

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2016.08.025

· 综述 ·

微生物产生消毒剂抗性研究进展

Research advances in microbial disinfectant resistance

赵凯丽(ZHAO Kai-li),李武平(LI Wu-ping)

(第四军医大学西京医院,陕西 西安 710032)

(Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Shaanxi 710032, China)

[关键词] 细菌;微生物;消毒剂;抗性;机制

[中图分类号] R187+.2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2016)08-0633-04

细菌与人类的关系始终处于共生平衡的破坏与恢复之间,随着医学的发展,抗菌药物及化学消毒剂是治愈疾病、消灭细菌的利器,然而也导致细菌产生新的防御机制和侵袭性。感染的预防和控制一直是医院乃至整个医学发展的棘手问题,目前人类对抗菌药物滥用现象已有所重视,各个国家和地区均采取相应的监控措施促使抗菌药物合理的应用。然而细菌的耐药现象不再局限于对抗菌药物,对消毒剂的抗性也不断增加。不同的是,抗菌药物通过具体途径和作用靶点杀灭/抑制病原微生物,而消毒剂则以非特异多靶点机制起作用,使得对其抗性的研究更为复杂^[1]。当细菌产生消毒剂抗性后,呈现出细菌选择性,即那些适应性和抵抗力更强的细菌得以存活,导致更难控制和治疗的感染^[2]。

1 消毒剂抗性的定义

细菌对消毒剂的抗性是指出现对常用浓度的消毒剂不再敏感的菌株,即在一般可以杀灭或抑制绝大部分细菌的浓度下,具有消毒剂抗性的菌株则不能被杀灭或抑制。也有学者^[3]以分离菌株的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)或最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)与标准菌株的 MIC 或 MBC 对比判定有无耐药性^[3]。某种细菌在消毒剂的作用下, MIC 超过规定浓度时,则认为该细菌有抗性。多数情况下,消毒剂用于医院内消毒的目的是杀灭细菌,而非仅仅抑

制细菌,因此,选择 MBC 作为评定标准更有意义。

2 细菌对常见消毒剂的抗性

细菌对消毒剂的抗性最早于 20 世纪 60 年代发现,起初是对季铵盐类(quaternary ammonium compounds, QACs),随之发现对双胍类,如洗必泰的抗性,近年又发现对酚类、醇类、碘类等的抗性^[3]。Beier 等^[4]用 344 株大肠埃希菌 O157:H7 作为消毒对象进行试验,其中 68 株(19.77%)对氯己定(39 株)或苯扎氯铵(12 株)有抗性,68 株中 3 株对氯己定及苯扎氯铵均有抗性,有 3 株对氯己定和苯扎氯铵的 MIC 同时增高。Shiraishi 等^[5]在日本某医院进行的一项两阶段观察消毒剂抗性的研究发现,在试验第一阶段(1985 年 8 月—1986 年 7 月)临床分离 6 类 9 种共 353 株菌,其中 7% 表现为抗葡萄糖酸氯己定(chlorexidene gluconate, CHG),13% 抗苯扎氯铵(benzalkonium chloride, BAC),15% 对两者均有抗性,分离的洋葱假单胞菌中 70% 对 CHG 和 BAC 同时具有抗性。

2.1 醛类消毒剂 De Groote 等^[6]发现抗戊二醛的分枝杆菌,可能原因是一种细胞外膜孔蛋白表达减少,导致对戊二醛产生较高水平的抵抗。研究人员同时指出脓肿分枝杆菌呈现出对醛类消毒剂抗性(邻苯二甲酸居多),应当引起警觉,临床使用的各种消毒剂会促进该类细菌的出现及传播。

