

2010, 16(4): 225-254.

- [31] Mariem BJ, Ito T, Zhang M, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant Pantone-valentine leukocidin positive staphylococcus aureus clones disseminating in Tunisian hospitals and in the community[J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 2.
- [32] Finck-Barbançon V, Prévost G, Piémont Y. Improved purification of leukocidin from Staphylococcus aureus and toxin distribution among hospital strains[J]. Res Microbiol, 1991, 142(1): 75-85.
- [33] Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing staphylococcus aureus in primary

skin infections and pneumonia[J]. Clin Infect Dis, 1999, 29(5): 1128-1132.

- [34] Mcclure JA, Conly JM, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1141-1144.

(收稿日期: 2013-12-30)

• 综 述 •

## 鲍氏不动杆菌对常用消毒剂抗性的研究进展

骆园园, 张 玲 综述; 王厚照<sup>△</sup> 审校

(安徽医科大学解放军 174 临床学院, 福建厦门 361003)

**关键词:** 鲍氏不动杆菌; 消毒剂; 抗药性; 基因

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 09. 030

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)09-1159-03

鲍氏不动杆菌在医院环境中分布很广, 且可长期存活<sup>[1]</sup>, 从而成为院内, 尤其重症监护病房(intensive care unit, ICU)内感染的主要病原菌。鲍氏不动杆菌对常用抗菌药的耐药率有逐年增加的趋势, 并引起临床医师和微生物学者的关注。环境及物体表面的微生物控制主要依靠化学消毒剂的作用, 近年来, 很多学者开始关注医院环境和物体表面长期使用消毒剂是否会出现耐消毒剂菌株, 以及耐消毒剂菌株的出现是否意味着其对常用消毒剂不敏感而使消毒无效等问题。本文就有关鲍氏不动杆菌耐常用消毒剂的研究进展进行综述。

### 1 消毒剂抗性的定义

细菌对消毒剂的抗性是指对消毒剂的常用浓度不再有效的菌株的出现, 即在能杀灭或抑制绝大部分细菌的消毒剂浓度下, 具有消毒剂抗性的菌株不能被杀灭或抑制。另外, 某种细菌在消毒剂的作用下, 最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)超过法定浓度时, 则认为该细菌有了抗性<sup>[2]</sup>。

### 2 检测方法

**2.1 MIC 与最低杀菌浓度(minimal bacteriocidal concentration, MBC)的检测** 测定菌株的 MIC 或 MBC, 检测结果显著高于标准菌株时, 提示菌株对测定的消毒剂可能具有抗性。吴晓松等<sup>[3]</sup>认为使用消毒剂的根本目的不仅是抑制细菌生长, 更是要杀灭细菌, 因此, 测定 MBC 更能反映细菌对消毒剂的抗性。应当注意的是, 不能简单地说是某微生物对某种(类)消毒剂产生了抗性, 这是不正确的。抗性是一个相对概念, 与消毒剂对某微生物的作用浓度、作用时间等有关。

**2.2 耐消毒剂基因的检测** 国内研究多数采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)体系进行相关耐消毒剂基因检测。国外主要通过检测某些特定耐药基因来判断耐药性。目前的研究显示, 在革兰阴性杆菌中均可检测出耐消毒剂基因, 主要携带 *qacEΔ1-sulI* 基因, 也有鲍氏不动杆菌中检出 *qacA/B* 基因的少量报道<sup>[1]</sup>。魏兰芬等<sup>[4]</sup>报道了临床上分离的耐苯扎溴铵的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)中 *qacA/B*、*smr*、*mecA* 基因的检测和分析, 耐消毒剂基因的检出情况与 MIC 有关。目前已确定的消毒剂耐药基因不多, 国内、外尚无消毒剂微生物敏感性试验的标准出台。

### 3 常用消毒剂对鲍氏不动杆菌的杀菌作用

**3.1 含氯消毒剂** 研究表明<sup>[5]</sup>, 含 200 mg/L 有效氯的消毒剂对鲍氏不动杆菌作用 3 min 的杀菌率 99.99%, 当浓度达到 300 mg/L, 作用时间延长至 5 min 时, 其杀灭率达到 100%。白雪等<sup>[5]</sup>在研究耐药鲍氏不动杆菌对含氯消毒剂的抗性中发现, 含有效氯 300、1 000 mg/L 的消毒剂对不同克隆株的鲍氏不动杆菌的杀灭效果有明显差异。研究报道的不一致提示, 鲍氏不动杆菌是否存在对含氯消毒剂的低浓度抗性以及作用时间的相关性问题, 这些值得进一步探讨。

