或微红,可以无明显败血症体征,白细胞总数可以正常;当导管入口处有蜂窝织炎或脓性分泌物时,病情已经较严重了等特点,因此当接受导管治疗的病人,出现不明原因的发冷、发热,首先应考虑导管感染或败血症,如血培养阳性、导管尖端细菌培养为阳性时,则应诊断为败血症。

#### 3.2 实验室检查

实验室检查在 CRBSI 的诊断中占有重要地位。在 1996 年美国疾病控制中心

(U.S. Centers for Disease Control and Prevent, CDC) 关于 CRBSI 的诊断标准和 2001 年中华人民共和国卫生部《医院感染诊断标准(试行)》中, 血培养和导管尖端的培养结果都占有重要位置, 但并未明确临床拟诊和确诊的严格标准。

### 3.3 CRBSI 的诊断

2008 年, 我国学者在《血管内导管相关感染的预防与治疗指南(2007)》中完全明确 CRBSI 的拟诊和确诊标准: 具备下述任一项, 可证明导管为感染来源:

3.3.1 有 1 次半定量导管培养阳性(每导管节段 $\geq 15$  CFU)或定量导管培养阳性(每导管节段 $\geq 1000$  CFU), 同时外周静脉血也培养阳性并与导管节段为同一微生物;

3.3.2 从导管和外周静脉同时抽血做定量血培养, 两者菌落计数比(导管血: 外周血) $>5:1$ ;

3.3.3 从中心静脉导管和外周静脉同时抽血做定性血培养, 中心静脉导管血培养阳性出现时间比外周血培养阳性至少早 2 h;

3.3.4 外周血和导管出口部位脓液培养均阳性, 并为同一株微生物。

### 3.4 临床诊断

具备下述任一项, 提示导管极有可能为感染的来源:

3.4.1 具有严重感染的临床表现, 并导管头或导管节段的定量或半定量培养阳性, 但血培养阴性, 除导管无其他感染来源可寻, 并在拔除导管 48 h 内未用新的抗生素治疗, 症状好转;

3.4.2 菌血症或真菌血症病人, 有发热、寒战和(或)低血压等临床表现且至少两个血培养阳性(其中一个来源于外周血), 其结果为同一株皮肤共生菌(例如: 类白喉菌、芽孢杆菌、丙酸菌、凝固酶阴性的葡萄球菌、微小球菌和念珠菌等), 但导管节段培养阴性, 且没有其他可引起血行感染的来源可寻。

### 3.5 拟诊

具备下述任一项, 不能除外导管为感染的来源:

3.5.1 具有导管相关的严重感染表现, 在拔除导管和适当抗生素治疗后症状消退;

3.5.2 菌血症或真菌血症病人, 有发热、寒战和(或)低血压等临床表现且至少有 1 个血培养阳性(导管血或外周血均可), 其结果为皮肤共生菌(例如: 类白喉菌、芽孢杆菌、丙酸菌、凝固酶阴性的葡萄球菌、微小球菌和念珠菌等), 但导管节段培养阴性, 且没有其他可引起血行感染的来源可寻。

因 CRBSI 的临床诊断较困难, 多根据临床表现拟诊。因此实验室检查就成为 CRBSI 诊断的主要依据, 其中导管培养又是 CRBSI 诊断的“金标准”。依据《血管内导管相关感染的预防与治疗指南(2007)》, 对于保留 CVC 者, 出现

临床感染症状而需行实验室检查时：（1）标本采集至少 2 套血培养，其中至少一套来自外周静脉，另一套从导管采集，两个来源的采血时间必须接近；（2）如果两套血培养阳性且为同种菌：如缺乏其它感染证据，提示可能为 CRBSI；（3）来自导管的血培养报阳时间比来自外周静脉的早 2 h，提示为 CRBSI；（4）报阳时间差异小于 2 h，但耐药谱一致，同时缺乏其它感染证据，也可能提示为 CRBSI；（5）来自导管血培养的细菌数量为至少 5 倍于外周静脉血培养，如果缺乏其它感染证据，提示可能为 CRBSI；（6）如果仅是来自导管的血培养为阳性，不能确定为 CRBSI，可能为定植菌或采集血标本时污染；（7）如果仅是来自外周静脉的血培养为阳性，不能确定为 CRBSI，但如为金黄色葡萄球菌或念珠菌，在缺乏其它感染证据则提示可能为 CRBSI；（8）如果两套血培养为阴性，则可排除 CRBSI。

#### 4 CRBSI 的管理措施

一项系统的综述中指出对 CVC 的管理可以通过综合性的干预措施，如：对照顾者和置管者的教育培训、对安全文化的重视、定期评估措施的实施程度、监测导管感染率并反馈给工作者再结合一些具体措施<sup>[39]</sup>。

**4.1 制定严格的准入制度。**加大对置管操作者的培训和考核力度，加强对医师置管操作的培训和考核，对护理团队进行 CVC 相关知识的学习和培训，着重培养新进入 ICU 相关护士的知识考核，提高其医护操作技能、对工作进行规范化、并将无菌观念灌入到每位护士的日常工作中，只有这样才能更加安全的式样留置导管。Craig M 等表明加强护理人员的教育与培训有利于减低 CRBSI<sup>[40]</sup>。另外，建立一个跨学科的协作团队，如医师、护士、麻醉师、营养师等等，其中认可护士作为跨学科团队的干预措施的潜在领导人是非常重要的<sup>[41]</sup>。

**4.2 严格执行消毒隔离措施。**有研究表明，严格执行无菌操作，能明显降低中心静脉导管相关感染的发病率。在大多数研究发现，CRBSI 感染主要以革兰氏阳性菌为主，且金黄色葡萄球菌及表面葡萄球菌占主要位置，更应严格执行消毒隔离措施。具体措施有：执行各项护理操作前后认真、彻底的洗手；严格执行操作规范；定期更换敷料，并保持穿刺点的无菌状态；减少导管接口的附加装置（三通及延长管）；减少开启接口的次数。

**4.3 合理使用抗生素。**在高度怀疑中心静脉 CRBSI 时，及时拔除导管并同时送检血培养及导管尖端培养，以尽早明确病原菌，选用敏感抗生素；在培养结果回报之前，可选用对革兰氏阳性菌敏感的万古霉素治疗。

**4.4 严格掌握 CVC 置管的适应症。**避免多次重复置管，留置时间最好不超过 2 周。是否需要更换导管，则视患者病情需要及导管情况确定。

**4.5 CVC 置管部位选择。**尽管本组病例显示颈内静脉与锁骨下静脉置管感

染发生无明显差异,但国内外多数文献报道锁骨下静脉置管感染率低。况且颈部皮肤松弛褶皱,易于细菌繁殖,又靠近气道,在频繁的吸痰操作或者护理切开的气道时难免增加感染机会。锁骨下静脉置管不存在上述问题,同时又便于观察,可以及时发现导管异常,治疗及护理操作空间开阔等优点。因此,在置管的部位选择上,应该以锁骨下静脉作为首选。同时也应该兼顾操作者的技术熟练程度及个人习惯,选择合适的部位进行置管,尽量避免同一部位反复多次进行置管操作。

**4.6 皮下隧道:**对于是否建立皮下隧道置管,以及其与 CRBSI 之间的关系国内外相关报道还较少,从理论上来说,建立皮下隧道在一定程度上可以减缓病原菌沿皮肤进入血流的时间,从而减少病原菌感染的概率,但事实上,皮下隧道在实际临床中并没有相应的减少 CRBSI 发生的几率,所以是否需要建立皮下隧道仍需要大量临床实验证据的支持。

**4.7 建立长期实时动态监测机制。**研究发现,反馈机制和监督机制是非常好的措施<sup>[42]</sup>,可以通过组建 CVC 管理小组,按时对 CRBSI 的感染频率进行及时的调研和监管,找出发病诱因,制定相关治疗和解决措施,最后反馈科室执行,并定期评估措施的实施程度。

**4.8 建立风险评估机制。**医师在置管前应对患者进行风险评估,对高危人群衡量利弊来决定是否置管。置管评估结果一定要反馈到导管维护的护士,以提醒护士在维护中对危险因素的进一步观察与下一步的评估和处理。

#### 4.9 具体操作和维护

**4.9.1** 如无特殊原因,尽量选择材质柔和的硅胶和聚氨酯导管的单腔导管进行锁骨下静脉穿刺,避免反复多次穿刺,尽量不要加入附加装置;李惠萍等的系统评价中表明抗感染导管能显著降低 CRBSI 的发生率 ( $P < 0.001$ )<sup>[43]</sup>; Stocco JG 等系统综述了第二代的 CVC 在减少导管定植菌和 CRBSI 方面的作用<sup>[44]</sup>,它的特点主要是在导管内外部、延长管和中心都侵袭了防腐的洗必泰和磺胺嘧啶银;但是目前对死亡率和不良反应的影响以及相关经济消耗等方面的评价尚不明确;美国疾控中心也推荐当置管时间  $> 5$  天者使用第二代 CVC<sup>[4]</sup>。

**4.9.2** 置管操作注意手卫生并严格坚持最大无菌屏障<sup>[4]</sup>,操作地点最好在专门的置管室,操作维护时都应严格遵循无菌技术原则。

**4.9.3** 及时定期更换敷料,选择正确的敷贴,对于发汗及出口有渗血渗液的应用纱布敷料,推荐每两条更换一次纱布,每 7 天更换一次透明敷贴,如果发现液体、松动或明显的感染要及时更换<sup>[4]</sup>,更换后妥善的固定,季芬芬等研究表明使用康惠尔透明贴换药,可以降低中心静脉导管相关性血流感染率,有待进一步证实<sup>[45]</sup>。

4.9.4 选择正确的消毒剂, 研究表明 2%洗必泰消毒皮肤,可显著降低深静脉 CRBSI 的发生,延长导管留置时间, 但不适用小于两个月的婴儿<sup>[46]</sup>; 另一项研究表明洗必泰与聚乙烯吡咯酮碘溶液和酒精相对, 只在减少导管细菌定植方面存在轻微差异, 而在感染降低和节约费用方面没有明显差异<sup>[47]</sup>。Hina H 等认为使用 0.5%酒精 1%氯己定 2%葡萄糖酸盐配置液进行皮肤消毒结合其他综合性措施有利于降低 CRBSI<sup>[48]</sup>; 徐春婷等研究中认为物理抗菌材料洁悠神抗菌剂喷洒于中心静脉置管患者输液接口及穿刺部位,形成保护膜, 可以减少 CRBSI, 对这些消毒剂的经济适用性评价期待进一步研究<sup>[49]</sup>。

