

叶先飞, 陈丽, 王若南, 等. 经肠道播散诱导内源性感染小鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(3): 291 - 297.

Ye XF, Chen L, Wang RN, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of endogenous infection induced by intestinal dissemination [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3): 291 - 297.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.004

经肠道播散诱导内源性感染小鼠模型的建立及评价

叶先飞, 陈丽, 王若南, 葛超荣, 陈瑜*

(浙江省临床体外诊断技术研究重点实验室, 浙江大学医学院附属第一医院检验科, 杭州 310003)

【摘要】 目的 建立经肠道播散诱导发生内源性感染的小鼠模型, 为研究肠道微生态与内源性感染的相关机制提供可靠的实验模型。**方法** 24只ICR雌性小鼠随机分为模型组A、模型组B和对照组C。模型组A给予广谱抗生素溶液口服破坏肠道正常菌群后尾静脉注射5-氟尿嘧啶(5-FU)进行免疫抑制。在模型组A的基础上给予白假丝酵母菌灌胃引入机会性致病菌即为模型组B。对照组C同等方法给予生理盐水处理。实验过程中持续观察小鼠粪便菌群变化, 平板计数法检测小鼠组织载菌量, HE染色观察小鼠肺、肝、盲肠和大肠组织病理变化, 荧光定量PCR法观察小鼠肠道主要菌群定量变化。**结果** 实验终点时模型组A小鼠组织器官均出现细菌感染, 模型组B小鼠表现为细菌和真菌混合感染。两模型组小鼠肺和肝脏组织器官均表现为典型的炎症表现, 而盲肠和大肠表现为黏膜炎症和屏障完整性被破坏。肠道菌群定量结果显示两模型组肠道主要菌群结构发生紊乱, 肠道定植抗力下降, B/E值 <1 。**结论** 在小鼠肠道菌群紊乱和免疫抑制的条件下, 肠道致病菌或机会致病菌突破肠道黏膜屏障引起组织器官感染, 该模型能够为从肠道微生态方面预防及控制内源性感染的研究提供可靠的模型基础。

【关键词】 内源性感染; 动物模型; 抗生素; 肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 03-0291-07

Establishment and evaluation of a mouse model of endogenous infection induced by intestinal dissemination

YE Xianfei, CHEN Li, WANG Ruonan, GE Chaorong, CHEN Yu*

(Key Laboratory of Clinical In Vitro Diagnostic Techniques of Zhejiang Province, Hangzhou 310003, China; the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003)

Corresponding author: CHEN Yu. E-mail: chenyuzy@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of endogenous infection induced by intestinal dissemination and provide a reliable experimental model for studies of the mechanism of intestinal microecology and endogenous infection.

Methods Twenty-four female ICR mice were randomly divided into model group A, model group B, and control group C. The mice in group A were administered a broad spectrum antibiotic solution orally to disturb the balance of normal intestinal flora, and then 5-fluorouracil was injected into the tail vein for immunosuppression. The mice in group B were administered with *Candida albicans* by gavage after the same treatment as the group A. The control group C was administered with normal saline by the same method. Changes of fecal flora in the mice were continuously observed during the experiment. The amount of bacteria in mouse tissues was detected by the plate counting method. Pathological changes of the lung, liver, cecum, and large intestine were observed using HE staining. Quantitative changes of intestinal flora in the mice were

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531400和2013CB531605)。

Funded by National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (2013CB531400&2013CB531605).

【作者简介】 叶先飞(1990—)男, 硕士, 研究方向: 微生物学。Email: yexianfei888@163.com

【通信作者】 陈瑜(1968—)男, 博士, 教授。Email: chenyuzy@zju.edu.cn

observed by quantitative PCR. **Results** At the end of the experiment, bacterial infection occurred in the tissues and organs of the mice in group A, and mixed bacterial and fungal infections occurred in the group B. Lung and liver histology of the mice in both infection groups showed typical inflammatory manifestations, while the cecum and large intestine showed mucosal inflammation and disrupted barrier integrity. Quantitation of intestinal flora showed disruption of the main intestinal flora structure in the two model groups, and the ratio of the intestinal colonization resistance index was less than 1. **Conclusions** Under the conditions of intestinal flora disturbance and immune suppression, intestinal pathogenic bacteria or opportunistic pathogenic bacteria break through the intestinal mucosa barrier and cause tissue and organ infection in mice. This model can provide a reliable basis for the studies on prevention and control of endogenous infection from the perspective of intestinal microecology.

