

【论 著】

医护人员与健康体检人员携带的金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因的检测

叶慧芬,曾俊韶,覃文周

(广西壮族自治区贵港市人民医院,广西贵港 537100)

摘要 目的 研究医护人员携带的金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因及其人群分布情况,为防控感染提供参考。**方法** 采用细菌分离鉴定和聚合酶链反应(PCR)方法,对部分医护人员和健康体检人群鼻前庭棉拭子标本进行检测与分析。**结果** 从110份医护人员标本中检出金黄色葡萄球菌41株,检出率为37.3%;从336名体检人员中,分离出金黄色葡萄球菌84株,检出率为25.0%,医护人员金黄色葡萄球菌检出率明显高于体检人员($P=0.01$, $P<0.05$)。41株医护人员携带的金黄色葡萄球菌检出6株携带 *qacG*, *H* 基因或 *J* 基因,携带率为14.63%;84株健康体检人员携带的金黄色葡萄球菌检出3株携带 *qacG*, *H* 或 *J* 基因,携带率为3.67%,医护人员携带含耐消毒剂基因的金黄色葡萄球菌明显高于体检人员($P=0.012$, $P<0.05$)。所有凝固酶阴性葡萄球菌中并未检测出耐消毒剂基因。**结论** 医护人员携带的金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因携带率高于健康志愿者,提示医院环境内消毒剂的广泛应用可能会诱导金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因的表达。

关键词 金黄色葡萄球菌;耐消毒剂基因;医护人员

中图分类号:R187.2

文献标识码:A

文章编号:1001-7658(2019)10-0748-03

DOI:10.11726/j.issn.1001-7658.2019.10.009

Detection on anti-disinfectant genes of *Staphylococcus aureus* carried by medical staff and health examination personnel

YE Hui-fen, ZENG Jun-shao, QIN Wen-zhou

(Guigang People's Hospital of Guangxi, Guigang Guangxi 537100, China)

Abstract Objective To investigate the anti-disinfectant genes of *Staphylococcus aureus* carried by medical staff and their population distribution, so as to provide reference for prevention and control of infection. **Methods** Bacterial isolation and polymerase chain reaction (PCR) were used to detect and analyze cotton swab specimens of nasal vestibule collected from some medical staff and healthy people. **Results** 41 strains of *Staphylococcus aureus* were detected from 110 medical staff samples, and the detection rate was 37.3%; 84 strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from 336 physical examination personnel, and the detection rate was 25.0%. The detection rate of *Staphylococcus aureus* in medical staff was significantly higher than that of physical examination personnel ($P=0.01$, $P<0.05$). 6 of 41 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from medical staff carried *qacG*, *H* or *J* gene, and the carrying rate was 14.63%; only 3 of 84 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from healthy volunteers carried *qacG*, *H* or *J* genes, and the carrying rate was 3.67%, the *Staphylococcus aureus* containing the anti-disinfectant gene in medical staff was significantly higher than that in physical examination personnel ($P=0.012$, $P<0.05$). No anti-disinfectant gene was detected in all coagulase-negative staphylococci. **Conclusion** The carrying rate of *Staphylococcus aureus* containing anti-disinfectant genes in medical staff is higher than that of healthy volunteers, suggesting that the widespread use of disinfectants in hospital environments may induce the expression of *Staphylococcus aureus* anti-disinfectant genes.

Key words *Staphylococcus aureus*; anti-disinfectant genes; medical staff

据报道,大约20%~30%的美国人长期携带金黄色葡萄球菌^[1]。国内对健康人群携带情况研究报道不多,在由金黄色葡萄球菌医院感染病例中,则

以社区获得感染居多。金黄色葡萄球菌是分离率最高的病原菌,它可引起皮肤、肺脏和血液等感染,毒力强,具有严重耐药倾向,尤以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为甚。金黄色葡萄球菌耐消毒剂 *qac* 基因家族自发现以来就引起多方关注,但其在不同地区的分布规律及流行的基因型尚不十分清

〔作者简介〕 叶慧芬(1982-),女,广西贵港人,硕士,副主任技师,从事临床微生物相关的研究工作。

楚。为了解医疗机构的医护人员及健康人群携带金黄色葡萄球菌分布及其携带耐消毒剂基因情况,本研究对部分来自医护人员和健康人群鼻腔拭子标本进行检测与分析,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

研究标本选自广西贵港市人民医院 110 名医护人员和 336 名健康体检人员鼻前庭棉拭子标本,列入研究的医护人员均从事临床一线工作 2 年以上,健康体检人员均来自社区,近 6 个月未接触过医院环境,参与研究的人员均为健康状态。参考标准菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)。