4.9.5 应正确定期冲封管, 在输入大分子溶液及血液前后都应冲管, 不能混用通道, 至于冲管液的选择, 有研究显示在减少 CVC 管道堵塞方面, 肝素盐水并不优于生理盐水, 对于临时置管患者, 使用生理盐水不如肝素盐水效果好, 这还需要大量的实验证据加以验证<sup>[50]</sup>。

4.9.6 在置管前和置管后无需预防性系统的使用抗生素, 这一点《美国预防静脉内导管相关感染指南》2011 版中已经指出。

4.9.7 加强观察置管处的情况等等。

4.9.8 健康教育是关键。对于长期 CVC 置管的患者, 加强对病人和家属导管相关知识培训, 增强其对导管重要性的意识; 另外, 加强对家庭 CVC 置管者的随访, 记录追踪患者导管的情况等, 对长期静脉营养患者为预防 CRBSI, 研究中支持管腔内的乙醇治疗, 因乙醇可用来消毒导管, 防治细菌、真菌等病原菌, 到目前为止, 其耐药性如何还不太清楚<sup>[51]</sup>; 但后面有研究表明浓度>28%酒精锁治疗可导致在官腔里面形成血浆蛋白质沉淀, 且在吸引和冲洗的时候产生堵塞<sup>[52]</sup>; Mokha JS 等也报道通过前期和后期每天预防性酒精锁治疗发现, 一些机械性并发症出现: 堵塞和导管破裂等<sup>[53]</sup>, 虽然因感染导致的 CVC 的替换率下降了, 但是因机械性并发症导致的 CVC 的替换率上升了; 但近期一项研究对 4 个家庭肠外营养的患儿进行长达三年的追踪, 每个月预防性使用乙醇锁治疗, 未出现副作用, 作者认为这是一个可行的方案<sup>[54]</sup>。对于酒精锁治疗的具体方案以及利弊期待进一步研究结果。需要长期置管且无 PICC 置管禁忌患者推荐使用 PICC, PICC 相较于 CVC 操作简便、留置时间相对较少, 并发症较少等优势<sup>[55]</sup>, 一项系统综述与 Mate 分析表明, 对于置入 CVC 的出院病人来说, PICC 患者出院后发生 CRBSI 的风险降低<sup>[56]</sup>。

## 小结

CVC 置管对于危重症患者的救治具有十分重要的价值及意义, 但是置管所引发的导管相关性血流感染 (CRBSI) 的发生, 在临床上普遍存在。由于多重耐药菌等多种因素综合作用, 导致临床对 CRBSI 的治疗十分棘手, 且治疗效果往

往不佳，给患者造成了巨大的生理及精神痛苦，也对其及家庭和社会带来了巨大的经济负担。针对 CRBSI 发生因素的多样性、综合性等特点，如何有效预防 CRBSI 的发生，意义远胜于发生之后的治疗。临床医护人员应分析研究相关影响因素，制定切实可行的防治策略，有效预防 CRBSI 的发生，才能够真正体现 CVC 导管留置的重要使用价值，有效降低感染风险，真正提高危重症患者的救治效果。

## 参考文献

- [1] Dimick, J.B., Pelz, R.K., Consunji, R., Swoboda, S.M., Hendrix, C.W., Lipsett, P.A. Increased use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit[J]. *Arch Surg.* 2001, 136:229-234.
- [2] Warren, D.K., Quadir, W.W., Hollenbeak, C.S., Elward, A.M., Cox. M.J, Fraser, V.J. Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital[J].*Crit Care Med.* 2006, 34:2084-2089.
- [3] Siempos, I.I., Kopterides, P., Tsangaris, I., Dimopoulou, I., Armaganidis, A.E. Impact of catheter-related bloodstream infections on the mortality of critically ill patients:a meta-analysis[J]. *Crit Care Med.* 2009, 37:2283-2289.
- [4] O' Grady, N.P., Mary, A., Lillian, A., Burns, E., Patchen Dellinger, Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections *American Journal of Infection Control.* 2011, 36(4):429-437.
- [5] National Institute for Health and Care Excellence Guidance on the use of ultrasound locating devices for placing central venous catheters. [2015], NICE Technology Appraisal. 2002 (49).
- [6] The Joint Commission Variability of surveillance practices for central line-associated bloodstream infections and its implications for health care reform[J]. *Joint Commission Benchmark.* 2011, 13(2): 6-8.
- [7] Mermel, L.A. Prevention of intravascular catheter-related infections[J]. (Erratum: *Ann Intern Med* 133:395, 2000). *Ann Intern Med.* 2000, 132:391-402.
- [8] O' Grady, N.P., Alexander M, Dellinger EP. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections[J]. *Pediatrics.* 2002, 110(5):1-24.
- [9] Dudeck, M.A., Weiner, L.M., Allen-Bridson, K., Malpiedi, P.J., Peterson, K.D., Pollock, D.A. National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2012, Device-associated module. *Am [J]. Infect Control.* 2013, 41:1148-66.
- [10] Valls, J., Ferrer, R. Bloodstream infection in the ICU E [J]. *InfectD is Clin North Am.* 2009, 23(3):557-569.
- [11] Wu, S., Ren, S., Zhao, H., Jin, H., Xu, L., Qian, S. et al. Risk factors for central venous catheter-related bloodstream infections after gastrointestinal surgery[J]. *American Journal of Infection Control.* 2017, 53(17):30012-30013.
- [12] 李骏, 喻莉, 杨军辉, 龙鼎, 张远超, 卜晓芬. ICU 内中心静脉导管相关性血流感染的调查及危险因素分析[J]. *重庆医学*, 2015, (04):495-497.
- [13] 周宏, 姜亦虹, 沈黎, 李阳, 郑伟, 韩方正, 茅一平, 康海全. 综合医院 ICU 中心静脉导管相关性血流感染发生率及危险因素[J]. *中华医院感染学杂志.* 2012, (12): 2512-2514.
- [14] Mermel, L.A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D.E., Flynn, P., O'Grady, N.P. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009[J]. *Update by the Infectious Diseases Society of America Clin Infect Dis.* 2009, 49 (1):1-45.
- [15] 杨大运, 齐战, 高少伟. 中心静脉导管相关性血流感染危险因素分析[J]. *中华医院感染学杂志.* 2013, 23(14):3366-3368.

- [16] Daisuke, U., Oishi, T., Yamane, K., Terada, K. *Corynebacterium striatum* Bacteremia Associated with a Catheter-Related Blood Stream Infection[J]. *Case Rep Infect Dis.* 2017, 2017:2088-2109.
- [17] Kimura, M., Kawai, E., Yaoita, H., Ichinoi, N., Sakamoto, O., Kure, S. Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection with *Kocuria kristinae* in a Patient with Propionic Acidemia[J]. *Case Rep Infect Dis.* 2017, 2017:1254-1275.
- [18] Kanno, Y., Wakabayashi, Y., Ikeda, M., Tatsuno, K., Misawa, Y., Sato, T., Yanagimoto, S., Okugawa S, Moriya K, Yotsuyanagi H. Catheter-related bloodstream infection caused by *Kodamaea ohmeri*: A case report and literature review [J]. *Infect Chemother.* 2017S1341-321X(17):30016-300168.
- [19] 杨波, 向永胜. ICU 导管相关性血流感染的影响因素及防控措施[J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*. 2016, (04):413-416.
- [20] Gallieni, M., Pittiruti, M., Biffi, R. Vascular access in oncology patients. *CA Cancer [J]. Clin.* 2008, 58: 323-346.
- [21] Tarpatzi, A., Avlami, A., Papaparaskevas, J., Daikos, G.L., Stefanou, I., Katsandri, A., Vasilakopoulou A, Chatzigeorgiou KS, Petrikkos GL. Incidence and risk factors for central vascular catheter-related bloodstream infections in a tertiary care hospital[J]. *New Microbiol.* 2012, 35(4):429-37.
- [22] 江丽萍, 何碧云, 朱倪琴. 消化内科患者中心静脉导管相关性感染的危险因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*. 2014, (13):3233-3234.
- [23] 宋瑰琦, 周彩萍. 中心静脉导管相关性感染因素分析与监护[J]. *中国临床保健杂志*. 2007, 10(3): 308-309.
- [24] Hajje, Z., Nasri, M., Sellami, W., Gharsallah, H., Labben, I., Ferjani, M. Incidence, risk factors and microbiology of central vascular catheter-related bloodstream infection in an intensive care unit [J]. *Infect Chemotherl.* 2014, 20(3):163-168.
- [25] 刘鲁沂, 孙艺铸, 赖总善. 中心静脉插管 39 例医院感染分析[J]. *中华医院感染学杂志*. 2000, 10(5):354-355.
- [26] 邹琳, 俞森洋. 导管相关感染的病原菌及相关危险因素[J]. *中华医院感染学杂志*. 2005, 15(4): 405-407.
- [27] 谌绍林, 姚珺, 刘丽娟, 缪爱凤. ICU 护士对《血管内导管相关感染预防指南(2011)》知识掌握情况调查[J]. *护理管理杂志*. 2014, (02):91-92.
- [28] 梨玉国. 肠外营养新途径——经外周静脉插入中心静脉导管[J]. *国外医学: 外科学分册*. 1999, 26(4):193-194.
- [29] 杨菊花, 韩艳, 张翠萍. 妇科肿瘤患者中心静脉导管血源性感染相关性危险因素分析[J]. *护理研究*. 2012, 26(31):2948-2950.
- [30] 刘凤梅, 蔡益民, 李玉莲, 刘小明, 张娟. 中心静脉导管相关感染的病原学及危险因素分析[J]. *当代护士*. 2013, (06): 15-17.
- [31] 谢先会, 刘茂英, 彭景, 等. ICU 患者不同途径置入中心静脉导管感染的对比研究[J]. *解放军护理杂志*. 2003, 10(7):10-11.
- [32] Arvaniti, K., Lathyris, D., Blot, S., Apostolidou-Kiouti, F., Koulenti, D., Haidich, A.B. Cumulative Evidence of Randomized Controlled and Observational Studies on