【Keywords】 Endogenous infection; animal model; antibiotics; intestinal flora

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来临床上各种恶性肿瘤和免疫功能低下人群不断增加,随之而来的是广谱抗生素、免疫抑制剂、化疗、放疗以及器官移植等医疗手段的广泛使用,导致这些免疫功能低下患者肠道微生态出现失衡,破坏了正常菌群对肠黏膜的定植保护作用,为条件性致病菌的大量定植和肠外播散创造了条件,进而引发严重的内源性感染^[1]。临床治疗过程中,内源性感染是常见并发症,已成为引起患者死亡的主要高危因素^[2-3]。目前的动物感染模型研究中多为机体正常状态下通过静脉、腹腔或者口腔方式感染^[4-5],而模拟机体免疫抑制或肠道菌群紊乱状态时通过肠道菌群播散引起的内源性感染却不多见。前期研究中我们分析了恶性血液病患者真菌感染的危险因素^[6],在此基础上我们通过模拟该类患者发生感染的危险因素构建经肠道播散诱导内源性感染的动物模型并初步评价,为后续实验研究提供模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 ICR 雌性小鼠 24 只,体重 22~25 g,每组 8 只。小鼠来源于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,实验在浙江大学医学院附属第一医院动物实验中心进行【SYXK(浙)2013-0180】,全部饲养于小鼠独立通气笼内,饲养环境温度 18~25℃,湿度 50%~70%,小鼠在实验前适应环境 1 周。垫料、饲料和饮水均经过高温高压灭菌后使用。动物实验开展经浙江大学医学院附属第一医院实验动物伦理委员会审批(2017 实快审第 593)。

1.1.2 实验菌株及菌体悬液配置

白假丝酵母菌(*C. albicans*)#5 菌株由美国加利福尼亚医学研究中心 Karl V. Clemons 教授惠赠。无菌操作下,将-80℃冰箱中保存有白假丝酵母菌#5菌株的纸片剪下一片贴在沙堡显色培养基上,并在纸片上滴加 500 μL 沙氏培养液浸润,35℃培养 48 h。挑取复苏后的菌落进一步在液体沙氏培养液中增菌培养 36 h,4000 r/min 离心 7 min,弃上清,生理盐水洗涤两次后收集菌液,加入灭菌双蒸水配制成 1×10^9 cells/mL 菌液。

1.1.3 主要溶液配制

口服抗生素溶液为含有 1 mg/mL 口服型盐酸万古霉素、1 mg/mL 盐酸克林霉素和 0.2 mg/mL 硫酸庆大霉素的混合溶液,免疫抑制剂为浓度 10 mg/mL 的 5-FU 注射液。所用实验溶液均为现配现用。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理

实验全程共 18 d,模型组 A 小鼠第 0 天开始饮用抗生素溶液至第 7 天结束,第 8 天时尾静脉注射 5-FU,剂量为 200 mg/kg,共 1 次。模型组 B 在第 9、10 天时禁食禁水 8 h 后给予 0.3 mL 白假丝酵母菌悬液灌胃,共两次。对照组同样方法给予生理盐水饮用、尾静脉注射以及灌胃处理。

1.2.2 粪便涂片染色

分别收集小鼠抗生素溶液处理前、处理后、化疗药物处理后、白假丝酵母菌灌胃处理后四个阶段的粪便,参照张秀荣《肠道菌群粪便涂片检查图谱》^[7]对小鼠粪便进行涂片后革兰染色,每个染色标本油镜下分别计数 3 个视野下的革兰阳性杆菌、革兰阴性杆菌、革兰阳性球菌、革兰阴性球菌和酵母样菌的大致比例,以了解其肠道菌群状态。

1.2.3 粪便/组织器官载菌量检测

模型组 B 小鼠在给予白假丝酵母菌灌胃处理后第 2 天开始,每隔一天收集小鼠粪便进行白假丝酵母菌载量培养,观察其在小鼠肠道内的载量变化。方法如下:粪便颗粒称重后加入 1 mL 无菌生理盐水,使用无菌玻璃研磨管将其研磨成组织匀浆,将匀浆进行一系列梯度稀释,分别取 100 μ L 均匀涂布于沙堡显色培养基上,每个浓度做 2 个平行板,35 $^{\circ}$ C 培养 48~72 h 后进行菌落计数,各稀释度平板上菌落个数为 30~300 CFU 为宜,载菌量以 log (CFU/g) 表示。小鼠解剖后肺、肝脏和肾组织的细菌和真菌定量方法同上,分别接种于血平板和沙堡显色培养基进行菌落计数。