1.2 研究方法

1.2.1 细菌分离鉴定 所有棉拭子标本由该医院细菌室负责检验。经过初步分离培养,对分离出的菌株均采用生化鉴定和细菌分离鉴定系统及其配套的鉴定卡对细菌种类作出鉴定,收集统计所检出的金黄色葡萄球菌。MRSA 鉴定采用头孢西丁培养法,根据美国临床实验室标准化研究所(2018 版 CLSI)的标准判读结果,凡抑菌圈≥21 cm 则为 MR-SA 菌株。

1.2.2 菌株处理及模板制备 在 0.5 ml 离心管内预置 100 μl 生理盐水,再挑取少许纯培养金黄色葡萄球菌菌落放入离心管内,混匀。于 15 000 rpm/min 离心 5 min,吸弃上清液,加入裂解液混匀,经 55 ℃ 水浴 60 min,再经 95 ℃ 5 min;重新置于 10 000 rpm/min 离心 30 s,取上清液作为模板,放入 -20 ℃ 冰箱备用。

1.2.3 PCR 测定 qacG,H,J 基因采用半巢式聚合酶链反应(PCR)检测葡萄球菌耐消毒剂基因 qacG,H,J。基因的引物序列及产物长度见表 1。

表 1 qacG,qacH 及 qacJ 的引物序列		
引物	引物序列(5'→3')	产物长度
qacG Forward	TTT CGT TTG GAA TTT GCT TT	qacG194bp
qacG Reverse	AAT GGC TTT CTC CAA ATA CA	
qacH Forward	CAA TAG TCA GTG AAG TAA TAG GCA GTG	qacH295bp
qacH Reverse	TGT GAT GAT CCG AAT GTG TTT	
qacJ Forward	GGC CAA CAT TAG GCA CAC TTA	qacJ232bp
qacJ Reverse	TGA CTT GAT CCA AAA ACG TTA AGA	

热循环参数为:95 ℃ 预变性 5 min,然后 95 ℃ 30 s→55 ℃ 30 s→72 ℃ 60 s,循环 30 个周期,然后

最后一个周期为 72 ℃ 延长至 5 min。耐药基因检测试剂盒购自美国某公司,扩增产物作 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶电泳仪上成像并记录结果。

2 结果

2.1 细菌分离培养结果

结果表明,从 110 名医护人员鼻拭子标本中,共分离培养出葡萄球菌 93 株,其中金黄色葡萄球菌 41 株,检出率为 37.27%;余及 52 株均为凝固酶阴性葡萄球菌。从 336 名健康人群鼻前庭棉拭标本中,共分离出葡萄球菌 240 株,其中金黄色葡萄球菌 84 株,检出率为 25.0%,余及 156 株均为凝固酶阴性葡萄球菌。医护人员与体检人群鼻腔拭子金黄色葡萄球菌检出率比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。两组人员检出的 125 株金黄色葡萄球菌中,未检出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),详见表 2。

表 2 医务人员与体检人员金黄色葡萄球菌检出情况					
组别	人数	葡萄球菌株数	SA 株数	检出率(%)	CNS 株数
医护人员	110	93	41	37.27	52
体检人员	336	240	84	25.00	156
合计	446	333	125	28.03	208

注:SA 为金黄色葡萄球菌;CNS 为凝固酶阴性葡萄球菌。

2.2 qacG,H,J 基因检测结果

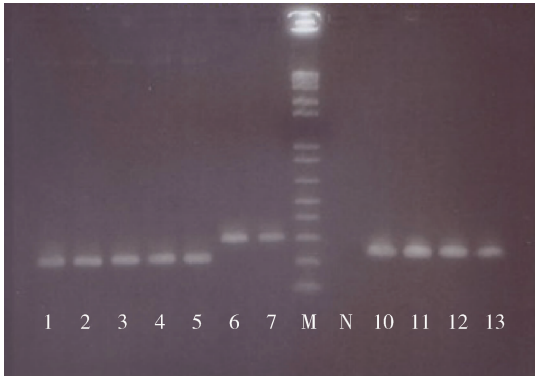
结果表明,医护人员携带的 41 株金黄色葡萄球菌中检测出 6 例含 qacG,H 或 J 基因,携带率为 14.63%;体检人员携带的 84 株金黄色葡萄球菌中检测出 3 例含 qacG,H 或 J 基因,携带率为 3.57%;组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 3 及图 1。凝固酶阴性葡萄球菌中未检测出含有耐消毒剂基因 qacG,H 或 J 的菌株。

表 3 人体携带金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因的检出情况					
组别	检测株数	耐消毒剂基因检出率(%)			
		qacGHJ	qacG	qacH	qacJ
体检人员	84	3.57	1.19	0.00	2.38
医护人员	41	14.63	4.88	2.44	7.32

3 讨论

金黄色葡萄球菌是医院和社区感染的重要病原菌。为了躲避宿主的免疫监控,以及各种抗菌药物多位点的攻击,细菌必然采取多种策略适应环境,尤其是周围不利因素。在医院感染及疾病防治控制领域,消毒剂或抗微生物制剂一直发挥着重要的作用。然而,随着这些抗微生物试剂的广泛使用,关于细菌对消毒剂耐药性的报道也日渐增多,尤其是金黄色