- Catheter-Related Infection Risk of Central Venous Catheter Insertion Site in ICU Patients: A Pairwise and Network Meta-Analysis[J]. *CritCareMed*. 2017, 45(4): e437-e448.
- [33] Hashimoto, Y., Fukuta, T., Maruyama, J., Omura, H., Tanaka, T. Risk factors for central venous catheter-related bloodstream infections after gastrointestinal surgery[J]. *Intern Med*. 2017, 56(4):3893-3933.
- [34] Peng, S., Lu, Y. Clinical epidemiology of central venous catheter-related bloodstream infections in an intensive care unit in China. [J]. *Crit Care*. 2013 28(3):277-83.
- [35] Vergara, T., Véliz, E., Fica, A. Exposition to total parenteral nutrition increases the risk of catheter-related bloodstream infection[J]. *Rev Chilena Infectol*. 2016, 33(6):603-608.
- [36] 钟华. 中心静脉插管引起感染的主要因素及控制措施[J]. *护理研究*. 2001, 15(6):317-318.
- [37] Dreesen, M., Foulon, V., Spriet, I. Epidemiology of catheter-related infections in adult patients receiving home parenteral nutrition: a systematic review[J]. *Clin Nutr*. 2013, 32(1):16-26.
- [38] 王莎莎, 尚积玉, 高尚, 杨淑香, 刘运喜, 杜明梅, 陈会波. ICU 中心静脉导管相关性感染的危险因素研究[J]. *中华医院感染学志*. 2014, (22):5546-5547+5553.
- [39] Perin, D.C., Erdmann, A.L., Higashi, G.D., Sasso, G.T. Evidence-based measures to prevent central line-associated bloodstream infections: a systematic review[J]. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2016, 24:2787-2794.
- [40] Craig, M. C. Effect of an education program on decreasing catheter-related bloodstream infections in the surgical intensive care unit[J]. *Crit Care Med*. 2002, 30(1):59-64.
- [41] Marsteller, J.A., Sexton, J.B., Hsu, Y.J., Hsiao, C.J., Holzmueller, C.G., Pronovost, P.J., Thompson, D.A. A multicenter, phased, cluster-randomized controlled trial to reduce central line-associated bloodstream infections in intensive care units[J]. *Crit Care Med*. 2012, 40(11): 2933-2939.
- [42] Cherifi, S., Gerard, M., Arias, S., Byl, B. A multicenter quasi-experimental study: impact of a central line infection control program using auditing and performance feedback in five Belgian intensive care units[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013, 2(1):1-7.
- [43] 李惠萍, 周美玲. 抗感染导管预防导管相关性血流感染效果的系统评价[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, (08):1072-1075.
- [44] Stocco, J.G, Hoers, H., Pott, F.S., Crozeta, K., Barbosa, D.A., Meier, M.J. Second-Generation central venous catheter in the prevention of bloodstream infection: a systematic review[J]. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2016, 24:2722-2730.
- [45] 季芬芬, 李丽芬. 康惠尔透明贴预防导管相关性血流感染的临床效果观察[J]. *护士进修杂志*. 2013, (12):1131-1132.
- [46] 任常洁, 孙晓燕, 林辉, 魏丽丽. 2%洗必泰对预防深静脉导管相关性血流感染的效果评价[J]. *护理实践与研究*. 2016, (06):140-141.
- [47] Girard, R., Comby, C., Jacques, D. Alcoholic povidone-iodine or chlorhexidine-based antiseptic for the prevention of central venous catheter-related infections: in-use comparison. [J]. *Infect Public Health*. 2012, 5(1):35-42.

- [48] Hina, H., McDowell, J. Minimising central line associated bloodstream infections' (CLABSIs) rate in inserting central venous catheters (CVCs) in the Adult Intensive Care Units (AICUs) [J]. *Journal of clinical nursing*.2017.
- [49] 徐春婷, 曾惠莉, 陈艳华. 洁悠神抗菌剂对中心静脉置管导管相关性感染高危因素分析及护理研究[J]. *中国医学工程*. 2015, (08):145-146.
- [50] Zhong, L., Wang, H.L., Xu, B., Yuan, Y., Wang, X., Zhang, Y.Y., Ji, L., Pan, Z.M., Hu, Z.S. Normal saline versus heparin for patency of central venous catheters in adult patients - a systematic review and meta-analysis[J]. *Crit Care*. 2017, 21(1):5-9.
- [51] Sanders, J., Pithie, A., Ganly, P. A prospective double-blind randomized trial comparing intraluminal ethanol with heparinized saline for the prevention of catheter-associated bloodstream infection in immunosuppressed haematology patients[J]. *Antimicrob Chemother*. 2008, 62(4):809-815.
- [52] Schilcher, G., Schlagenhauf, A., Schneditz, D. Ethanol causes protein precipitation — new safety issues for catheter locking techniques[J]. *PLoS One*. 2011, 8(12):848-859.
- [53] Mokha, J.S., Davidovics, Z.H., Samela, K., Emerck, K. Effects of ethanol lock therapy on central line infections and mechanical problems in children with intestinal failure[J]. *JPEN*. 2016, 8:55-59.
- [54] Kawano, T., Kaji, T., Onishi, S., Yamada, K., Yamada, W., Nakame, K., Mukai, M., Ieiri, S. Efficacy of ethanol locks to reduce the incidence of catheter-related bloodstream infections for home parenteral nutrition pediatric patients: comparison of therapeutic treatment with prophylactic treatment[J]. *Pediatr Surg Int*. 2016, 32(9):863-867.
- [55] Johansson, E., Hammarskjöld, F., Lundberg, D., et al. Advantages and disadvantages of peripherally inserted central venous catheters (PICC) compared to other central venous lines: A systematic review of the literature[J]. *Acta Oncol*, 2013, 52(5):886-892.
- [56] Chopra, V., O' Horo, J.C., Rogers, M.A., Maki, D.G., Safdar, N. The risk of bloodstream infection associated with peripherally inserted central catheters compared with central venous catheters in adults: a systematic review and meta-analysis[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013, 34:908-918.

## 综述二 导管相关性血流感染致病菌的毒力基因研究综述

中心静脉导管(CVC)具有留置时间长、安全性高、患者所受的痛苦较小、操作方便快捷等优点,用于输注药物、液体、营养素及血液制品等,在危重症病人救治中具有重要价值<sup>[1]</sup>。但导管使用同时,并发症也随之而来,特别是导管相关性血流感染(catheter-related bloodstream infection, CRBSI),导致住院时间延长、医药费用增加、住院患者的病死率增加,影响患者的预后和生命质量,给家庭及社会带来沉重的疾病负担<sup>[2-3]</sup>。因此,预防和控制导管相关性血流感染的发生已成为重要的研究课题。由于致病菌固有的耐药和获得性耐药,使许多抗菌药物治疗 CRBSI 时失败,因此,从基因水平研究致病菌引起的致病机制与治疗显得尤为重要。本文就近年来对 CRBSI 致病菌毒力基因的相关研究进行综述,旨在为更好的预防和控制导管相关性血流感染提供科学依据。

### 1 CRBSI 的概念及流行病学

#### 1.1 CRBSI 的概念

CRBSI 是指带有血管内导管或者拔除导管 48 小时内,患者出现菌血症、伴有发热寒颤或低血压等感染表现,除血管导管外没有其他明确的感染源的感染性疾病<sup>[4]</sup>。

#### 1.2 CRBSI 的流行病学

据美国疾病控制和感染中心(CDC)统计<sup>[4]</sup>,美国每年在重症监护病房和透析病房中发生 CRBSI 大约 72,000 例,这些感染导致死亡率为 12%,住院时间平均延长 7 天,增加的额外住院费用平均为 45,000 美元<sup>[5-6]</sup>。我国 CRBSI 的发生率约为 5%~15%,感染率约在 2.9 例次~11.3 例次/千导管日<sup>[7]</sup>。有研究显示国内某三甲医院 ICU 住院患者 CRBSI 发病率 11.0/千导管日<sup>[8]</sup>。导管相关性血流感染的致病常见病原体包括凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌以及念珠菌等,其中最常见的致病菌为凝固酶阴性的葡萄球菌<sup>[9-10]</sup>。

### 2 导管相关性血流感染致病菌的毒力基因

#### 2.1 肺炎克雷伯菌的毒力基因

肺炎克雷伯菌是一种容易引起社区及院内感染的革兰阴性杆菌,根据其黏性可分为经典肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP)及高黏性肺炎克雷伯菌(hypervirulent *K. pneumoniae*, HvKP)<sup>[11]</sup>。

##### 2.1.1 HvKP 的毒力因素

###### 2.1.1.1 HvKP 的血清型

荚膜作为某些细菌在细胞壁外包围的一层黏液性物质,一般由糖和多肽组成,是细菌的一种特殊结构。HvKP 包括荚膜多糖 (K 抗原) 和脂多糖 (O 抗原)。Liu 等对北京朝阳医院 2008~2012 年检测出的 HvKP 进行 PCR 及多位点基因分析<sup>[12]</sup>,发现 HvKP 荚膜分型中常见的是 K1、K2、K20 和 K57,并且 HvKP 阳性患者更易发生社区获得性感染,且多集中于 K1 及 K2 型。但是,并非所有的 HvKP 引起的社区获得性肝脓肿都是 K1 及 K2 型,在非社区性获得性肝脓肿的小鼠模型中也检测出 K1、K2 型,并且表现出较低的毒性<sup>[13]</sup>。Tan 等对 129 例分离出的 HvKP 的标本进行 PCR 测定,发现超过一半和肝脓肿有关的血清型不是 K1 及 K2 型。所以, HvKP 的毒力强弱并非仅仅是 K1、K2 荚膜血清型分型导致的,可能与其毒力基因有关<sup>[14]</sup>。

#### 2.1.1.2 HvKP 相关毒力基因

黏液表型调节基因 A (regulatory mucoid phenotype gene A, rmpA) 能调控荚膜合成,是调控形成黏液性菌落的胞外多糖合成过程的重要调控因子。有研究表明超过 40% 的非肝脓肿的菌株也会携带 rmpA 基因<sup>[15]</sup>,表明 rmpA 并不是单独发挥其作用,而是与其他因子共同影响 HvKP 在形成肝脓肿时的毒力作用。pLVPK 是肺炎克雷伯菌 CG43 携带的惟一质粒,是肺炎支原体毒力和携带菌株感染的决定因素。因此,该质粒的产生可能是 HvKP 毒力增强的重要原因之一。

黏液相关基因 A (mucoviscosity-associated geneA, magA) 是由 Fang 在肝脓肿患者体内发现<sup>[16]</sup>,携带 magA 基因的菌株具有黏性的胞外多糖网状结构,可以抵抗白细胞吞噬作用和血清补体系统杀菌作用,进而形成侵袭性感染。所以, magA 基因并非高黏特征的独立因素,可能会和其他基因共同发挥作用<sup>[17]</sup>。

#### 2.1.2 HvKP 的铁载体

铁作为生命活动中重要的微量元素,在细胞合成、细菌生长等过程中起重要作用。肺炎克雷伯菌不仅通过铁载体吸收宿主体内的铁来满足新陈代谢,而且会通过铁载体吸收的铁来增强毒力从而增加机体的感染。肠杆菌素、沙门菌素及耶尔森菌素都具有较强的铁亲和力,主要与血浆中的转铁蛋白结合,促进细菌生长及毒力增强。HvKP 产生的铁载体中的气杆菌素是增强 HvKP 毒力的主要物质。