1.2.4 肠道菌群定量测定

分别提取大肠杆菌、双歧杆菌和粪肠球菌标准菌株 DNA,根据肠杆菌属、双歧杆菌属和肠球菌属基因保守区域设计特异性 PCR 引物,并在 BLAST 基因库中对所设计引物进行特异性分析。引物序列如下: *Enterobacteriaceae* (F: CATTGACGTTACC CGCAGAAGAAGC; R: CTCTACGAGACTCAAGCTT GC), *Bifidobacterium* (F: CGCGTCY * GGTGTGA AAG; R: CCCCACATCCAGCATCCA) (Y * 为简并碱基,代表 C/T), *Enterococcus* (F: AGAAATCCA AACGAACTTG; R: CAGTGCTCTACCTCCATCAT T)。经过 PCR、电泳、胶回收、T-A 克隆、测序、提取质粒、质粒定量、倍比稀释为不同浓度的标准品,然后进行荧光定量 PCR 建立标准曲线。粪便 DNA 提取采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, 51504),严格按照操作说明提取粪便核酸。荧光定量 PCR 反应体系总量 20 μ L,包括:SYBR Premix Ex Taq II Mix (2 \times) 10 μ L, ROX Dye II 0.08 μ L, Primer F+R (5 μ mol/L) 1.60 μ L, ddH₂O 6.32 μ L, 粪便 DNA 2.00 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 循环 40 次。反应结束后,对 PCR 产物进行充分延伸并分析溶解温度曲线:95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 然后以 1 $^{\circ}$ C/min 速率从 60 $^{\circ}$ C 升温至 95 $^{\circ}$ C, 期间持续采集荧光强度。每次荧光定量反应均以标准菌株 DNA 构建标准曲线,每份标准曲线和样品同时做 3 个复孔,并同时设置阴性对照孔,每次 PCR 反应完毕后根据溶解曲线分析产物的特异性,根据标准曲线得出 CT 值及各菌属总量,将所测得细菌载量值进行 log 对数转换后获得对数值进行统计分析。定植抗力指标 B/E 表示肠道正常菌群所提供

的对感染的保护作用,为双歧杆菌属与肠杆菌属的数量比值。

1.2.5 组织切片制作及 HE 染色

实验终点解剖小鼠进行载菌量检测的同时,各取部分小鼠组织进行组织固定,再按照脱水 \rightarrow 透明、透蜡 \rightarrow 石蜡包埋 \rightarrow 切片 \rightarrow 染色 \rightarrow 脱水 \rightarrow 封固的步骤进行病理切片及染色制作。

1.3 统计学方法

若数据服从正态分布,用独立样本 *t* 检验比较各组与对照组间的差异,若数据不服从正态分布,则用非参数检验。生存分析比较用 Kaplan-Meier 法检验, *P* < 0.05 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 小鼠体征和生存分析

给予抗生素溶液饮用 7 d 后,两模型组小鼠出现腹泻症状,表现为粪便稀松不成形。12 d 开始两模型组小鼠陆续出现感染症状,表现为摄食减退、被毛凌乱、蜷缩少动等体征,并有不同程度的死亡,其中模型组 B 死亡率较高(图 1)。