2.2 醇类消毒剂 醇类消毒剂使用范围广泛,医院

[收稿日期] 2015-12-25

[作者简介] 赵凯丽(1991-),女(回族),甘肃省天水市人,硕士研究生,主要从事重症监护与医院感染管理研究。

[通信作者] 李武平 E-mail:liwuping@fmmu.edu.cn

内常将 75% 乙醇用于医疗器材和皮肤的消毒。链脂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^[7]。Fekadu 等^[2]对埃塞俄比亚某医院废水中的细菌对抗生素或消毒剂的抵抗性进行研究,用稀释法证实碘酊是最有效的消毒剂(污水中所有分离的细菌经碘酊处理后均无生长),其次是次氯酸钠(仅芽孢杆菌有生长),而 70% 的乙醇效果最差(多数革兰阴性杆菌、金黄色葡萄球菌表现出抗性)。

2.3 QACs 消毒剂 对 QACs 消毒剂具有抗性的病原微生物较多,包括铜绿假单胞菌、产碱杆菌属、白假丝酵母菌,以及凝固酶阴性葡萄球菌等。对某消毒剂敏感性研究^[8]分析发现,环境中分离的 26 株金黄色葡萄球菌,42% 的菌株 MIC 值 $< 15 \mu\text{g/mL}$,约 58% MIC 值 $> 45 \mu\text{g/mL}$,说明部分菌株对 QACs 消毒剂产生较高的抗性。

2.4 氯己定消毒剂 国内外医院重症监护病房(ICU)普遍选用氯己定进行多重耐药菌去定植,但需警惕对氯己定出现抗性的细菌^[9]。Beier 等^[4]研究的 344 株大肠埃希菌 O157:H7 中,抗氯己定占 57%,可能由于细菌经常暴露于亚致死浓度的消毒剂中,导致对其敏感性降低,产生耐受。Naparstek 等^[10]比较流行性肺炎克雷伯菌克隆株 ST258 和非流行性克隆株对氯己定的敏感性研究发现,肺炎克雷伯菌 ST258 ($n = 70$) 的 MIC 较其他序列菌株 ($n = 56$) 高,99% ST258 MIC $> 32 \text{ mg/mL}$,与其他 52% 肺炎克雷伯菌比较,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.5 含碘消毒剂 对消毒剂抗性进行的两阶段观察研究^[5]发现,第二阶段(1988 年 3—5 月)应用大量聚维酮碘进行消毒,未发现抗聚维酮碘菌株,而此阶段抗消毒剂葡萄糖酸氯己定和苯扎氯胺的菌株较第一阶段大幅减少,研究者推断聚维酮碘是抗药菌减少的重要原因。21 株革兰阴性杆菌对聚维酮碘的抗性研究^[11]发现,1 株铜绿假单胞菌对聚维酮碘的 MIC 高于其他标准菌株,并从该菌株中检测出抗消毒剂基因 *qacE*Δ1-*sul1*,细菌通过此基因获得对消毒剂的抗性。

3 产生抗性的原因与机制

普遍认为消毒剂的不恰当使用是导致细菌产生抗性的重要原因,广泛或不合理使用抗菌药物可产生筛选压力^[12]。若长期使用亚致死浓度的消毒剂,

则易导致细菌对该浓度的消毒剂产生适应效应,最终演变为对消毒剂的抵抗^[13-14]。有学者将消毒剂的抗性分为固有性抗药和获得性抗药。固有性抗药包括由细胞外部细胞层、芽孢和生物膜分别介导的消毒剂抗性,其中生物膜的形成是导致细菌具有抗性的重要因素^[13]。而获得性抗药一方面与基因突变和获得遗传因子(质粒或转座子等)有关;另一方面,细菌细胞膜通透性改变、消毒剂失活和加强外排泵对消毒剂的外排作用,均可使细菌产生不同程度抗性^[15]。López-Alonso 等^[16]用苯扎氯铵选择出对其有抗性的李斯特菌,对李斯特菌进行基因测序,获得的基因组序列有助于研究李斯特菌对消毒剂产生抗性的机制。