### 2.2 鲍曼不动杆菌毒力基因

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, Ab) 是一种机会致病菌,大多数感染患者是在免疫力低下时接触定植于人体皮肤表面或医院环境中 Ab 而引起感染<sup>[18]</sup>。Ab 在导管相关血流感染中的分离率位于革兰氏阴性菌第二位,而且呈上升的趋势。随着感染率的增加和多种耐药 Ab 的出现,使 Ab 已成为 ICU 导管相关血流感染的重要病原菌,被称为 21 世纪的“MRSA”<sup>[19]</sup>。由于 Ab 复杂多变的耐药机制和协同作用,使其感染后治疗困难,这主要是由于毒力因子的产生,如生

物膜的形成<sup>[20]</sup>。生物膜参与细菌的感染过程,细菌在导管表面形成生物膜,有利于其生长。研究已证实生物膜受多种调控因素的影响,更容易受环境的影响而产生耐药<sup>[21]</sup>。来自世界各地的研究已证实 Ab 的感染与生物被膜形成、铁摄取系统、黏附、脂多糖、外膜蛋白等有关,一些新的毒力因子如青霉素结合蛋白 7/8、K1 荚膜多糖、磷脂酶 D、RecA 蛋白等也逐渐被认识<sup>[22]</sup>。国外有研究对医院感染的 13 株分离株的多位点序列分析(MLST)显示,有超过一种的 Ab 在该医院流行,而且发现了新的序列类型,这些新的序列类型病原体的发现提醒人们,对抗性细菌进行主动监测的重要性,以防止它们在医院环境中传播。由于 Ab 较容易受外界环境影响和这方面的研究较少,导管相关血流感染分离出的 Ab 致病机制和毒力因子的研究有待进一步进行。

### 2.3 铜绿假单胞菌毒力基因

有研究结果表明,引起导管相关性血流感染的病原菌之一是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)<sup>[23]</sup>。它广泛分布于自然界和正常人的皮肤、呼吸道、肠道等,属于条件致病菌。近年来,随着细菌分泌系统的发现,铜绿假单胞菌 III 型分泌系统(T3SS 或 TTSS)被普遍认为是 PA 的重要致病机制<sup>[24]</sup>,它主要分泌 4 种毒素 ExoS(胞外酶 S)、ExoT(胞外酶 T)、ExoY(胞外酶 Y)、ExoU(胞外酶 U),分别主要由 *exoS*、*exoT*、*exoY*、*exoU* 基因表达。

*exoU* 被称为细胞毒型基因,由它所表达的蛋白质 ExoU 是一种磷脂酶,可引起不可逆的细胞膜的损伤以及快速的细胞坏死,是 4 种毒素中最具破坏性的,危害最大。ExoY 是一种腺苷酸环化酶,存在于大多数 PA 中,但人们对其毒力作用知之甚少。*exoS* 为侵袭型基因,ExoS 和 ExoT 是紧密相关的双功能蛋白<sup>[25]</sup>,主要通过破坏宿主细胞肌动蛋白细胞骨架重排、干扰吞噬作用信号转导以及病灶粘附等作用来抑制其吞噬作用,从而抑制细胞分裂、引起细胞凋亡。其中 *exoS* 和 *exoU* 基因是 PA 的主要毒力基因,其编码分泌的 ExoS 和 ExoU 蛋白的临床意义尤其重要<sup>[25]</sup>。

但大量研究显示,在感染过程中并不是所有的 PA 都会同时产生这 4 种胞外酶,各种胞外酶在分离 PA 菌株中组合及各自所占比例都不一样。在大多数研究中,PA 的多重耐药菌和非多重耐药菌菌株中 *exoY*、*exoU*、*exoS* 3 种基因的携带率不同,但均带有 *exoT* 基因,大部分带有 *exoY* 基因,但多重耐药菌和非多重耐药菌 4 种毒力基因携带率差异无统计学意义。

PA 毒力基因常以 *exoS*+/*exoU*- (侵袭型)和 *exoU*+/*exoS*- (细胞毒型)形式存在,*exoU* 与 *exoS* 是一对互相抑制的基因,一般情况下不会同时出现<sup>[26]</sup>。但在吴爱武等的研究中发现 *exoU* 和 *exoS* 同时阳性的多重耐药铜绿假单胞菌<sup>[27]</sup>。在李昕等的研究中发现有少量 *exoU*- / *exoS*- 基因型菌株存在,可能与菌株长期暴露发生突

变有关<sup>[28]</sup>。

#### 2.4 表皮葡萄球菌毒力基因

为了充分提高患者导管相关性血流感染病原菌检测的便捷性与安全性,对于我国抗菌药物的研究做出贡献,CRBSI 正逐渐成为我国医院感染预防控制环节的重点工作内容<sup>[29]</sup>。在导管相关性血流感染中,主要的革兰阳性菌为表皮葡萄球菌<sup>[9]</sup>,表皮葡萄球菌作为机会致病菌 (opportunistic pathogen),普遍认为是生存在人体皮肤及粘膜的表面的正常菌群。表皮葡萄球菌由于其较弱的毒力作用而未引起人类重视,当患者由于免疫力低下、使用各种侵入性导管装置或接受放疗化疗导致机体免疫防御机制被抑制时,表皮葡萄球菌由定植状态转变为对人体有害的侵入状态,引起严重感染的发生<sup>[30]</sup>。通过查阅大量文献发现,患者表皮葡萄球菌在 2010-2014 年间所分离出的病原菌数量在比较排位靠前的 5 例细菌中均占首位<sup>[31]</sup>。近年来,随着广谱抗菌药物在临床上的滥用,表皮葡萄球菌所引起的感染越来越多见,表皮葡萄球菌导致的感染在院内感染中所占的比例也越来越大。出现了对不同抗菌药物耐的表皮葡萄球菌,而其中以耐 D 内酰胺类抗菌药物的表皮葡萄球菌最为多见,不仅在北美洲、欧洲、南美洲等多地均有报道,我国近年来的细菌监测网的数据也表示我国 MRSE 的检出率呈逐年上升趋势<sup>[32-35]</sup>。在临床实验中,临床分离株 *sesI* 阳性率明显高于定植株 *sesI* 的阳性率,提示 *sesI* 基因编码的 *sesI* 可能是表皮葡萄球菌致病的重要因子<sup>[30]</sup>。表皮葡萄球菌生物膜与临床感染间的关系,目前已明确生物膜初始附着阶段表皮菌膜多糖黏附素、自溶素的作用机制及聚集成熟阶段中 *icaA* 基因调控 PIA 合成的机制<sup>[36]</sup>。导管相关性感染属于一类比较严重的院内感染,而表皮葡萄球菌则是主要的致病菌,因此,在临床中应注意预防此类感染。

#### 2.5 金黄色葡萄球菌毒力基因

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是社区及院内感染的主要致病菌,常见的毒力因子有杀白细胞素 (PVL)、溶血素、肠毒素、黏附素、凝固酶、蛋白酶等<sup>[37-40]</sup>。

PVL 是一种导致白细胞溶解并引起组织坏死的膜成孔毒素,金黄色葡萄球菌所致重症皮肤和软组织感染、坏死性肺炎和筋膜炎均与 PVL 密切相关<sup>[41]</sup>。黏附素是金黄色葡萄球菌表达的一类特异性蛋白,能够识别机体的细胞外基质并与之发生特异性结合,介导金黄色葡萄球菌黏附于宿主细胞表面,促进细菌对宿主组织的入侵。黏附素分子中的凝集因子 (*clfA*、*clfB*) 及纤黏蛋白 (*fnbA*、*fnbB*) 被认为是金黄色葡萄球菌表明最主要的黏附因子<sup>[42]</sup>。金黄色葡萄球菌分泌的溶血素通过作用于红细胞、血小板及中性粒细胞,使其中的溶菌素释出,而破坏周围的组织。魏志恒等的研究中,金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素基因 *hla* 总检出率 95.21%,

$\beta$ -溶血素基因 *h1b* 的总检出率为 73.93%，其中 *h1b* 阳性率高于本研究结果 37.50%，而 *h1a* 的阳性率基本一致<sup>[43]</sup>。肠毒素是造成金黄色葡萄球菌急性胃肠炎的一种重要致病因子<sup>[44]</sup>，本研究中肠毒素基因 *sec* 和 *seh* 的携带率均低于 10.00%，与董俊等报道的 488 株金黄色葡萄球菌的 *sec*、*seh* 的检出率均为 5.9% 一致，推测肠毒素在腹泻相关的金黄色葡萄球菌中会有较高阳性率<sup>[45]</sup>。

## 2.6 大肠埃希菌毒力基因

研究表明，大肠埃希菌(*E.coli*)和肺炎克雷伯菌是导致血流感染的主要革兰阴性杆菌<sup>[46-47]</sup>。*E.coli* 是临床标本中最常见的分离细菌，是条件性致病菌，可引起机体肠道和肠道外感染。根据其致病性可将 *E.coli* 分为 3 个群：共生性大肠埃希菌，肠道致病性大肠埃希菌和肠外致病性大肠埃希菌（ExPEC）。肠道外致病性大肠埃希菌主要包括尿道致病性大肠埃希菌（UPEC）、新生儿脑膜炎大肠埃希菌（NMEC）、禽致病性大肠埃希菌（APEC）和败血性大肠埃希菌（SEPEC）等<sup>[48]</sup>，CRBSI 主要与 SEPEC 有关。有相关研究报道<sup>[49]</sup>，SEPEC 检出率  $\geq 20.0\%$  的毒力基因有 15 种，检出率最高的为 *papEF* (91.7%)、*iha* 和 *astA* (均为 87.5%)。龙辉等研究报道<sup>[50]</sup>，5 种主要毒力因子基因 *eaeA*、*bfpA*、*st*、*lt*、*stx1* 的在 EPEC 中的检出率分别为 45.38%、36.95%、11.24%、4.42%、2.41%。*eaeA* 和 *bfpA* 毒力因子有利于细菌粘附与侵袭，特别是粘膜上皮细胞<sup>[51]</sup>。因此此类毒力因子可能参与细菌侵袭进入机体，造成局部与循环系统感染。LEE 称为致病性肠细胞脱落位点毒力岛，发现于 EPEC 的染色体中。EPEC 在入侵机体后，首先会黏附在宿主细胞表面部位，之后对宿主组织造成严重病理损伤，且 *eaeA* 是 LEE 毒力岛中最重要的功能基因<sup>[52]</sup>。