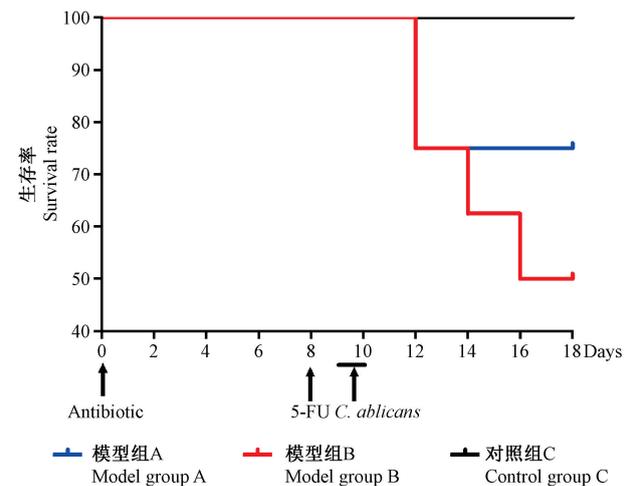
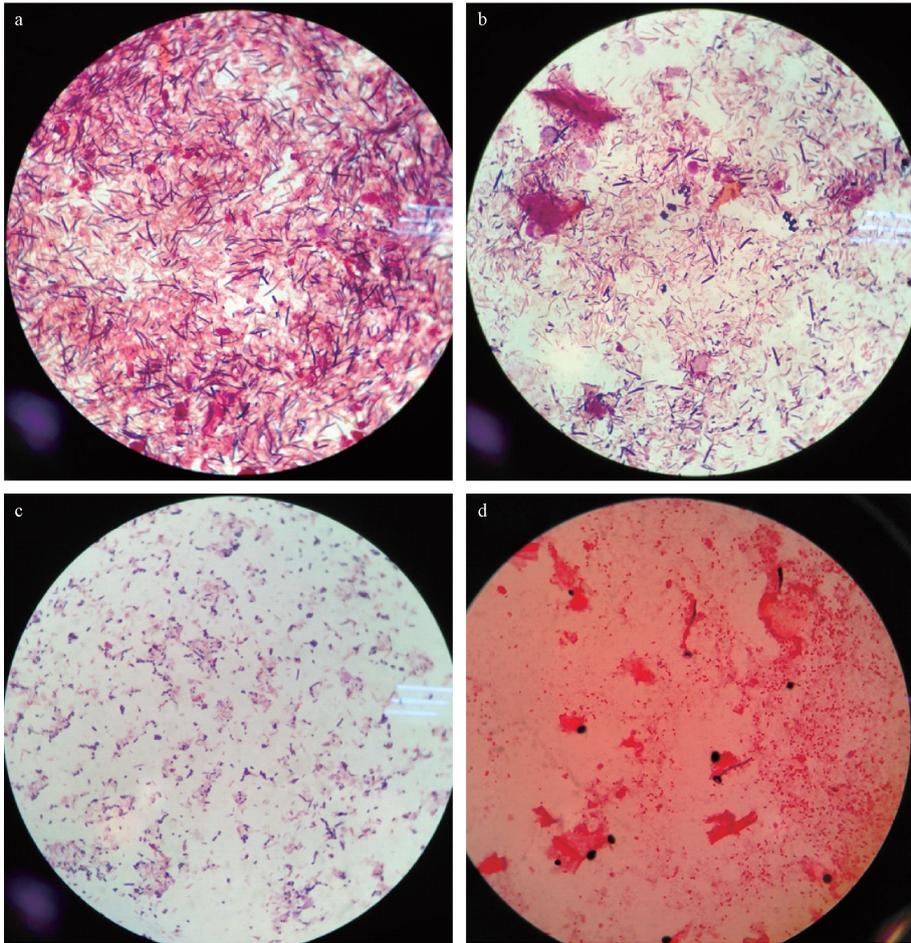


图 1 各组小鼠生存率分析曲线

Figure 1 Survival curves of the mice in each group

2.2 小鼠各实验阶段粪便菌群变化

粪便涂片革兰染色显示,抗生素溶液饮用前小鼠粪便中布满大量 G⁺ 杆菌和 G⁻ 杆菌,其间散在分布 G⁺ 球菌(图 2a)。饮用抗生素溶液 7 d 后, G⁺ 杆菌和 G⁻ 杆菌明显减少, G⁺ 球菌有所增加(图 2b)。接受 5-FU 化疗处理后 1 d, G⁺ 杆菌和 G⁻ 杆菌数量进一步减少, G⁺ 球菌大量增加(图 2c)。接受白假丝酵母菌灌胃处理后 2 d 模型组 B 小鼠粪便中出现大量的酵母样真菌,部分呈现菌丝相(图 2d)。



注:a. 无处理;b. 抗生素溶液饮用 7 d 后;c. 5-FU 尾静脉注射 1 d 后;d. 白假丝酵母菌灌胃 2 d 后。

图 2 小鼠不同处理后粪便菌群变化结果(革兰染色, $\times 100$ 倍)

Note. a. No treatment. b. Antibiotic solution for 7 d. c. One day after the i.v. injection of 5-FU. d. Two days after intragastric gavage of *C. albicans*.