葡萄球菌的耐消毒剂 *qac* 基因。金黄色葡萄球菌 *qac* 转运系统属于主要易化子超家族(MFS)和小的多重耐药家族(SMR),由质粒编码,*qacA* 和 *qacB* 编码的 *QacA/B* 蛋白属于 MFS 家族,而 *qacC*, *qacG*, *qacH* 以及 *qacJ* 编码的蛋白属于 SMR 家族。*qac* 基因家族主要通过表达多种化合物的外排泵,可将各种结构不同的化合物排出体外,从而对多种抗菌药物及消毒剂产生耐药。



注:1~4:*qac G* 阳性标本;5:*qacG* 阳性对照;6:*qacH* 阳性标本;7:*qacH* 阳性对照;8:Marker; N:阴性对照;9:*qacJ* 阳性对照;10~12:*qacJ* 阳性标本; M: 从上至下:1 000 bp, 850 bp, 650 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp。

图1 *qacG, H, J* 基因检测结果

目前国内学者对金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因的研究主要集中在 *qacA* 及 *qacB* 上,而各地发现的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *qacA/B* 基因的分布也从5%^[2]、41%^[3]到100%^[4]不等。*qacG, H, J* 基因是近些年来外国学者最先从动物身上发现,随后在人类标本中也发现了含有这些基因的葡萄球菌,并且与 *smr* 基因具有高度的同源性。LIU 等在临床分离的404株金黄色葡萄球菌中发现4例含 *qacH* 基因^[5],英国学者 Vali 也发现大约3.3% (4/120) 的MRSA 含有 *qacH* 基因^[6]。我国学者莫晓能等在124株MRSA 中检出45株含有 *qacJ* 基因,检出率为36.3%^[7]。

研究发现,医护人员携带金黄色葡萄球菌 *qacG, H, J* 基因的比例明显高于普通群众,两者之间存在显著性差异。产生这种差异的原因首先是,在医院这种特殊环境中,消毒剂长期而广泛地存在,某些微生物为了适应环境并繁衍后代,必须改变自身体内外的一些因素,如增加细胞外膜的厚度,改变消毒剂作用的靶位或通过细胞体内各种外排泵将抗微生物试剂排出体外^[8]。其次,在临床医疗环境中,

物体表面残留的消毒剂对诱导耐消毒剂基因的产生以及传播起了重要的作用。季胺类消毒剂(如新洁而灭,洗必泰等)为阳离子表面活性物质,长期小剂量的消毒剂作用下,能为耐消毒基因在金黄色葡萄球菌的不同个体之间的转导提供更多的位点,从而导致了耐消毒剂基因更快更广泛地传播。朱永强^[9]在上海地区的研究也证明医院环境中金葡菌 *qac* 基因检出率远高于健康人群。

金葡菌 *qac* 基因的表达,除了与消毒剂作用于细胞的靶位,消毒剂本身的结构有关外,还与使用消毒剂的浓度有关。有些医院将用剩的消毒剂加水稀释继续使用,这样的消毒方法非但没有使药物浓度达到应有的杀菌水平,反而更加容易诱导耐消毒剂基因的产生,从而使现有的消毒剂失效。我们应该深化对细菌耐消毒剂基因的认识,采取严格有效的消毒措施,尽量减慢减缓细菌对消毒剂耐药的进程。

参考文献

[1] Hanssen AM, Kindlund B, Stenklev NC, *et al.* Localization of *Staphylococcus aureus* in the nasal vestibule in healthy carriers [J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 89.

[2] 王华丽, 盛家琦, 黄文祥. 金黄色葡萄球菌耐消毒剂基因 *qacA* 的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(4): 229-231.

[3] 曹雪鹏, 刘梦婷. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *qacA* 基因的检测[J]. 牡丹江医学院学报, 2018, 39(4): 8-10.

[4] 黄文密, 陆亚华, 诸葛青云, 等. 多重耐药 MRSA 耐消毒剂基因及抗生素耐药相关基因检测[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(5): 270-273.

[5] Liu Q, Liu M, Wu Q, *et al.* Sensitivities to biocides and distribution of biocide resistance genes in quaternary ammonium compound tolerant *Staphylococcus aureus* isolated in a teaching hospital[J]. Scand J Infect Dis, 2009, 41(6-7): 403-409.

[6] Vali L, Davies SE, Lai LL, *et al.* Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(3): 524-532.

[7] 莫晓能, 李建国, 唐英春, 等. 主动外排系统在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌多重耐药中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 40-43.

[8] Costa SS, Viveiros M, Pomba C, *et al.* Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen [J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(2): 320-324.

[9] 朱永强. 2004-2010 年上海地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌携带耐消毒剂基因 *qacA/B* 情况及动态分析[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(6): 678-680.

(收稿日期: 2019-04-09)