大肠埃希菌是主要的产 ESBLs 革兰阴性杆菌，其最主要机制产生超广谱 *p*-内酰胺酶是大肠埃希菌耐药的。最初研究报道基因分型方面主要以 TEM 型和 SHV 型为主，后期开始检出 CTX-M 型<sup>[53]</sup>。最近研究报道，以 CTX-M-14、CTX-M-15 居多<sup>[54]</sup>。目前，CTX-M 型 ESBLs 致病机制仍不明确，考虑可能与 CTX-M 基因上游的 *ISEcp1B* 有关；导致细菌耐药也不是由某一种基因引起的，大部分产 CTX-M 型 ESBLs 株往往同时携带多种耐药基因，在这些基因共同作用下导致耐药<sup>[55]</sup>。

## 小结

CRBSI 不仅加重原发病，增加患者的死亡率，并且给社会以及医疗卫生资源带来沉重的负担，是急需解决的医源性难题。但是由于致病菌的耐药性，给 CRBSI 的治疗带来挑战。本文对 CRBSI 常见致病菌的毒力基因进行综述，从而为 CRBSI 的治疗提供依据以研究方向。

## 参考文献

- [1] 潘海燕, 任蔚虹. 导管相关性血流感染预防和控制的研究进展[J]. 中华护理杂志, 2009, 44(10):900-902.
- [2] Rupp, M. E., Majorant, D. Prevention of Vascular Catheter-Related Bloodstream Infections[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2016, 30(4):853-868.
- [3] 朱敏, 蔡源益, 曹晓红, 等. 导管相关血流感染的疾病负担研究进展[J]. 中国医院, 2016, 20(6):81-83.
- [4] Avery, L., Bennett, R., Brinsleyrainisch, K., et al. National and state healthcare-associated infections progress report[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2015, 101(101):3.
- [5] Zimlichman, E., Henderson, D., Tamir, O. et al. Health Care-Associated Infections: A Meta-analysis of Costs and Financial Impact on the US Health Care System[J]. Jama Internal Medicine, 2013, 173(22):2039-2046.
- [6] Umscheid, C.A., Mitchell, M.D., Doshi, J.A. et al. Health Care-Associated Infections: A Meta-analysis of Costs and Financial Impact on the US Health Care System[J]. Jama Internal Medicine, 2011, 32(2):101-104.
- [7] 方强. 血管内导管相关感染的预防与治疗指南(2007)[J]. 中国实用外科杂志, 2008, 47(6):597-605.
- [8] Peng, S., Lu, Y. Clinical epidemiology of central venous catheter-related bloodstream infections in an intensive care unit in China[J]. Journal of Critical Care, 2013, 28(3):277-283.
- [9] 赵玉杰, 茅奇峰, 李情操, 等. 导管相关性血流感染的病原菌检测及危险因素分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017(4):470-472.
- [10] 张长春, 贾晓君, 张淑敏, 等. 中心静脉导管相关性血流感染的病原菌分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015(12):2709-2711.
- [11] 吴翰欣, 丁家伟, 高凌, 温艳萍, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌的毒力机制研究进展[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(01):119-122.
- [12] Liu, Y. M., Li, B. B., Zhang, Y. Y., et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9):5379-5385.
- [13] Russo, T A, Shon A S, Beanan J M, et al. Hypervirulent *K.pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K.pneumoniae* thereby enhancing its virulence[J]. PLoS One, 2011, 6(10):e26734.
- [14] Tan T Y , Ong M , Cheng Y , et al. Hypermucoviscosity, rmpA, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2017.
- [19] Tang, H. L., Chiang, M. K., Liou, W. J., et al. Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK- derived loci and abscess formation[J]. Eur J Clin Micro-biol Infect Dis, 2010, 29(6):689-698.
- [20] Mortensen, B. L., Skaar, E. P. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection[J]. Cellular Microbiology, 2012, 14(9):1336-1344.

- [21] Donlan, R. M., Costerton, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(2):167.
- [22] Handal, R., Qunibi, L., Sahouri, I. et al. Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Palestine. [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017:8012104.
- [23] 李少增, 朱静, 王海滨. 导管相关性血流感染的病原菌分布及耐药分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(1):28-30.
- [24] 鞠晓红, 李瑶, 王月华, 等. 铜绿假单胞菌毒力基因 *exoS*、*exoU* 临床分布及耐药性研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(1):48-51.
- [25] 王宁, 左国营, 谢俊杰, 等. 铜绿假单胞菌 III 型分泌系统与致病毒力因子的研究进展[J]. *解放军药学学报*, 2015, 31(5):443-445.
- [26] 蒋月婷, 欧阳浩新, 吴爱武, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌毒力基因与耐药的相关性[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(5):604-607.
- [27] 吴爱武, 黄子然. 铜绿假单胞菌 *exoS*、*exoU* 基因的检测与分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(1):129-132.
- [28] 李昕, 刘周, 姚杰, 等. 合肥地区铜绿假单胞菌 III 型分泌系统毒力基因检测分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(2):251-254.
- [29] 王素华, 李立明, 李俊. 感染病原菌病原学分布及耐药性变迁[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 14(2): 269-270.
- [30] 丁宇. 表皮葡萄球菌耐药谱、毒力基因检测及分子流行病学研究[D]. 温州: 温州医科大学, 2016.
- [31] 王健, 王帅, 焦清海, 等. ICU 内中心静脉导管相关性血流感染病原菌分布及耐药性分析[J]. *四川解剖学杂志*, 2016, 24(2):32-34.
- [32] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测. *中国感染与化疗杂志*[J]. 2012, 12(5): 321-329.
- [33] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测. *中国感染与化疗杂志*[J]. 2013, 13(5): 321-330.
- [34] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测. *中国感染与化疗杂志*[J]. 2014, 14(5): 365-374.
- [35] Neidig, A., Yeung, A.T., Rosay, T., et al. *TypA* is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BMC Microbiol*, 2013; 13: 77.
- [36] 吴跃平, 王明明, 王红梅, 等. 儿科导管相关性感染中表皮葡萄球菌的生物膜形成检测[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(13): 2204-2206.
- [37] Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3):603-661.
- [38] Xia, J., Gao, J., Kokudo, N., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence[J]. *Biosci Trends*, 2013, 7(3):113-121.
- [39] Madzgalla, S., Syed, M.A., Khan, M.A. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in patients from Malakand, Pakistan[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(9):1541-1547.

- [40] Chuang, Y.Y., Huang, Y.C. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia[J]. *Lancet Infect Dis*, 2013,13(8):698-708.
- [41] 刘小丽, 王斌, 江元山, 等. 武汉地区门诊皮肤软组织感染患者中甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 P V L 基因携带及耐药性检测[J]. *中华皮肤科杂志*, 2016(3):172-175.
- [42] 谈华, 刘雪梅, 迟富丽, 等. 金黄色葡萄球菌婴幼儿分离株黏附毒素与细胞毒素编码基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015,(3):485-487.
- [43] 魏志恒, 于宏伟, 李宁, 等. 金黄色葡萄球菌溶血素基因分布的研究[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(6):152-156.
- [44] 常燕子, 裘雪丹, 崔裕山, 等. 社区与医院获得性感染金黄色葡萄球菌毒力因子对比分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015,25(7):920-923.
- [45] 童俊, 占志平. 金黄色葡萄球菌毒力基因检测及分子分型研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015(1): 46-50.
- [46] 韩福祿, 王文艳, 庞莉. 血培养常见病原菌分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22 (3) :630-631.
- [47] 肖永红, 沈萍, 魏泽庆, 等. Mohnarín 2011 年度全国细菌耐药监测[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22 (22) :4946-4952.
- [48] Russo, T. A., Johnson, J. R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(5):1753-1754.
- [49] 董敏. 血流感染和尿路感染的大肠埃希菌的分子流行病学研究[D]. 浙江大学, 2015.
- [50] 龙辉, 吴莎, 江振友. 血流感染大肠埃希菌的耐药性与聚类分析[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(7):909-913.
- [51] Houser, B. A., Donaldson, S. C., Padte, R. et al. Assessment of phenotypic and genotypic diversity of *Escherichia coli* shed by healthy lactating dairy cattle.[J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2008, 5(1):41-51.
- [52] 赫鸣睿. 大肠杆菌毒力因子及耐药机制研究进展[J]. *现代畜牧科技*, 2018(09):4-5.
- [53] Alagamy, M. H., Shibl, A. M., Hafez, M. M. et al. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Riyadh: Emergence of CTX-M-15-producing *E. coli* ST131[J]. *Annals of Clinical Microbiology & Antimicrobials*, 2014, 13 (1):1-7.
- [54] Canton, R., Gonzalezalba, J. M., Galan, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion[J]. *Front Microbiol*, 2012, 3(110): 110.
- [55] Zhao, W. H., Hu, Z.Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, 39(1):79.

### 综述三 脓毒性休克的相关研究进展

脓毒症 (Sepsis) 是急诊或者重症患者, 出现的一系列表现为病理及生理性的感染变化 (低血压或血乳酸升高), 也称为全身炎症反应综合征 (Systemic inflammatory response syndrome, SIRS) [1]。脓毒症的发生及发展很大程度上取决于由内源性糖皮质激素 (Endogenous Glucocorticoids, EG)。脓毒症可以自限而愈, 但当循环发生异常改变 (如血管内容量损耗、周围血管舒张、心肌抑郁及增加代谢等, 导致机体系统供氧和氧需之间发生不平衡, 进而导致机体组织缺氧或休克, 发展成为严重的脓毒症, 在此情况下即便给予患者足量补液复苏却仍旧无法纠正持续性低血压的发生, 及少尿或急性意识状态改变等症状的伴发, 或器官功能障碍, 称之为脓毒性休克<sup>[1-4]</sup>。SS 的诊断标准依据为: 另外的器官障碍标准可依据 Marshall 制定的标准, 胃肠系统功能障碍按照中国危重症医学会定制标准执行<sup>[5]</sup>。

SS 是机体对细菌性感染所做出的一种严重的系统性反应, 往往会引起患者多种并发症的发生, 如果不治疗或者治疗不及时则会导致患者死亡<sup>[6]</sup>。据研究报告, 在美国, 估计每年有 751000 例脓毒症或脓毒性休克患者 (每 1000 人 3.0 例), 由于美国老年人口的不断增加导致其发病率以每年 1.5% 的速度在不断增加, 到 2010 年和 2020 年估计有 934000 例和 1110000 例, 目前的这种疾病每年成本估计为 167 亿美元<sup>[7]</sup>。有研究指出, 有 59% 的脓毒症患者需要入住 ICU, 而 ICU 患者中有 10.4% 的患者是脓毒症患者<sup>[8]</sup>。在巴西 ICU 中, 脓毒症、严重脓毒症和 SS 的患者发病率分别为 61.4、35.6 和 30.0 人/1000 人/日, 病死率分别为 34.7%、47.3% 和 52.2%<sup>[9]</sup>。在德国, 一项对 3877 名患者的研究指出, 有 11% 的患者为严重脓毒症 (包括 ss), 严重脓毒症患者 ICU 和医院的死亡率分别是 55.2% 和 48.4%。SS 已成为成为中国重症监护室 (ICU) 患者的主要致死原因之一<sup>[10-12]</sup>。在美国, 重度脓毒症和 SS 每年会导致约 215000 人死亡<sup>[13]</sup>。