**3.2 醇类消毒剂** 链脂肪族醇类消毒剂作用很强, 能在很短的时间内杀灭微生物。其中, 最具杀菌价值的是乙醇、异丙醇和正丙醇。医用消毒的乙醇浓度为 75%, 能杀死大部分物体及皮肤表面细菌; 异丙醇和正丙醇的特性、作用与乙醇相似, 但其毒性较乙醇高, 杀菌作用比前者强。苏裕心等<sup>[6]</sup>研究发现, 单一乙醇的杀菌效果低于“乙醇+异丙醇”和“乙醇+正丙醇”, 这可能是由于乙醇的广泛应用, 产生了具有乙醇抗性的菌株。

**3.3 苯扎溴铵类** 研究显示, 500 mg/L 苯扎溴铵对多重耐药的鲍氏不动杆菌作用 5 min 以上, 可以杀死 99% 的菌株, 与标准菌株相比, 并无差别<sup>[7]</sup>。进一步研究发现, 多重耐药的鲍氏不动杆菌中消毒剂耐药基因的携带率高, 对苯扎溴铵的耐受浓度增加。*qac* 基因表达多种消毒剂化合物外排泵蛋白, 细菌获得 *qac* 基因可将苯扎溴铵类消毒剂等排出细菌胞外, 从而使这些消毒剂失去杀菌作用, 但目前尚未发现常规浓度对医院环境消毒无效的证据。

**3.4 聚维酮碘** 聚维酮碘是临床常用的皮肤表面消毒剂。王晓蕾等<sup>[8]</sup>研究 3 种革兰阴性杆菌对聚维酮碘的抗性中发现, 1 株铜绿假单胞菌对聚维酮碘的 MIC 明显高于其他标准菌株, 并从该株铜绿假单胞菌中检测出抗消毒剂基因(*qacEΔ1-sulI*)。目前鲍氏不动杆菌对聚维酮碘消毒剂的抗性株尚未见报道。

### 4 鲍氏不动杆菌对消毒剂的抗性

国外早在上世纪初就已发现铜绿假单胞菌对季铵盐类化合物有耐受现象, 继而陆续发现其他革兰阴性杆菌对消毒剂产生了抗性, 还发现铜绿假单胞菌对双胍类、酚类、醇类、碘类等消毒剂具有抗性。与微生物对抗菌药的耐药现象相似, 革兰阴

性杆菌对消毒剂的耐药性是存在的。

目前,尚未见鲍氏不动杆菌对消毒剂的抗性跟临床分离株的同源性远近相关性的报道。Wisplinghoff 等<sup>[9]</sup>研究临床暴流行的鲍氏不动杆菌与散发者对消毒剂敏感性无明显差异。徐燕等<sup>[10]</sup>研究了 7 株临床分离的鲍氏不动杆菌,其中,携带 *qacEΔ1-sulI* 基因的有 4 株,这些菌株对醋酸氯己定和苯扎溴铵的 MIC、MBC 均高于标准菌株,提示鲍氏不动杆菌对消毒剂抗性与其携带耐消毒剂基因之间存在一定的相关性。林军明等<sup>[11]</sup>研究发现,杀灭临床分离的泛耐药鲍氏不动杆菌所需消毒剂浓度和时间均较杀灭标准菌株高(乙醇除外),低浓度或常规剂量的消毒剂已无法杀灭鲍氏不动杆菌。胡永强等<sup>[12]</sup>在分析医院感染耐消毒剂基因的鲍氏不动杆菌时发现,25 株泛耐药菌中携带 *qacEΔ1* 基因 13 株,且阳性菌株中存在着以 A 型为主的感染流行。有报道多重耐药的鲍氏不动杆菌 *qacEΔ1* 基因阳性率高达 50%<sup>[13]</sup>。有研究发现<sup>[14]</sup>,多重耐药菌对消毒剂的抗性较标准菌强。姜梅杰等<sup>[15]</sup>报道,46 株泛耐药鲍氏不动杆菌中,93.5% 携带 *qacEΔ1* 基因。鲍氏不动杆菌对消毒剂产生抗药性的机制尚未明确,已有研究证实非多重耐药鲍氏不动杆菌对常用消毒剂敏感<sup>[16]</sup>,而泛耐药菌株对消毒剂,特别是对含氯和碘的消毒剂具有抗药性,其机制可能是通过细胞膜 *qacEΔ1-sulI* 外排泵基因表达的蛋白而发挥作用<sup>[17]</sup>。