3.1 形成生物膜 生物膜的形成诱导细菌对消毒剂产生抗性的观点已被普遍接受^[13]。细菌生物被膜(bacterial biofilm, BF)是由附着于惰性或活性实体表面的细菌,以及由其自身分泌的含水聚合性基质包裹形成被膜状细菌群落,即指细菌黏附于一个物体(或人体组织)表面,通过分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等,将其自身包绕其中而形成的大量高度组织化、系统化的膜样聚合物。细菌形成 BF 的糖被会阻挡消毒剂进入细胞,糖被是一种聚阴离子聚合物,在生物膜中具有离子交换树脂的作用,当置于消毒剂中,糖被会吸收大量的消毒剂分子,使得消毒剂分子的扩散受影响,活性分子不能进入细胞和靶位点作用,从而保护生物膜中细菌免受作用^[17]。

3.2 通过阻挡或外排机制减少消毒剂进入细胞 高表达多药外排泵可以提高细菌对各类抗菌药物的抵抗力^[18],外排泵不仅导致细菌对抗菌药物耐药,也是消毒剂抗性的重要机制。近年来,无论革兰阳性菌还是革兰阴性菌均发现大量的外排泵,外排泵通过泵出胞内消毒剂分子,保护细胞。对细菌进行抗性检测时,抗药菌株几乎均携带外排泵基因,且存在过量表达的现象。*qacA/B* 是微生物对季铵盐产生抗性的最常见基因^[8],*qacE*Δ1 基因由整合子介导,编码膜蛋白型的多药转运蛋白,因在亲脂性消毒剂外排机制中发挥重要作用而得名^[19]。文献^[19]显示,QACs 消毒剂抗药基因包括 *qacA*、*qacB*、*qacC* (*qacD*、*smr*)、*qacE*、*qacE*Δ1、*qacF*、*qacG*、*qacH* 和 *qacJ* 9 种。*qac* 基因家族可表达细菌针对多种化合物的主动外排泵,从而将 QACs、双胍类、碱性染料(孔雀石绿)等消毒剂与防腐剂的化合物排出菌体外而表现出抗性^[20]。Abuzaid 等^[21]为确定细菌对抗菌药物敏感性降低与携带消毒剂抗性基因 *cepA*、

qacD、*qacE* 的关系,以及确认外排泵降低对消毒剂敏感性的作用,对肺炎克雷伯菌及氯己定、苯扎溴铵、氯化物等 5 种消毒剂和 11 种抗菌药物进行研究,结果显示细菌携带外排泵基因 *cepA*、*qacD* 和 *qacE* 与对杀菌剂敏感性降低之间有紧密的关系。Buffet-Bataillon 等^[22]从基因层面研究此种关联,从临床 153 株大肠埃希菌中选出 7 株对抗菌药物具有较高或较低 MIC,通过聚合酶链反应(PCR)证实其含有整合子抗性基因,此基因可编码外排泵 AcrA/TolC 等,最终得出细菌通过 AcrAB - TolC 系统排出环丙沙星和 QACs,从而表现出对抗菌药物的耐药性和对消毒剂的抗性。还发现^[23]李斯特菌具有苯扎氯铵抗性和对抗菌药物敏感性降低,是由于过度表达不同类的多药外排泵(对多种药物有外排作用)。此外,用高浓度消毒剂处理微生物时微生物产生抗性的可能性较低,因为抗性机制通常是暴露在亚致死量的消毒剂浓度时产生^[24]。环境中若持续存在低浓度消毒剂,则可能增加选择出抵抗此种环境压力且维持生存的细菌的风险^[14]。细菌不断进化,产生的新菌株会对消毒剂分子产生抗性。

3.3 表型性抗性 表型性抗性是指某种细菌在特定条件下对消毒剂产生抗性,或在该特定条件下 MIC 上升,一旦离开该条件,便又重新变得对消毒剂敏感的一种形式^[24]。恶劣的生长条件使细菌生长缓慢,代谢速率减低,从而影响消毒剂的作用,表现出抗性。细菌在不利环境下极易形成芽孢,芽孢的结构包括芽孢核心、皮层、芽孢衣和胞外壁。核心由 DNA、RNA 和蛋白质等构成,皮层主要由肽聚糖构成,芽孢衣是一种双层膜结构,主要由蛋白质构成。有学者^[24]发现,芽孢衣对氧化剂,如过氧化氢、臭氧、过亚硝酸盐、二氧化氯和次氯酸盐具有较高抗性,芽孢衣可以阻挡消毒剂分子进入芽孢核心。引起细菌对消毒剂敏感性降低是多因素的,包括通透性降低,生长缓慢,应激反应及其他代谢过程的改变。PCR 检测携带抗药基因的菌株表型可为阴性,而有些菌株表型为阳性,但是相关的抗药基因检测却是阴性,原因可能是所携带的抗性基因未表达^[8]。