Figure 2 Changes of the fecal flora in mice after different treatments (Gram staining, $\times 100$)

2.3 模型组 B 小鼠粪便白假丝酵母菌载量变化

实验第 11 天开始,模型组 B 小鼠白假丝酵母菌灌胃后每隔一天粪便培养结果显示,白假丝酵母菌载量逐渐减少,但平均载量都保持在 250×10^4 CFU/mg 以上(图 3)。

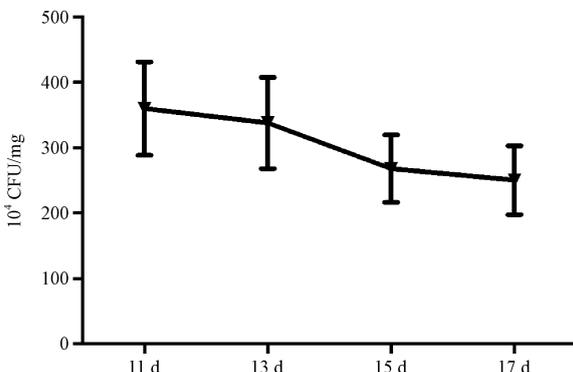


图 3 模型组 B 小鼠粪便白假丝酵母菌载量变化

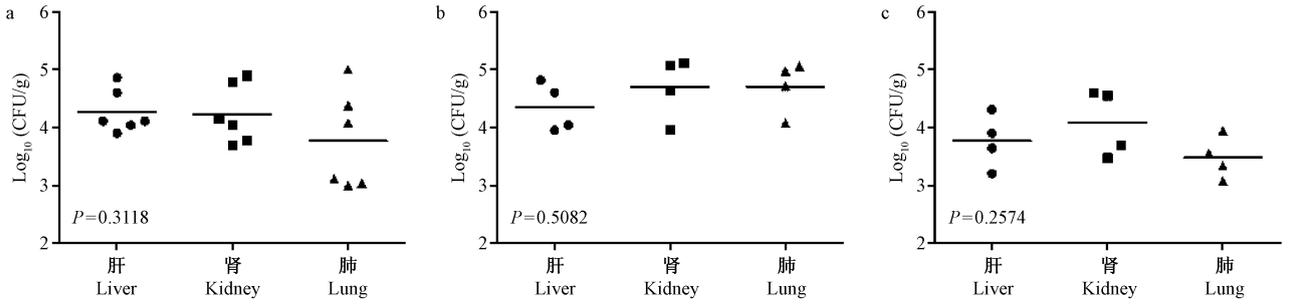
Figure 3 Changes in the load of fecal *C. albicans* in the mice of model group B

2.4 小鼠组织器官培养结果

实验终点时解剖各组小鼠,无菌条件下进行肝、肾和肺组织研磨后培养并计数载菌量,结果显示对照组 C 小鼠器官组织未发生细菌和真菌感染,两模型组 A 和 B 均发生了不同程度的细菌感染,载菌量在 $10^3 \sim 10^5$ CFU/g 数量级,不同器官细菌载量均无统计学差异(图 4a、4b),提示两组小鼠均出现系统性细菌感染。模型组 B 同时检测出白假丝酵母菌感染,载菌量在 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g 数量级,不同器官白假丝酵母菌载量无统计学差异(图 4c),提示该组小鼠出现系统性真菌感染。

2.5 小鼠脏器的病理检查结果

发生感染的两模型组与对照组小鼠组织切片 HE 染色显示;两模型组小鼠肺泡壁毛细血管扩张,血细胞大量渗出至肺泡腔,间质中炎症细胞弥散性浸润。肝细胞水肿,体积变大,胞质疏松化和气球



注: a. 模型组 A 细菌载菌量; b. 模型组 B 细菌载菌量; c. 模型组 B 白假丝酵母菌载菌量。

图 4 模型组小鼠肝脏、肾和肺的载菌量

Note. a. Bacterial load of the model group A. b. Bacterial load of the model group B. c. *C. albicans* load of the model group B.