## 5 消毒剂及抗菌药的交叉抗性

消毒剂的杀灭效果除了与其杀菌机制有关外,还与浓度和时间相关,姜如金等<sup>[18]</sup>研究表明,在有效氯浓度和作用时间一定的情况下,随着作用时间延长和有效氯浓度增加,消毒剂对多重耐药鲍氏不动杆菌的杀灭有效率也有升高。

*qacEΔ1* 基因表达的外排泵蛋白可外排季胺类化合物(*qac*),如苯扎溴铵、醋酸氯己定等消毒剂,导致对细菌的杀灭作用下降。鲍氏不动杆菌获得 *qac* 基因,可将季胺类化合物排出菌体外,表现为对季胺盐类消毒剂耐药。目前发现的亚型有 *qacA*、*qacB*、*qacC*、*qacD*、*qacE*、*qacEΔ1*、*qacF*、*qacG*、*qacH*、*qacJ* 等。*qacEΔ1* 位于 I 类整合子的 3' 末端,并与 *sulI* 基因为重叠基因。同时, I 类整合子可变区可携带氨基糖苷类、链霉素、氯霉素、磺胺类药物的抗性基因及耐 β 内酰胺酶基因<sup>[19]</sup>,并可以被鲍氏不动杆菌获取,且整合子比转座子更容易在同种细菌及不同种细菌中进行基因水平转移,从而快速传播细菌耐药性。因此, I 类整合子与鲍氏不动杆菌多重耐药性相关,自然也成了耐消毒剂基因与耐抗菌药基因联系的桥梁。不管是抗菌药的使用,还是消毒剂的广泛应用,均可使鲍氏不动杆菌获得 I 类整合子而产生耐药性和抗消毒剂的交叉抗性。周月清等<sup>[20]</sup>检测临床分离的鲍氏不动杆菌 *qacEΔ1-sulI* 基因的携带情况时发现,该基因阳性率为 90%,同时,该菌对哌拉西林、替卡西林、阿米卡星、妥布霉素、环丙沙星、头孢他啶的耐药率均超过 70%。Romão 等<sup>[21]</sup>对 31 株多重耐药鲍氏不动杆菌的检测显示,*qacEΔ1-sulI* 和 I 类整合子的阳性率分别为 80.6%、58.1%。研究显示,产超广谱 β 内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamase, ESBL)的大肠埃希菌对聚维酮碘和含氯消毒剂抗性比非产 ESBL 者强。张玉云等<sup>[22]</sup>对 30 多株多重耐药的铜绿假单胞菌进行检测,用戊二醛和含氯消毒剂对 13 株 *qacEΔ1* 阳性株进行定量杀菌试验,杀灭率为 100%,提示并非不能对检测出的携带 *qac* 基因的病原菌使用季胺盐类或双胍类消毒剂,但这有可能造成在低浓度时的消毒无效。

目前普遍认为,消毒剂的滥用、处理方法不当及剂量不足是消毒剂抗性产生的主要原因。消毒剂使用不当,使细菌长期接触亚抑制浓度的消毒剂,从而使耐消毒剂的菌株被筛选出来<sup>[23]</sup>;同时,由于鲍氏不动杆菌的泛耐药株的广泛存在,很容

易产生抗菌药和消毒剂均无法杀灭的超级细菌,从而把医院感染控制推向更为严峻的境地<sup>[24]</sup>。临床上还需不断探讨鲍氏不动杆菌,尤其是泛耐药鲍氏不动杆菌对消毒剂的抗性机制,进而为临床提供更有效的环境控制。

