

12种实验室保存菌种对常用消毒剂的抗性分析

吴 静*(福建卫生职业技术学院医学技术系,福州 350101)

中图分类号 R187*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1943-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.08

摘要 目的:了解本实验室所存菌种对常用消毒剂的抗性,从而合理使用消毒剂,避免实验室感染。方法:采用悬液定量杀菌试验分别测定75%乙醇、3%过氧化氢、碘伏和533消毒液对12种实验室保存菌种的平均杀灭对数值,采用K-B纸片法测定碘伏和533消毒液对12种菌种及其标准株的最低抑菌浓度(MICs)。结果:碘伏作用1 min时对12种菌种的杀灭对数值均>5.00;而533消毒液需作用8 min、75%乙醇和3%过氧化氢需作用40~50 min才能达到同样效果。碘伏和533消毒液对12种菌种的MICs分别为37.2~173.6、548~1 307 mg/L,其中533消毒液对12种菌种均表现出比标准株更高的MICs。结论:12种菌种对碘伏均未产生抗性,部分菌种对75%乙醇、3%过氧化氢和533消毒液产生抗性,说明应根据不同的消毒对象选择不同的消毒剂,且配制准确的浓度,才能达到良好的消毒效果。

关键词 消毒剂;悬液定量杀菌试验;K-B纸片法;杀灭对数值

Analysis of Resistance to Common Disinfectants of 12 Kinds of Laboratory Stored Strains

WU Jing(Dept. of Medical Technology, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To detect the resistance to common disinfectants of 12 kinds of laboratory stored strains in our laboratory so as to use disinfectants rationally and avoid laboratory infection. METHODS: Suspension quantitative germicidal test was used to determine average germicidal logarithmic value of 75% ethanol, 3% H₂O₂, iodophor and "533" disinfectants to 12 kinds of laboratory stored strains. K-B method was applied to test the minimal inhibitory concentrations (MICs) of iodophor and 533 disinfectants to 12 kinds of laboratory stored strains and standard strains. RESULTS: The average germicidal logarithm values of iodophor in 1 min were above 5.00, so did by "533" disinfectants in 8 min, 3% H₂O₂ and 75% alcohol in 40-50 min. MICs of iodophor and "533" disinfectant to 12 kinds of strains were 37.2-173.6 mg/L and 548-1 307 mg/L, respectively. "533" disinfectants have higher MICs value to 12 kinds of strains, compare with standard strains. CONCLUSIONS: 12 kinds of strains have no resistant to iodophor, while some strains are resistant to 75% ethanol, 3% H₂O₂ and "533" disinfectants. The disinfectants should be selected according to different objects, and sound disinfection effect can be achieved by accurate concentration.

KEYWORDS Disinfectants; Suspension quantitative germicidal test; K-B method; Germicidal logarithm values

我院微生物实验室(BSL-2)承担着全院医学检验技术专业微生物检验的全部教学任务,所存菌种均为第三类病原微生物(参见原卫生部2006年发布的《人间传染的病原微生物名录》)。作为教学的菌株对人体有一定的致病性,因此每次实验后环境及手部的消毒极为关键。细菌对消毒剂的抗性问

近年来逐渐成为热点^[1],消毒剂的滥用、用量不足或处理方法不当等是细菌对消毒剂产生抗性的主要原因^[2]。但目前报道都集中于临床菌株对消毒剂抗性的研究,而实验室所存菌种经长期保存及传代后,对常用消毒剂的抗性如何未见报道。为了解实验室所存菌种对常用消毒剂的敏感性,本文就本实

tion modulates cortical TLR4/NF- κ B signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in male rats[J]. *Mediators Inflamm*, 2011; 848-309.

[6] Vaglio A, Palmisano A, Alberici F, et al. Prednisone versus tamoxifen in patients with idiopathic retroperitoneal fibrosis: an open-label randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2011, 378(9788): 338.

[7] Cuzick J, Sestak I, Baum M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast

cancer: 10-year analysis of the ATAC trial[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(12): 1135.

[8] Goetz MP, Schaid DJ, Wickerham DL, et al. Evaluation of CYP2D6 and efficacy of tamoxifen and raloxifene in women treated for breast cancer chemoprevention: results from the NSABP P1 and P2 clinical trials[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6944.