Figure 4 Bacterial/fungi loads in the liver, kidney and lung of mice in the model groups

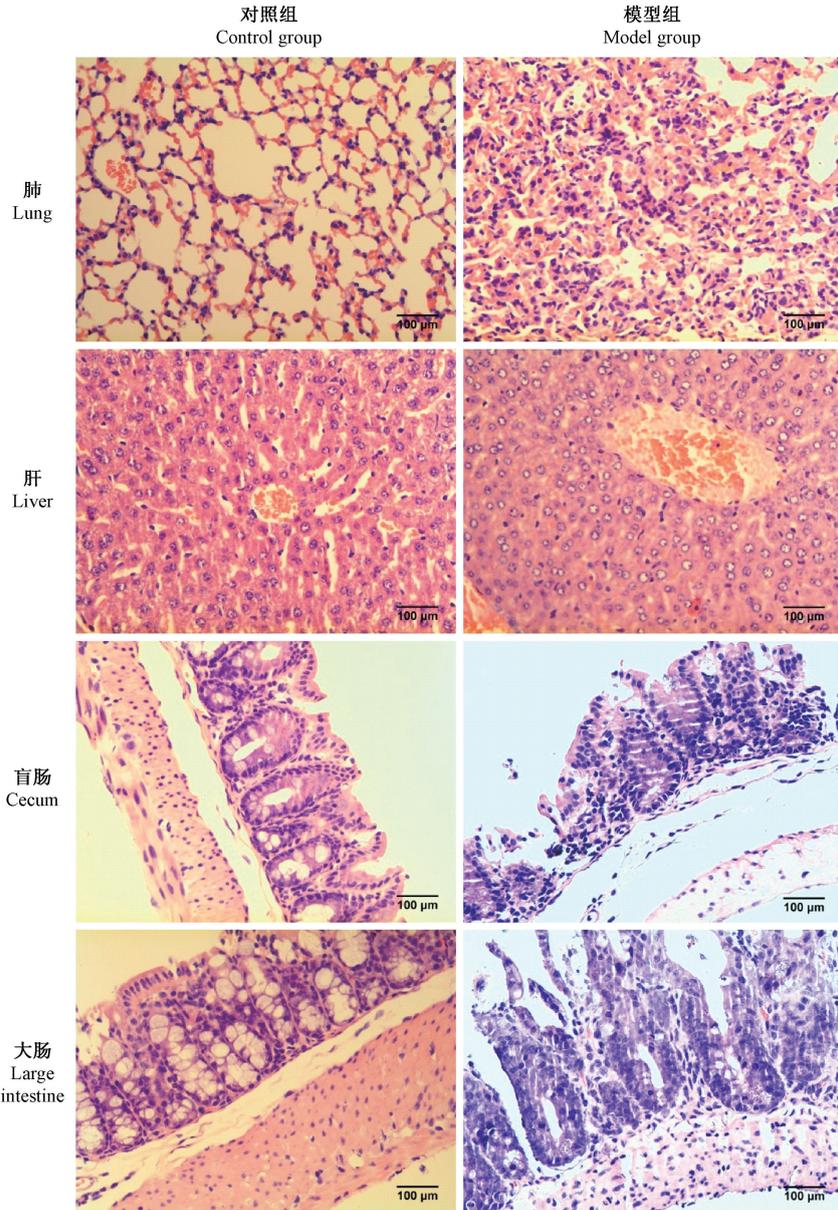


图 5 对照组和模型组小鼠病理改变(HE 染色)

Figure 5 Pathological changes in the organs of the mice of control and model groups(HE staining)

样变,肝窦受压变窄甚至消失。盲肠和大肠黏膜绒毛间隙明显增大,黏膜细胞脱落坏死,杯状细胞少见,黏膜肌层变薄(图 5)。

2.6 小鼠肠道菌群定量结果

实验终点时小鼠盲肠粪便 DNA 定量 PCR 结果

表 1 各组小鼠盲肠粪便 DNA 定量值

Table 1 Quantitative values of cecal fecal DNA of the mice in each group

指标 Indicators	对照组 C Control group C	模型组 A Model group A	模型组 B Model group B
肠杆菌属(1g CFU/g) Enterobacteriaceae	5.50 ± 0.93	8.54 ± 0.75**	8.69 ± 0.80**
双歧杆菌属(1g CFU/g) Bifidobacterium	7.12 ± 0.82	5.74 ± 0.76*	4.73 ± 1.52*
肠球菌属(1g CFU/g) Enterococcus	4.79 ± 0.43	4.91 ± 0.97	8.01 ± 1.40**
B/E 值 B/E values	1.34 ± 0.35	0.68 ± 0.12**	0.55 ± 0.18**

注:模型组 A、B 分别与对照组 C 比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ 。B/E>1 为正常范围,<1 表示肠道定植抗性下降。

Note. The model group A and B were compared with the control group C, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. B/E > 1 is the normal range, < 1 means the decreased intestinal colonization resistance.