## 参考文献

- [1] 谢红梅,胡必杰,陶黎黎,等.重症监护病房环境与临床分离耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的 REP-PCR 分型研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2011,31(10):903-906.
- [2] 薛广波.现代消毒学[M].北京:人民军医出版社,2002.
- [3] 吴晓松,陈越英,谈智,等.三种革兰阴性杆菌耐消毒剂基因检测及对苯扎溴铵抗性研究[J].中国消毒学杂志,2009,26(3):249-251.
- [4] 魏兰芬,潘协商,张磊,等.建立鲍曼不动杆菌生物膜合成相关基因信息分析及 PCR 检测方法[J].中国消毒学杂志,2011,28(4):414-417.
- [5] 白雪,陈伯义,褚卓卓.耐亚胺培南鲍曼不动杆菌对消毒剂抗性试验观察[J].实用药物与临床,2010,13(3):227-229.
- [6] 苏裕心,魏秋华,任哲,等.MRSA 和鲍曼不动杆菌抗药基因检测及对 3 种醇类消毒剂抗性研究[J].军事医学,2012,36(11):851-854,861.
- [7] 顾福萍,徐伯赢,蒋培余.常用消毒剂对多重耐药鲍曼不动杆菌杀灭效果的试验观察[J].现代预防医学,2010,37(16):3136-3137,3139.
- [8] 王晓蕾,吴晓松,谈智,等.三种革兰阴性杆菌抗消毒剂基因检测及其对碘伏的抗性研究[J].中国消毒学杂志,2009,26(1):8-10.
- [9] Wisplinghoff H, Schmitt R, Wöhrmann A, et al. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Hosp Infect, 2007, 66(2):174-181.
- [10] 徐燕,吴晓松,谈智,等.鲍曼不动杆菌抗药基因检测及对消毒剂抗性研究[J].中国消毒学杂志,2008,25(4):341-343.
- [11] 林军明,王笑笑,皮博睿,等.四种消毒剂对鲍曼不动杆菌杀灭效果的实验研究[J].中国消毒学杂志,2013,30(6):508-510.
- [12] 胡永强,贾蓓,李崇智,等.医院感染鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因及同源性分析[J].中国抗生素杂志,2012,37(5):348-351.
- [13] 黄宏耀,杨宏伟,侯伶俐,等.医院感染铜绿假单胞菌耐消毒剂基因研究[J].中华实用诊断与治疗杂志,2010,24(10):1038-1039.
- [14] 周士新,顾健,郭喜玲,等.医院环境中分离的革兰阴性杆菌对消毒剂的抗性及其抗药基因研究[J].中国消毒学杂志,2010,27(5):567-569.
- [15] 姜梅杰,冯莉,张福森.多重耐药鲍曼不动杆菌中氨基糖苷类修饰酶基因及 *qacEΔ1* 基因的研究[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(11):3062-3064.
- [16] 林辉,郑剑,金春光,等.五种消毒剂对鲍曼不动杆菌杀菌效果的实验研究[J].中国消毒学杂志,2009,26(1):15-17.
- [17] Zavaski AP, Carvalhaes CG, Picão RC, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010, 8(1):71-93.
- [18] 姜如金,朱健铭,吴康乐.含氯消毒剂对多重耐药鲍曼不动杆菌杀灭效果的研究[J].中华临床感染病杂志,2012,5(1):5-8.
- [19] 赵丽霞,王家平,王苏建,等.医院感染患者临床分离细菌耐消毒剂基因的检测分析[J].中华医院感染学杂志,2009,19(2):124-125.
- [20] 周月清,陆开来.鲍氏不动杆菌耐消毒剂磺胺基因、I 类整合酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究[J].中华医院感染学杂志,2005,15(7):728-731.
- [21] Romão C, Miranda CA, Silva J, et al. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics[J]. Curr Microbiol, 2011, 63(1):16-21.

- [22] 张玉云,吴金英,范小莉,等.多药耐药铜绿假单胞菌消毒剂-磺胺耐药基因检测与临床意义[J].中国感染控制杂志,2009,8(1):7-9.
- [23] Soumet C,Fourreau E,Legrandois P,et al. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*[J]. Vet Microbiol, 2012, 158(1/2):

147-152.

- [24] Wyllie D, Paul J, Crook D. Waves of trouble: MRSA strain dynamics and assessment of the impact of infection control[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(12):2685-2688.

(收稿日期:2013-12-04)

• 综 述 •

## 结核高负担地区结核分枝杆菌快速诊断方法的研究进展

王晓玮 综述,徐元宏<sup>△</sup>审校

(安徽医科大学第一附属医院检验科,安徽合肥 230022)

**关键词:**结核分枝杆菌; 培养; 核酸扩增技术; 抗原; 诊断

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.031

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2014)09-1161-03

人类患结核病的历史悠久,18 世纪科学家分离出结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB),随后抗结核药物的使用使结核病得到有效控制。但 20 世纪 80 年代后期,世界结核病疫情又开始回升,且日趋严重。根据最新统计,目前全球每年约新增 870 万人感染活动性结核菌[13% 的患者同时感染人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)];每年约有 140 万人死于结核病。在结核病患病率增高的同时,多重耐药也成为抗结核治疗的一大难题。至 2011 年,全球共报道 31 万多重耐药结核病病例。其中有 60% 以上发生在中国、印度、南非等发展中国家<sup>[1-2]</sup>。实现早期结核病治疗的基础是早期快速诊断,结核病的确诊主要依据细菌学检测。目前实验室对结核病诊断时间较长,这成为这些结核高负担国家结核病控制的瓶颈之一,因此,快速、准确、灵敏、价格低廉的结核病实验室诊断方法对结核病控制有着极为重要的意义。以下将从直接诊断和间接诊断两方面简要介绍近几年结核病高负担地区结核病实验室快速诊断的发展情况。