4 抗性的影响因素

细菌的存在方式不同,则其对消毒剂的抗性不同。比起浮游菌,物体表面的细菌及形成生物膜者对消毒剂的敏感性大大降低^[25]。临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和铜绿假单胞菌,

经苯扎氯铵、葡萄糖酸氯己定和三氯生 3 种常用灭菌剂处理,其菌悬液的 MBC 均低于规定浓度,使用规定浓度消毒剂不能有效杀灭已形成生物膜的细菌。按照消毒技术规范,在测试消毒剂的消毒效果时只需制备菌悬液进行试验,但实际中消毒剂的杀菌范围不仅针对浮游菌,对物体表面、皮肤、黏膜等消毒时应考虑到其特点和局限性,需要足够的消毒剂浓度和作用时间才能达到有效消毒的标准。Ortiz 等^[23]发现,对苯扎氯铵具有抗性的李斯特菌对其他季胺类和 QACs 化合物,如十四烷基二甲基苄基氯化铵有交叉抗性,说明对一种消毒剂具有抗性,则可能同时对其他同类消毒剂存在抗性。

5 消毒剂抗性与抗菌药物耐药性的关系

文献^[4]报道,微生物消毒剂抗性与抗菌药物耐药性之间存在交互关系。某些情况下,由基因决定的消毒剂抗性可能通过质粒、转座子或整合子等与抗菌药物耐药性进行联系。Soumet 等^[26]将大肠埃希菌暴露于 QACs 后,其 MIC 增加,同时细菌对最初敏感的抗菌药物出现耐药,研究者认为消毒剂导致细菌产生适应性,同时出现对抗菌药物的交叉抗性,最终出现耐药。因此,对消毒剂抗性进行研究也有助于控制耐药菌株的出现。

6 结语

微生物的适应能力很强,科学发展的同时微生物也在不断进化,以适应环境改变,抵御各种灭菌措施。消毒剂带来的副作用亦不容忽视,尽管饮用水中消毒剂可以减少水源性传播的病原菌,但消毒剂使用时会分解产生许多副产物(disinfection by-products, DBPs),如三卤甲烷、卤代乙酸和亚硝胺等。DBPs 已被证实可诱导有机体突变,导致大量耐药微生物的出现^[27]。因此,消毒剂的选择不仅要考虑杀菌效果,还要考虑其分解的副产物、杀菌效果,在使用范围相同的情况下尽量选择分解产物无害和环保的消毒剂,如酸性氧化电位水(electrolyzed oxidizing water, EOW)^[28]。

滥用抗菌药物已严重威胁人类健康,细菌对消毒剂产生抗性也应给予足够重视,加强医院感染预防,规范消毒剂使用标准,包括各类消毒剂对不同对象能达到有效消毒的浓度及时间;对医护人员进行消毒剂相关知识的培训,包括消毒剂的作用机制、优

缺点、使用范围、剂量及作用时间等,避免使用亚致死剂量造成具有抗性的细菌得以存活;同时,减少使用已出现抗性的消毒剂,综合其安全性、有效性和环保性选择最适者。

[参 考 文 献]