[9] Sestak I, Distler W, Forbes JF, et al. Effect of body mass index on recurrences in tamoxifen and anastrozole treated women: an exploratory analysis from the ATAC trial[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(21): 3411.

(收稿日期:2013-11-19 修回日期:2014-02-22)

* 副教授, 硕士。研究方向:病原微生物。E-mail: 693401983@qq.com

实验室所存 12 种菌种对常用消毒剂的抗性进行了研究,以达到正确合理使用消毒剂,从而预防和控制实验室感染的目的。

1 材料

1.1 菌株

试验菌株为我院微生物实验室所存菌种,每种 3 株,共 12 种 36 株,分别为金黄色葡萄球菌(Sau)、乙型溶血性链球菌(She)、肺炎链球菌(Spn)、大肠埃希菌(Eco)、乙型副伤寒沙门菌(Sen)、甲型副伤寒沙门菌(Spa)、福氏志贺菌(Sfl)、宋内志贺菌(Sso)、普通变形杆菌(Pvu)、肺炎克雷伯菌(Kpn)、铜绿假单胞菌(Pau)、鲍曼不动杆菌(Aba)(以下表中均用缩写表示),以上所存菌种均来自我院所属教学医院:福建省妇幼保健院、协和医院及福建医科大学附属第一医院;标准株为金黄色葡萄球菌(ATCC 29223)、乙型溶血性链球菌(ATCC 21059)、肺炎链球菌(ATCC 49619)、大肠埃希菌(CMCC 44102)、乙型副伤寒沙门菌(CMCC 50094)、甲型副伤寒沙门菌(CMCC 500011)、福氏志贺菌(CMCC 51572)、宋内志贺菌(CMCC 51592)、普通变形杆菌(CMCC 49027)、肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)、铜绿假单胞菌(CMCC 10101)、鲍曼不动杆菌(ACCC 401122),均由福建疾控中心提供;细菌接种与杀灭试验均在 BSL-2 实验室的生物安全柜中进行。

1.2 消毒剂

碘伏原液(批号:121119B,含碘量:4 500 mg/L)和 75%乙醇原液(批号:121221)均购自山东利尔康消毒科技有限公司;3%过氧化氢原液(江西健宝医药科技有限公司,批号:130105B);“佳灵牌”533 消毒液(福州市消毒站,批号:130305,原液含氯量:5.6%,试验时用无菌蒸馏水稀释 120 倍使用)。

1.3 培养基

营养琼脂培养基(杭州天和生物有限公司)。

2 方法与结果

2.1 菌悬液配备

乙型溶血性链球菌和肺炎链球菌接种于血平板经 37 °C CO₂培养 48 h;其余菌种接种于营养琼脂培养基,经 37 °C 培养 24 h。以 1% 蛋白胨磷酸盐缓冲液(PBS)将菌液稀释为含菌浓度为 10⁶~10⁷ CFU/ml 备用,洗下菌苔制成菌悬液备用。

2.2 中和剂的选择

按《消毒技术规范》2002 年版进行中和剂鉴定试验^[3],碘伏的中和剂为 0.5% 硫代硫酸钠+1% 卵磷脂+1% 聚山梨酯^[4];75% 乙醇的中和剂为 5.0% 聚山梨酯 80;533 消毒液的中和剂为 1.0% 硫代硫酸钠^[5];3% 过氧化氢的中和剂为 20 g/L 硫代硫酸钠^[6]。

2.3 悬液定量杀菌试验^[7-8]

将消毒剂和实验菌种置于(20±1) °C 水浴恒温。吸取 0.1 ml 细菌悬液注入 4.0 ml 消毒剂中,迅速混匀并计时。根据预试验结果确定,碘伏作用 1、3、5 min,乙醇作用 15、30、45 min,过氧化氢作用 30、40、50 min,533 消毒液作用 5、8、12 min,分别吸取 0.5 ml 混合液加于 4.5 ml 中和剂中混匀,中和 10 min 后,倾注平板法计数残存活菌(以菌落数在 15~300 CFU 的平板为准),平行 2 份,计算各组的活菌浓度(CFU/ml),并换算为对数值(N)。同时以 PBS 代替消毒剂作阳性对照组,计算杀灭对数值(KL)=阳性对照组活菌浓度的对数值(N₀)-试验组活菌浓度的对数值(N_t),试验重复 3 次,各次试验杀灭对数值 ≥5.00 为消毒合格^[9]。4 种常用消毒剂对 12 种菌种的杀灭效果