国际上关于 SS 的流行病学、危险因素及转归等的研究已有不少<sup>[14-17]</sup>。尤其是在过去的十余年中, 有关重度脓毒症和 SS 防治, 研究者们已经在临床中做了大量的研究调查并获得了积极的结果, 但是关于感染早期血流动力学研究依然存在着巨大的挑战空间<sup>[18]</sup>。即便如此, 在基础性和临床性研究都已经有了实质性进展的今天, 在发生了 SS 的患者中依然存在着很高的不良预后, 死亡率甚至可高达 50% 或以上<sup>[19]</sup>。对于 SS 的患者的有效救治, 抗生素的使用具有基础性和关键性的作用, 尤其是对感染所致的相关不良预后具有一定积极的延迟作用<sup>[20-21]</sup>。

近年来, 随着 ICU 救治技术及手段的不断提高与发展, 对于 SS 患者良好预后的研究关注度也在日益增加, 学者们从诊断学、病理学、生理学、等多个不同

角度进行了大量的研究<sup>[22-25]</sup>。早期的许多研究指出，基因多态性（Gene Polymorphisms）很有可能在脓毒性休克和脓毒症中起着关键作用<sup>[20,26-27]</sup>。不同的基因多态性被证明与重度脓毒症和脓毒性休克的发展有关联，比如肿瘤坏死因子基因，但是另外一些也有可能和脓毒性休克的死亡率上升有关联，比如 ADRB2 基因<sup>[20,21]</sup>。此外，一项不同的研究指出，推测 ACE I 等位基因携带者更易发展脓毒症<sup>[27]</sup>。

血管紧张素转化酶（Angiotensin I-converting enzyme, ACE）基因多态性与多种炎症疾病的易感性相关，如银屑病和红斑狼疮，此外，血管紧张素 II 通路（Antigtensin II Pathway）在 SS 中起着关键作用<sup>[28]</sup>。早前有研究指出，ACE 作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统中的一个中心酶，与 I/D 多态性一起在心血管疾病的发展中起着关键性的作用，同时在亚洲印度女性中，ACE I/D 基因多态性与妊娠期糖尿病之间有很大的相关性<sup>[29-32]</sup>。此外，缺少 I 型等位基因的 ACE 基因与提高 ACE 循环水平和降低高血压也存在关联：ACE 基因有可能在运动后会释放一氧化氮以及降低血压的作用。有研究表明，ACE 基因多态性的 rs4291 和 rs 4646994 与迟发性阿兹海默症<sup>[29]</sup>风险有关，ACE 单体型基因也与血浆中的 ACE 基因水平和 LOAD 的发生风险有关<sup>[33]</sup>除此之外，ACE 基因中的某些单核苷酸多态性与四周内增长的不良预后引发的脓毒性休克死亡有关<sup>[30]</sup>。

ACE 基因全长 21 kb，定位于 17 号染色体，有超过 160 多个变异位点，其中大部分是单核苷酸多态性<sup>[34]</sup>，单核苷酸多态性与疾病的紧密相关，它在个体的差异和在人口的基因变异中很重要，被认为是与先天免疫系统和脓毒症相关的蛋白质<sup>[35]</sup>，炎性基因中单核苷酸多态性促进细菌病原体影响蛋白质的生物功能，从而使得个体对各类疾病的发展，某些基因多态性与严重脓毒症死亡率增加或易感性之间存在一定相关性<sup>[36]</sup>。ACE 在炎症反应中扮演中重要的角色，作为一个外肽酶，对炎症反应的调节起关键作用，一些研究调查了 CD143 基因及其基因变异，个体之间的血清 CD143 活性存在着很大的差别，这些差异可能会影响先天免疫系统导致 CD143 活性上调，从而促进炎症过程<sup>[37]</sup>，那么由于个体间的基因变异，ACE 活性也可能改变严重感染的结果。发生严重脓毒症患者会出现广泛的内皮损伤，其中很多其他因素都可影响 ACE 的产生和表达及其释放入血。脓毒症时循环 ACE 活性下降，主要是因为低血压，因此 ACE 活性增高可能对脓毒症的患者有益的，尤其是低血压患者。脓毒症时 ACE 活性的降低可能与细菌脂多糖等介质使得内皮细胞损伤或 ACE 活性受到抑制也有关<sup>[38]</sup>；ACE I/D 多态性也可调节血清 ACE 的浓度，它负责血清酶水平变化的 50%<sup>[39]</sup>；已有报道种族差异在调节基因血清 CD143 水平和 ACE I/D 多态性的关系中发挥着重要作用，对于白人的儿童和成人，血清 ACE 活性与 ACE 基因 I/D 多态性相关，带有 D 等位

基因白人儿童的血清 ACE 活性水平比带 I 等位基因的高，但是黑人并不存在这种相关性<sup>[40]</sup>。不同民族 ACE I/D 基因型也存在着差异，在白人 and 非洲后裔人中 II, ID, DD 频率是相似的，但南亚裔 II 基因型频率的更高<sup>[41]</sup>。毋庸置疑，ACE 在保护宿主免受病原体侵染血压调节中起着非常关键的作用，因此 ACE 基因多态性可能在脓毒症的发展和结果方面扮演中重要的作用。

有研究发现携带了 I 等位基因 (D/I 基因型和 I/I 基因型) 与携带 D 等位基因的相比发生脓毒症的风险增加了两倍，在健康人群当中 DD 基因型在对抗脓毒症的发生中起着积极的作用<sup>[42-43]</sup>，但研究中显示 ACE 基因的多态性在 SS 组与非 SS 组之间、存活组与死亡组之间都不存在统计学差异；对体重极低儿，基因变异体会使其对脓毒症的易感性增强，这主要由免疫应答系统的不成熟引起的<sup>[44]</sup>，然而一些研究表明 ACE I/D 多态性对极低体重儿的脓毒症的发生或结局没有太大的影响<sup>[42]</sup>；同样，也有研究表明 ACE I/D 多态性和血清 ACE 的活性似乎对重症脓毒症患者的临床结果来说都不是非常重要的预后因素<sup>[45]</sup>，这可能是由于脓毒症发展与多种因素有关，尤其是机体的反应以及病原体的毒性。西班牙的一项研究<sup>[46]</sup>指出：ACE 插入/缺失基因型的等位基因频率在所有研究对象中的概率基因一致，ACE I/D 多态性与严重脓毒症的结局、ICU 病死率都无相关性，且严重脓毒症的 28 天死亡率在 ACE 基因型之间并没有显著差异，由于作者只研究了一个 (非功能性)ACE 基因的多态性，因此并不能排除在肾素-血管紧张素系统中这种基因的其他变异或者单倍体或其他基因与它们的关系。但是两项 meta 分析都认为 ACE I/D 多态性与脓毒症的风险有明显联系，但后者发现 ACE I/D 多态性与脓毒症的死亡率无关<sup>[47-48]</sup>，前者研究发现 ACE I/D 多态性与小儿脓毒症风险相关性明显，对成人脓毒症反而没有太多相关性；有研究还发现 ACE 基因型为只 I/D 或 I/I 或者 I/D 基因型同时存在时的患者，与基因型为 D/D 的相比其脓毒症感染风险将提高 33%，这与 Hou X 等的发现基本一致，它们研究发现 DD 基因型能降低脓毒症的发生概率或减缓其发生过程，在总体人口和儿童人群中携带 DD 基因型患者相较于 II/ID 携带者脓毒症风险下降 25%。但是两项研究都只限于白种人群，种族之间的差异没有体现，且纳入的文章较少，因此期待更多好的更大样本量和多种族的研究来证明两者相关性。

对 ACE 基因而言，D 等位基因的存在与 ARDS 的严重脓毒症环比概率明显相关，因此通过抑制 ACE 的治疗方法可能会降低脓毒症发生的概率，但是研究发现 DD 基因型携带者相对降低脓毒症发生风险，那么血管紧张素转换酶抑制剂对脓症患者可能是有害的<sup>[47-49]</sup>；有研究表明血管紧张素转换酶抑制剂会影响急性肾损伤的脓毒症患者的预后，由于血管紧张素转换酶抑制剂能够减小肾小球囊内压力，这种作用机制对脓毒症和脓毒性休克可能是危险的，在这种情况下，肾

血流量就会下降，然后导致肾小球滤过率和肾小球囊内压力降低<sup>[50]</sup>，但是一些研究也指出，ACE I/D 基因多态性与改变血管紧张素转换酶抑制剂的效果有关联，而 ACE 血管紧张素转化酶抑制剂会抑制重度脓毒症患者的器官衰竭<sup>[49,51]</sup>，且经 ACE 血管紧张素转化酶抑制剂治疗后的患者会在短期和长期内降低死亡率<sup>[52]</sup>。

脓毒症病理与多种因素有关，尤其是机体的反应以及病原体的毒性，还包括脓毒症的严重程度、并发症和治疗病原体与多态性之间在炎症和抗炎反应中的交互作用决定了脓毒症发展的结果，而 ACE 在炎性反应中扮演中重要的角色，且个体间的血清 CD143 活性存在着很大的差别，ACE 活性可能改变严重感染的结果，那么从遗传学角度来看，ACE 基因多态性对脓毒症的发生概率存在潜在影响。期待更多、更好、更大样本量和多种族的研究来证明 ACE 基因多态性与脓毒症或脓毒性休克之间相关性研究。