3 讨论

我国抗生素滥用现象较为严重,而抗生素的滥用会引起肠道微生态失衡,临床在治疗基础疾病的同时极易继发内源性感染,严重者可触发全身炎症反应综合征,导致脓毒血症和多脏器功能衰竭,甚至死亡^[8]。目前的抗生素抗感染策略已经不能完全解决感染的难题,感染性疾病的防控与治疗亟需新的理论和方法。近年来,随着感染微生态概念和理论的提出,人们认识到肠道微生态失衡与内源性感染密切相关。因此,本实验拟建立的内源性感染动物模型将为从微生态方面探索内源性感染机制及抗感染途径提供动物模型基础。

肠黏膜屏障主要由机械屏障、生物屏障、免疫屏障和化学屏障构成,在防御肠道内病原体侵袭中发挥重要作用,而肠道是人体最大的“储菌器官”,微生态学已经证明肠道菌群失调是多器官功能紊乱和衰竭的始动器^[9]。研究采用广谱抗生素混合溶液喂养 ICR 小鼠后出现腹泻症状,粪便涂片染色发现肠道菌群 G^+ 杆菌和 G^- 杆菌明显减少, G^+ 球菌相应增加,与对照组比较发生了较为明显的菌群紊乱。该步抗生素处理破坏了肠道微生物屏障,为小鼠内源性感染的发生创造了先决条件。

既往研究发现使用 SCID 免疫缺陷型小鼠造模,可出现黏膜严重感染,很少发生系统性感染^[10-11]。同样的,使用特定基因敲除小鼠造模也只局限于局部黏膜感染而不能造成系统性感染^[12]。

如表 1 所示,与对照组 C 相比,模型组 A 和 B 肠道菌群结构发生紊乱,主要表现为双歧杆菌属数量显著下降,肠杆菌属数量显著增加,肠道定植抗性指标 B/E 值小于 1,说明两模型组小鼠肠道均出现了菌群微生态失衡。

因此,我们推测完整的黏膜屏障在抑制致病菌侵袭和转移的过程中发挥重要作用。已有研究表明免疫抑制剂的使用不仅导致免疫力低下,还可以造成肠道黏膜的破坏,使肠道机会性致病菌(如革兰阴性菌、白假丝酵母菌)穿过受损的黏膜造成系统性感染^[13]。本研究采用免疫功能正常的 ICR 小鼠,在口服用抗生素溶液的基础上给予尾静脉注射 5-FU,随后检测到多脏器细菌系统性感染。结合盲肠和大肠病理切片中黏膜生理屏障被破坏以及定量 PCR 显示的菌群紊乱,可以认为免疫抑制剂的使用为小鼠肠道致病菌经黏膜易位播散发生内源性感染提供便利通道。

白假丝酵母菌是常见的条件致病菌,人体肠道定植的白假丝酵母菌被认为是内源性白假丝酵母菌感染的主要途径。Clemons 等^[14]给予小鼠免疫抑制剂和全程抗菌药物处理后小鼠出现了白假丝酵母菌播散性感染。本研究在模型组 A 的基础上引入白假丝酵母菌,随后粪便涂片显示有菌丝相生成,连续检测粪便白假丝酵母菌载量显示其始终维持在较高水平。此外,该组小鼠内脏器官真菌培养发生了白假丝酵母菌感染,综合分析说明模型组 B 小鼠发生了内源性真菌感染。与 Clemons 模型结果不同的是,我们的实验中模型组 B 小鼠器官是细菌和白假丝酵母菌混合感染,可能的原因是我们仅在实验的前 7 d 给予抗生素溶液饮用,并未全程饮用,在撤掉抗生素后内源性细菌感染不能得以有效控制。此外,研究中发现混合感染使该模型组 B 小鼠