- [1] da Silva Fernandes M, Kabuki DY, Kuaye AY. Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures[J]. Int J Food Microbiol, 2015, 200: 97–103.
- [2] Fekadu S, Merid Y, Beyene H, et al. Assessment of antibiotic- and disinfectant-resistant bacteria in hospital wastewater, south Ethiopia: a cross-sectional study[J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(2): 149–156.
- [3] 常帅. 医院感染病原菌对消毒剂耐药性的研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(5): 450–455.
- [4] Beier RC, Poole TL, Brichta-Harhay DM, et al. Disinfectant and antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* O157: H7 strains from cattle carcasses, feces, and hides and ground beef from the United States [J]. J Food Prot, 2013, 76(1): 6–17.
- [5] Shiraishi T, Nakagawa Y. Review of disinfectant susceptibility of bacteria isolated in hospital to commonly used disinfectants [J]. Postgrad Med J, 1993, 69(3): S70–S77.
- [6] De Groote MA, Gibbs S, de Moura VC, et al. Analysis of a panel of rapidly growing mycobacteria for resistance to aldehyde-based disinfectants[J]. Am J Infect Control, 2014, 42(8): 932–934.
- [7] 骆园园, 张玲, 王厚照. 鲍氏不动杆菌对常用消毒剂抗性的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1159–1161.
- [8] 张宏梅, 刘学禄, 李发俊, 等. 公共消毒环境中金黄色葡萄球菌对季铵盐类消毒剂抗性研究[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(3): 224–226.
- [9] Landelle C, Marimuthu K, Harbarth S. Infection control measures to decrease the burden of antimicrobial resistance in the critical care setting[J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20(5): 499–506.
- [10] Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, et al. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Hosp Infect, 2012, 81(1): 15–19.
- [11] 王晓蕾, 吴晓松, 谈智, 等. 三种革兰阴性杆菌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.
- [12] Langsrud S, Sundheim G, Borgmann-Strahsen R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas spp.* [J]. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 874–882.
- [13] Bridier A, Briandet R, Thomas V, et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review [J]. Biofouling, 2011, 27(9): 1017–1032.
- [14] Lavilla Lerma L, Benomar N, Casado Muñoz Mdel C, et al. Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas spp.* isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production[J]. Food Microbiol, 2015, 51(5): 33–44.
- [15] 卢中一, 陈勇, 陈伟, 等. 金黄色葡萄球菌对消毒剂的抗性及其流行病学研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13(7): 442–446.
- [16] López-Alonso V, Ortiz S, Martínez-Suárez JV. Genome sequences of five disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two Iberian pork-processing plants [J]. Genome Announc, 2015, 3(2): pii: e00077–15.
- [17] 刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 271–278.
- [18] Ogawa W, Onishi M, Ni R, et al. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae* [J]. Gene, 2012, 498(2): 177–182.
- [19] 雷新云, 金正江. 消毒剂耐药基因 *qacEΔ1* 对新生儿科常见革兰阴性菌耐药性的影响[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(1): 20–22, 34.
- [20] 何晓锋, 刘芳, 曹晋桂, 等. 多重耐药革兰阴性杆菌耐消毒剂基因 *qacEΔ1-sul1* 监测[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(2): 97–99.
- [21] Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SG. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacEΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance [J]. J Hosp Infect, 2012, 81(2): 87–91.
- [22] Buffet-Bataillon S, Le Jeune A, Le Gall-David S, et al. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(12): 2837–2842.
- [23] Ortiz S, López V, Martínez-Suárez JV. The influence of sub-minimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* [J]. Int J Food Microbiol, 2014, 189: 106–112.
- [24] 吴清平, 李飞, 张菊梅. 细菌对消毒剂抗性机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1249–1256.
- [25] Otter JA, Vickery K, Walker JT, et al. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection [J]. J Hosp Infect, 2015, 89(1): 16–27.
- [26] 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.
- [27] Lv L, Jiang T, Zhang S, et al. Exposure to mutagenic disinfection byproducts leads to increase of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Environ Sci Technol, 2014, 48(14): 8188–8195.
- [28] Kubota A, Goda T, Tsuru T, et al. Efficacy and safety of strong acid electrolyzed water for peritoneal lavage to prevent surgical site infection in patients with perforated appendicitis [J]. Surg Today, 2015, 45(7): 876–879.