## 参考文献

- [1] Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. *Chest*. 1992, 101:1644-1655.
- [2] Chvojka, J., Matejovic, M. International guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2012 - comment[J]. *Vnitr Lek*. 2012, 60:59-67.
- [3] Rangel-Frausto, M.S., Pittet, D., Costigan, M., Hwang, T., Davis, C.S., Wenzel, R.P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study[J]. *JAMA*. 1995, 273:117-123.
- [4] Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J]. *Intensive Care Med*. 2003, 29(4):530-538.
- [5] 王今达, 王宝恩. 多脏器功能失常综合症 (MODS) 病情分期诊断及严重程度评分标准[J]. *中国危重病急救医学*. 1995, 7(6):346-347.
- [6] Yamamoto, Y., Harashima, A., Saito, H., Tsuneyama, K., Munesue, S., Motoyoshi, S., Han, D., Watanabe, T., Asano, M., Takasawa, S. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(5):3248-3257.
- [7] Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. *Crit Care Med*. 2001, 29:1303-1310.
- [8] Sands, K.E., Bates, D.W., Lanken, P.N. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers[J]. *JAMA*. 1997, 278:234-240.
- [9] Silva, E., Pedro, M.A., Sogayar, A.C. Brazilian sepsis epidemiological study(BASES study)[J]. *Crit Care*. 2004,8(4):251-260.
- [10] Kaukonen, K.M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D., Bellomo, R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012[J]. *JAMA*. 2014, 311:1308-1316.
- [11] Martin, G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 10(6):701-706.
- [12] Zhou, J., Qian, C., Zhao, M., Yu, X., Kang, Y., Ma, X., Ai, Y., Xu, Y., Liu, D., An, Y. Epidemiology and outcome of severe sepsis and septic shock in intensive care units in mainland China[J]. *PLoS One*. 2012, 9:1071-1081.
- [13] Tirado-Sanchez, A., Vazquez-Gonzalez, D., Ponce-Olivera, R.M., Montes de Oca-Sanchez, G. Serum lactate is a useful predictor of death in severe sepsis in patients with pemphigus vulgaris[J]. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2012, 21:7-9.
- [14] Cheng, B., Xie, G., Yao, S., et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospital in China [J]. *Crit Care Med*. 2007, 35(11):538-2546.
- [15] Harrison, D.A., Welch, C.A., Eddleston, J.M. The Epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database[J]. *Crit Care*. 2006, 10(2):R42.
- [16] Adrie, C., Alberti, C., Chai, X., Couturier, C. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community,

- hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost[J]. *J Crit Care*. 2005, 20(1):46-58.
- [17] Khwannimit, B., Bhurayanontachai, R. The epidemiology of, and risk factors for, mortality from severe sepsis and septic shock in a tertiary-care university hospital setting [J]. *Epidemiol Infect*. 2009, 137(9):1333-1334.
- [18] Coba, V., Whitmill, M., Mooney, R., Horst, H.M., Brandt, M.M., Digiovine, B., Mlynarek, M., McLellan, B., Boleski, G., Yang, J. et al. Resuscitation bundle compliance in severe sepsis and septic shock: improves survival, is better late than never[J]. *J Intensive Care Med*, 2011, 26:304-313.
- [19] Huet, O., Chin-Dusting, J.P. Septic shock: desperately seeking treatment[J]. *Clin Sci (Lond)*. 2014, 126:31-39.
- [20] Boussekey, N., Cantrel, J., Dorchin Debrabant, L., Langlois, J., Devos, P., Meybeck, A., Chiche, A., Georges, H., Leroy, O. Epidemiology, prognosis, and evolution of management of septic shock in a French intensive care unit: a five years survey[J]. *Crit Care Res Pract*, 2010, 2010(6):436-427.
- [21] Kumar, A., Safdar, N., Kethireddy, S., Chateau, D.A. Survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study[J]. *Crit Care Med*. 2010, 38:1651-1664.
- [22] Conti-Patara, A., de Araujo Caldeira, J., de Mattos-Junior, E., de Carvalho, H.S., Reinoldes, A., Pedron, B.G., Patara, M., Francisco, T., Faustino, M., de Oliveira, C.M., et al. Changes in tissue perfusion parameters in dogs with severe sepsis/septic shock in response to goal-directed hemodynamic optimization at admission to ICU and the relation to outcome[J]. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2012, 22:409-418.
- [23] Galbois, A., Aegerter, P., Martel-Samb, P., Housset, C., Thabut, D., Offenstadt, G., Ait-Oufella, H., Maury, E., Guidet, B., Reanimation, G. Improved prognosis of septic shock in patients with cirrhosis: a multicenter study[J]. *Crit Care Med*. 2014, 42:1666-1675
- [24] Kimmoun, A., Ducrocq, N., Mory, S., Delfosse, R., Muller, L., Perez, P., Fay, R., Levy, B., Cardiac contractile reserve parameters are related to prognosis in septic shock[J]. *Biomed Res Int*. 2013, 2013(5):966-973.
- [25] Xu, Q., Yan, J., Cai, G., Chen, J., Li, L., Hu, C. Effect of two volume responsiveness evaluation methods on fluid resuscitation and prognosis in septic shock patients[J]. *Chin Med J (Engl)*. 127:483-487.
- [26] Wang, X.T., Yao, B., Liu, D.W., Zhang, H.M. Central Venous Pressure Dropped Early is Associated with Organ Function and Prognosis in Septic Shock Patients: A Retrospective Observational Study[J]. *Shock*, 2015, 44:426-430.
- [27] Zapata-Tarres, M., Arredondo-Garcia, J.L., Rivera-Luna, R., Klunder-Klunder, M., Mancilla-Ramirez, J., Sanchez-Urbina, R., Vazquez-Cruz, M.Y., Juarez-Villegas, L.E., Palomo-Colli, M.A. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism increases susceptibility to septic shock in children with acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Infect Dis*. 2013, 32:136-139.

- [28] Kothari, N., Bogra, J., Abbas, H., Kohli, M., Malik, A., Kothari, D., Srivastava, S., Singh, P.K. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock[J]. *Cytokine*. 2013, 61:676-681.
- [29] Aggarwal, P., Agarwal, N., Das, N., Dalal, K., Association of polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene with gestational diabetes mellitus in Indian women[J]. *Int J Appl Basic Med Res*. 2016, 6:31-37.
- [30] Hannula-Jouppi, K., Massinen, S., Siljander, T., Makela, S., Kivinen, K., Leinonen, R., Jiao, H., Aitos, P., Karppelin, M., Vuopio, J. Genetic susceptibility to non-necrotizing erysipelas/cellulitis[J]. *PLoS One*. 2013,8:56225-56230.
- [31] Nakada, T.A., Russell, J.A., Boyd, J.H., Aguirre-Hernandez, R., Thain, K.R., Thair, S.A., Nakada, E., McConechy, M., Walley, K.R. beta2-Adrenergic receptor gene polymorphism is associated with mortality in septic shock[J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, 181:143-149.
- [32] Yakut, T., Karkucak, M., Ursavas, A., Gulden, T., Burgazlioglu, B., Gorukmez, O., Karadag, M. Lack of association of ACE gene I/D polymorphism with obstructive sleep apnea syndrome in Turkish patients[J]. *Genet Mol Res*. 2010, 9:734-738.
- [33] Belbin, O., Brown, K., Shi, H., Medway, C., Abraham, R., Passmore, P., Mann, D., Smith, A.D., Holmes, C., McGuinness, B.A. Multi-center study of ACE and the risk of late-onset Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*. 2011, 24:587-597.
- [34] Sayed-Tabatabaei, F.A., Oostra, B.A., Isaacs, A. ACE polymorphism[J]. *Circ Res* 2006, 98: 1123-1133.
- [35] Dahmer, M.K., Randolph, A., Vitali, S., Quasney, M.W. Genetic polymorphisms in sepsis[J]. *Pediatr. Crit. Care Med*. 2005, 6: S61-73.
- [36] Lin, M.T., Albertson, T.E. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med*. 2004, 32(2):569-79.
- [37] Rice, C.L., Kohler, J.P., Casey, L., Szidon, J.P., Daise, M., Moss, G.S. Angiotensin-converting enzyme (ACE) in sepsis[J]. *Circ Shock*. 1983, 11(1):59-63.
- [38] Watanabe, K., Lam, G., Keresztes, R.S., Jaffe, E.A., Lipopolysaccharides decrease angiotensin converting enzyme activity expressed by cultured human endothelial cells[J]. *J Cell Physiol*. 1992, 150 (2):433-439.
- [39] Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels[J]. *J Clin Invest*. 1990, 86:1343-1346.
- [40] Bloem, L.J., Manatunga, A.K., Pratt, J.H. Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity[J]. *Hypertension*. 1996, 27(1):62-66.
- [41] Sagnella, G.A., Rothwell, M.J., Onipinla, A.K., Wicks, P.D., Cook, D.G., Cappuccio, F.P. A population study of ethnic variations in the angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism: Relationships with gender, hypertension and impaired glucose metabolism[J]. *J. Hypertens*. 1999, 17:657-664.

- [42] Cogulu, O., Onay, H., Uzunkaya, D., Gunduz, C., Pehlivan, S., Vardar, F., Atlıhan, F., Ozkinay, C., Ozkinay, F. Role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in children with sepsis and septic shock[J]. *Pediatr Int.* 2008, 50(4):477-80.
- [43] Härtel, C., Schultz, C., Herting, E., Göpel, W. Genetic association studies in VLBW infants exemplifying susceptibility to sepsis--recent findings and implications for future research[J]. *Acta Paediatr.* 2007, 96(2):158-165.
- [44] John, B.R., Loggins, J., Yanamandra, K. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism does not alter sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants[J]. *J. Perinatol.* 2005, 25:205-209.
- [45] Tsantes, A., Tsangaris, I., Kopterides, P., Nikolopoulos, G., Kalamara, E., Antonakos, G., Kapsimali, V., Gialeraki, A., Dimopoulou, I., Orfanos, S., Dima, K., Travlou, A., Armaganidis, A. Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism and circulating ACE levels are not associated with outcome in critically ill septic patients[J]. *Clin Chem Lab Med.* 2011, 50(2):293-299.
- [46] Villar, J., Flores, C., Pérez-Méndez, L., Maca-Meyer, N., Espinosa, E., Blanco, J., Sangüesa, R., Muriel, A., Tejera, P., Muros, M., Slutsky, A.S. GRECIA group, GEN-SEP group. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome[J]. *Intensive Care Med.* 2008, 34(3):488-495.
- [47] Hou, X., Zhang, P., Nie, W., Tang, S., Wang, J., Zhang, Q., Wan, Z., Zhang, B., Song, B. Association between angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and sepsis: A meta-analysis[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015, 16(2):415-421.
- [48] Yang, H., Wang, Y., Liu, L., Hu, Q. Increased susceptibility of sepsis associated with CD143 deletion/insertion polymorphism in Caucasians: a meta analysis[J]. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014, 15(10):6551-6558.
- [49] Urhan, K.M., Sucu, N., Sahan, F.S., Aytacoglu, B.N., Vezir, O., Bozali, C., Canacankatan, N., Kul, S., Tunctan, B. Role of ACE I/D gene polymorphisms on the effect of ramipril in inflammatory response and myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass grafts[J]. *Eur J Clin Pharmacol.* 70:1443-1451.
- [50] Suh, S.H., Kim, C.S., Choi, J.S., Bae, E.H., Ma, S.K., Kim, S.W. Acute kidney injury in patients with sepsis and septic shock: risk factors and clinical outcomes[J]. *Yonsei Med J.* 2013, 54(4):965-72.
- [51] Doerschug, K.C., Delsing, A.S., Schmidt, G.A., Ashare, A. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis[J]. *Crit Care.* 2010, 14:243-248.
- [52] Schmidt, H., Hoyer, D., Rauchhaus, M., Prondzinsky, R., Hennen, R., Schlitt, A., Carter, J., Hottenrott, K., Müller-Werdan, U., Werdan, K. et al. ACE-inhibitor therapy and survival among patients with multiorgan dysfunction syndrome(MODS) of cardiac and non-cardiac origin[J]. *Int J Cardiol.* 2010, 140:296-303