### 1 MTB 的染色涂片检测

目前在结核病高负担国家,采用萋尼抗酸染色,通过普通光学显微镜直接检测(镜检)痰标本中的 MTB,具有操作简单、染液成本低、对显微镜要求低等特点,是诊断肺结核的常规方法之一。但普通抗酸染色敏感性不高,这一困扰基层结核病防治工作者<sup>[3-4]</sup>。荧光(金胺 O)染色的操作较抗酸染色更简便,且敏感性大幅提高,为结核涂片镜检的发展提供了新的方向,但由于荧光显微镜价格昂贵,限制了金胺 O 染色的应用。随着发光二极管(light emitting diode, LED)技术的快速发展,LED 显微镜被用于痰涂片的 MTB 检测。有研究表明,该法的敏感性较普通抗酸染色提高 10% 以上<sup>[5]</sup>,且 LED 光线稳定、价格低、寿命长、不产生紫外线和热量,无需暗室观察及其他特殊设备,具有较大的实用价值<sup>[6]</sup>,但其阳性率较低,仍需结合其他检测方法进一步确证。标本预处理的改进对提高结核病患者的检出率有重要的意义,如免疫磁珠捕获法可通过磁珠及特异性结核抗体吸附 MTB,从而提高痰涂片阴性的结核病诊断效率,该法还具有特异性高、敏感性强的特点,无需昂贵的仪器设备,适合基层检验机构使用<sup>[7]</sup>。

### 2 MTB 的快速培养

MTB 的分离培养作为结核诊断的“金标准”在临床中应用广泛,但使用传统改良罗氏固体培养基培养操作繁琐、费时,影响因素多,不能满足快速诊断的要求;而液体培养技术简便、快捷、商业化程度较高,弥补了这些缺陷。据报道全自动

BACTEC MGIT 960 培养系统(美国 BD 公司)、BacT/Alen 3D 全自动血培养仪(法国生物梅里埃公司)等依赖一种氧敏感荧光化合物检测 MTB 的生长,无放射性污染,可将敏感性提升至 88%,若同时用痰涂片检测 MTB,可提高至 92%。液体培养在提高检出率的同时,对微生物敏感性试验的报告时间比传统培养基缩短 10 d 以上,且具有更高的阳性检出率<sup>[8]</sup>。目前,WHO 已推荐在部分地区(主要为低收入国家)实行液体培养基技术。

除此之外,目前还可将 MPT64 的分泌作为 MTB 的生长指标,通过采用商品化试纸检测液体培养基中的 MPT64 间接检测 MTB<sup>[9]</sup>。该方法具有高敏感性、高专一性,但其易被污染的缺点有待改进。

对于多药耐药结核病(multi-drug resistance tuberculosis, MDR-TB)、广泛耐药结核病(extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB)的检测,可用倒置显微镜观察薄层琼脂法,成本较低,在 10 d 内观察生长情况的同时,还可根据特定的杆状表型初步鉴别 MTB;与其他液体培养基比较,降低了潜在气溶胶的危险性,为医用资源有限、不能应用复杂技术的国家提供了一种合适的方法<sup>[10]</sup>。

### 3 MTB 的分子生物学检测

对 MTB 核酸的检测已在文献中广泛报道,主要分为 2 类。一类以聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术为基础,检测靶标为 DNA 的核酸检测技术。Meta 分析显示,PCR 技术将总敏感性和总特异性分别提升至 85% 和 97%,但这些研究结果的差异较大,提示不同地区的 PCR 仪器及技术水平影响较大<sup>[11]</sup>。

近几年,通过引物设计的发展和多重 PCR 检测方法的改进,出现了一些自动化程度高且操作简单的 PCR 产物检测技术平台,提高了 PCR 检测试剂的商业化程度,也降低了结果的差异性。如 Luminex xMAP 技术的新型生物芯片技术平台,该平台主要利用液相芯片技术(又称为微球体悬浮芯片),是最早通过美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)认证的可用于临床诊断的生物芯片技术,与同类型固体芯片技术比较,具有操作简单、成本低、杂交快、应用灵活等优点。研究表明,该法的检测周期为 2 h,还可同时检测其他呼吸道传染病。但其作为开放平台,在提高仪器利用率的同时,也易造成污染<sup>[12]</sup>。此外, Bergval 等<sup>[13]</sup>报道的多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)也已被应用于肺结核及肺外结核的诊断,该法针对待检 DNA