的死亡率高于模型组 A, 而该情况与临床此类患者真菌感染高死亡率现象吻合^[15]。

研究中不足的是, 在器官组织培养时未进行厌氧菌培养计数, 而肠道又是厌氧菌的“贮菌库”, 因此实际上器官组织的载菌量要高于本研究中的计数值。

综上所述, 本实验证实了肠道病原体在小鼠肠道菌群失调及免疫抑制条件下可突破肠黏膜屏障引起内源性器官组织感染, 为肠道微生态与内源性感染的相关机制研究提供了模型基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] Hart AL, Stagg AJ, Frame M, et al. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(8): 1383-1393.
- [2] 马园园, 赛音其木格, 张梅, 等. 血液肿瘤患者感染的实验室诊断进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(7): 1677-1680.
- Ma YY, Sai YQMG, Zhang M, et al. Laboratory diagnosis progress of hematologic malignancies co-infection [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2016, 26(7): 1677-1680.
- [3] 张晓, 张建超, 李伟华. 急诊肿瘤晚期感染患者的病原菌分布及炎性指标变化的意义分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(23): 5348-5351.
- Zhang X, Zhang JC, Li WH. Distribution of pathogenic bacteria and the significance of inflammatory indexes changes in patients with advanced cancer complicated with infections in emergency department [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2017, 27(23): 5348-5351.
- [4] 吴玉娥, 李航, 陈梅玲, 等. 系统性念珠菌感染小鼠模型的制备 [J]. *中国实验动物学报*, 2015(3): 301-305.
- Wu Y, Li H, Chen ML, et al. Preparation of a murine model of systemic *Candida albicans* infection [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015(3): 301-305.
- [5] 罗银珠, 潘金春, 何丽芳, 等. 白假丝酵母菌经口感染 ICR 小鼠建立系统性感染模型 [J]. *中国实验动物学报*. 2016, 24(6): 591-595.
- Luo YZ, Pan JC, He LF, et al. Establishment of a ICR mouse model of systemic *C. albicans* infection induced by oral inoculation [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2016, 24(6): 591-595.
- [6] 陈丽, 张伟丽, 叶先飞, 等. 恶性血液病患者医院侵袭性真菌感染的危险因素分析 [J]. *中国微生物学杂志*, 2015, 27(4): 417-420.
- Chen L, Zhang WL, Ye XF, et al. Risk factors of invasive fungal infections in patients with hematopoietic malignancies [J]. *Chin J Microecol*, 2015, 27(4): 417-420.
- [7] 张秀荣. 肠道菌群粪便涂片检查图谱 [J]. *解放军医学杂志*, 2000, 25(4): 33-33.
- Zhang XR. Fecal smear examinations of intestinal flora [J]. *Med J Chin PLA*, 2000, 25(4): 33-33.
- [8] Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept [J]. *Surgeon*, 2012, 10(6): 350-356.
- [9] 朱迎钢, 瞿介明. 医院感染治疗中的一个难以决策的问题: 定植还是感染? [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2011, 10(5): 421-423.
- Zhu YG, Qu JM. A difficult decision in hospital infection treatment: colonization or infection? [J] *Chin J Respir Crit Care Med*, 2011, 10(5): 421-423.
- [10] Clemons KV, Martinez M, Calderon L, et al. Efficacy of ravuconazole in treatment of systemic murine histoplasmosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(3): 922-924.
- [11] Clemons KV, Stevens DA. Orogastrointestinal model of mucosal and disseminated candidiasis [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 845(845): 557-567.
- [12] Ashman RB, Vijayan D, Wells CA. IL-12 and related cytokines: function and regulatory implications in *Candida albicans* infection [J]. *Clin Dev Immunol*, 2010, 2011: 686-697.
- [13] Kretschmar M, Felk A, Staib P, et al. Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1-6 of *Candida albicans* are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice [J]. *Microb Pathog*, 2002, 32(2): 61-70.
- [14] Clemons KV, Gonzalez GM, Singh G, et al. Development of an orogastrointestinal mucosal model of candidiasis with dissemination to visceral organs [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(8): 2650-2657.
- [15] Girão E, Levin AS, Basso M, et al. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital [J]. *Med Mycol*, 2008, 46(6): 581-588.

[收稿日期] 2018-11-20