## 附 录

附表 1. APACHE-II 评分系统表

生理学变量	高异常范围				低异常范围	
	分 值					
	4	3	2	1	0	
体温-直肠温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\geq 41$	39~40.9	—	38.5~38.9	>35.9	
	$\leq 29.9$	30~31.9	32~33.9	34~35.9	—	
平均动脉压 (mmHg)	$\geq 160$	130~159	110~129	—	70~109	
	$\leq 49$	—	50~69	—	—	
心率 (次/分)	$\geq 180$	140~179	110~139	—	70~109	
	$\leq 39$	40~54	55~69	—	—	
呼吸频率 (次/分)	$\geq 50$	35~49	—	25~34	12~24	
	$\leq 5$	—	6~9	10~11	—	
氧合作用	当 $\text{FiO}_2 < 0.5$ 时用 $\text{PaO}_2$ ; $\text{FiO}_2 \geq 0.5$ 时用肺泡-动脉氧分压差【(A-a) $\text{DO}_2$ 】					
$\text{PaO}_2$ (mmHg)	<55	55~60	—	61~70	>70	
$\text{DaO}_2$ (mmHg)	>500	400~500	200~400	—	<200	
血液酸碱度	血液酸碱度以动脉血 PH 值为好, 无血气分析则用静脉血 $\text{HCO}_3^-$ 代替					
动脉血 PH	$\geq 7.7$	7.6~7.69	—	7.5~7.59	7.33~7.49	
	$\leq 7.14$	7.15~7.24	7.25~7.32	—	—	
或 $\text{HCO}_3^-$ (mmol/l)	$\geq 52$	41~51.9	—	32~40.9	22~31.9	
	<15	15~17.9	18~21.9	—	—	
血 $\text{Na}^+$ (mmol/l)	$\geq 180$	160~179	155~159	150~154	130~149	
	$\leq 110$	111~119	120~129	—	—	
血 $\text{K}^+$ (mmol/l)	$\geq 7.0$	6~6.9	—	5.5~5.9	3.5~5.4	
	<2.5	—	2.5~2.9	3~3.4	—	
Cr (急性肾衰时 加倍) (mol/l)	$\geq 309$	176~308	124~175	—	53~123	
	—	—	—	53	—	
红细胞压积 (%)	$\geq 60$	—	50~59.9	46~49.9	30~45.9	
	<20	—	20~29.9	—	—	
白细胞计数 ( $\times 10^9$ )	$\geq 40$	—	20~39.9	15~19.9	3~14.9	
	<1.0	—	1.0~2.9	—	—	

Glasgow 昏迷评分	等于 15 减去实际 GCS 分值		
慢性健康状况评分 ( (CPS)			
评分法：凡下列器官或系统功能严重障碍或衰竭的慢性病，如行急诊手术或未手术者加 5 分，择期手术者加 2 分			得分
心血管系统	休息或轻微活动时出现心绞痛或心功能不全的表现，如：心悸、气急、水肿、肝大、肺部啰音等或符合美国纽约心脏协会制定的心功能 4 级标准。		
呼吸系统	慢性限制性、阻塞性或血管性肺部疾病所致病人活动严重受限，不能上楼或作家务或有慢性缺氧、高碳酸血症、继发性红细胞增多症、严重肺动脉高压 (mmHg) 或需呼吸机支持。		
肝脏	经活检确诊肝硬化伴门脉高压，以往有门脉高压致上消化道出血、肝功能衰竭、肝性脑病或肝昏迷史。		
肾脏	接受长期透析治疗。		
免疫功能障碍	接受免疫抑制剂、化疗、放疗、长期激素治疗，或近期使用大量激素，或患白血病、淋巴瘤或 AIDS 等抗感染能力低下者。		

附表 2. Sequential Organ Failure Assessment(SOFA 评分)

系统	监测项目	0	1	2	3	4	得分
呼吸	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (Kpa)	>53.33	40- 53.33	26.67-4 0	13.33-2 6.67	<13.33	
	呼吸支持 (是/否)				是	是	
凝血	血小板 (10 <sup>9</sup> /L)	>150	101- 150	51-100	21-50	<21	
肝	胆红素 (umol/L)	<20	20-32	33-101	102- 204	>204	
循环	平均动脉压 (mmHg)	≥70	<70				
	多巴胺剂量 (ug/kg/min)			≤5 或	>5 或	>15 或	
	肾上腺素剂量 (ug/kg/min)				≤0.1 或	>0.1 或	
	去甲肾腺剂量 (ug/kg/min)				≤0.1	>0.1	
	Dobutamine (是/否)			是			
神经	GCS 评分	15	13-14	10-12	6-9	<6	
肾脏	肌酐 (umol/L)	<110	110- 170	171- 299	300- 440	>440	
	24 小时尿量 (ml/24h)				201- 500	<200	

## 在学期间的获奖和研究成果

### 一、发表文章

1. Xin-Man Dou, Hui-Juan Cheng, Ling Meng, Lin-Lin Zhou, Yi-Hong Ke, Li-Ping Liu and Yu-Min Li. Correlations between ACE single nucleotide polymorphisms and prognosis of patients with septic shock[J]. Bioscience Reports. 2017,37.145
2. 豆欣蔓,南锐伶,马佩芬,李玉民\*.脓毒性休克相关 ACE 基因 SNPs 位点的研究[J].基因组学与应用生物学.拟 2019 年 1 月见刊.
3. 豆欣蔓,南锐伶,马佩芬,李玉民\*.西北某三甲医院 CVC 置管者 CRBSI 影响因素与临床防治策略的研究[J].中华医院感染学杂志,拟于 2019 年 3 月见刊.
4. 豆欣蔓,南锐伶,马佩芬,李玉民\*.西北某三甲医院 CVC 置管者 CRBSI 细菌生物学特性研究[J].中国急救医学.拟于 2019 年 5 月见刊.
5. Influencing factors and prevention strategies of CRBSI in patients with CVC[J]Journal of advanced Nursing.拟于 2019 年 7 月见刊.
6. 王兴蕾,韩春彦,赵存,豆欣蔓\*.全程康复护理模式在脑卒中患者的应用效果研究[J],中华急诊医学志,2018,27(5).
7. 贺莉,毛仁丹及,豆欣蔓\*.糖尿病组患者延续性护理的研究现状及决策[J].中国急救医学杂志.2018.7(5).
8. 张亚敏,豆欣蔓\*.综合护理干预减轻血栓闭塞性脉管炎患者疼痛的效果观察[J].基因组学与应用生物学.2018.8(10).
9. 韩春彦,王兴蕾,赵存,豆欣蔓\*.Fess 协议改善脑卒中患者预后效果的研究进展[J].护理学杂志 2018.9(11).
10. 韩春彦,王兴蕾,赵存,豆欣蔓\*.卒中相关肺炎集束化护理的 Meta 分析[J].护理学杂志 2018.9(1).
11. 秦枫,豆欣蔓\*.经皮旋转扩张气管切开术在 ICU 临床应用的系统评价[J],中华危重病急救医学,2015,12(5):176-188.

### 二、撰写专著

1. 《新编儿科实用护理习题集》,甘肃科技出版社,2014, 主编。
2. 《儿科护理学》,人民卫生出版社, 2016, 编委。
3. 《外科护理学分册》,人民卫生出版社, 2016, 编委。
4. 《常见慢性病健康管理》, 主编, 1402 千字, 西安交通大学出版社, 书号 ISBN 978-7-5605-9686-0。

### 三、科研项目

1. 棒棒糖对小儿腹部手术后胃肠功能影响的研究/甘肃省护理学会/GSHLKY-2014-09; 3/12。
2. 基于家庭护理的慢性病患者延续性护理管理模式的实践与研究/兰州市科技局/2016-CGKJ104; 1/10。
3. 脑瘫患儿全程康复管理互联网+新模式的研究/甘肃省卫生行业计划项目/GSWSKY2017-62; 2/10。

4. 国际实践指南在甘肃省护理临床实践中的应用研究/2018 年陇原青年创新创业人才（团队）项目；1/10。

#### 四、相关发明专利

1. 深静脉置管回抽装置.ZL-2016-2-105341.7.
2. 深静脉置管护理包.ZL-2016-2-0968755.5.
- 3.一种脑卒中患者恢复行走功能锻炼器.ZL-2018-2-1829364.0
- 4.一种脑卒中患者训练坐起站立装置.ZL-2018-2-1829363.6

## 致 谢

时光匆匆如白驹过隙，回首四年学业历程，太多辛苦与幸福并存，太多泪水与快乐交织，深入灵魂最深处的依旧是深深的感激与感恩！

首先，感谢我的导师李玉民教授，是您教会了我做人须正直无私、谦虚谨慎；做事要勤勉踏实、一丝不苟；遇困难要坚定目标、不言放弃。导师博大如海的胸怀，严谨求实的学风，实事求是的态度，勤奋踏实的精神，令人敬仰！学生唯有铭记您的教诲，继续不懈努力，方能以寸草之心馈浩然师恩！

感谢刘光琇教授、王爱勤教授，在我学习研究过程中给予的莫大支持与帮助。两位教授于我而言，在学术上是良师，时时关心着我的学业进展，给予我指引和点拨；在生活中如父兄，在我困顿失意、踌躇不前时，给予我安慰与鼓励！

感谢兰州大学第二医院焦作义教授、陈昊教授、检验中心孟灵主任、潘云燕主任、信息中心郝群主任，在我课题的研究过程中给予了的大力支持和帮助！

感谢甘肃省消化系肿瘤重点实验室赵阳博士、何雯婷博士、朱宏文博士以及各位老师、师兄师姐姐妹们在课题中给予我的支持与帮助！

感谢我的丈夫、女儿及家人给予我学业的理解与支持！

一路走来，相逢太多感谢的人、太多感激的事，无法一一言表！唯有感恩！感恩我的良师，指引我正确的人生之路，让我无惧前路艰辛，勇往直前；感恩我的益友，让我学习工作有良伴，快乐前行；感恩我的亲人，始终温暖照顾，伴我左右！

对所有给予我帮助与支持的亲爱的人们，我唯以最真挚的感情、最朴实话语，致以最崇高的敬意！