见表 1~表 4。

表 1 4 500 mg/L 碘伏作用不同时间对 12 种菌种的杀灭效果

Tab 1 Germicidal effect of iodophor on 12 kinds of strains

作用时间, min	实验菌种平均杀灭对数值(KL)											
	Sau	She	Spn	Eco	Sen	Spa	Sfl	Sso	Pvu	Kpn	Pau	Aba
1	5.12	5.59	5.67	5.21	5.43	5.35	5.39	5.26	5.19	5.26	5.24	5.08
3	6.61	6.81	6.87	6.73	6.86	6.87	6.84	6.76	6.63	6.93	6.98	6.91
5	7.03	>7.43	>7.43	7.08	>7.43	7.12	7.10	>7.43	7.05	>7.43	>7.43	7.23

注:阳性对照组对数值为 7.43

note: the value of positive control group is 7.43

表 2 75%乙醇作用不同时间对 12 种菌种的杀灭效果

Tab 2 Germicidal effect of 75% ethanol on 12 kinds of strains

作用时间, min	实验菌种平均杀灭对数值(KL)											
	Sau	She	Spn	Eco	Sen	Spa	Sfl	Sso	Pvu	Kpn	Pau	Aba
15	2.15	5.23	5.26	3.22	3.87	3.89	4.09	4.16	3.57	3.35	2.12	3.73
30	4.52	5.82	5.94	4.83	5.56	5.56	5.71	5.98	5.86	5.23	4.73	5.96
45	6.87	>7.32	>7.32	6.93	7.12	6.91	>7.32	>7.32	6.73	6.65	6.91	6.78

注:阳性对照组对数值为 7.32

note: the value of positive control group is 7.32

表 3 3%过氧化氢作用不同时间对 12 种菌种的杀灭效果

Tab 3 Germicidal effect of 3% H₂O₂ on 12 kinds of strains

作用时间, min	实验菌种平均杀灭对数值(KL)											
	Sau	She	Spn	Eco	Sen	Spa	Sfl	Sso	Pvu	Kpn	Pau	Aba
30	4.55	5.34	5.22	4.57	5.35	5.22	5.21	5.11	4.57	5.15	5.19	4.26
40	5.53	6.85	6.91	6.82	6.96	6.56	6.47	6.39	6.82	6.26	6.31	6.58
50	7.35	>7.35	>7.35	7.15	>7.35	>7.35	>7.35	>7.35	7.18	>7.35	>7.35	>7.35

注:阳性对照组对数值为 7.35

note: the value of positive control group is 7.35

表 4 533 消毒液作用不同时间对 12 种菌种的杀灭效果

Tab 4 Germicidal effect of 533 disinfectants on 12 kinds of strains

作用时间, min	实验菌种平均杀灭对数值(KL)											
	Sau	She	Spn	Eco	Sen	Spa	Sfl	Sso	Pvu	Kpn	Pau	Aba
5	4.87	5.46	5.39	4.78	5.32	5.36	5.32	5.16	5.23	5.21	4.69	5.21
8	5.82	6.58	6.53	5.91	6.85	6.84	6.71	6.76	6.83	6.38	6.55	6.19
12	7.28	>7.41	>7.41	7.21	>7.41	>7.41	>7.41	>7.41	7.26	>7.41	>7.41	>7.41

注:阳性对照组对数值为 7.41

note: the value of positive control group is 7.41

由表 1 可知,4 500 mg/L 碘伏作用 1 min 对 12 种实验菌种的杀灭对数值均 >5.00,表明达到消毒效果;若延长消毒时间至 3~5 min 则消毒效果更佳。

由表 2 可知,75%乙醇作用 15 min 对除乙型溶血性链球菌和肺炎链球菌外的其他 10 种菌种均未达到消毒效果(杀灭对数值 <5.00);只有延长消毒时间至 45 min,才能对 12 种菌种都起到消毒效果;而若是作用 30 min,则仍对部分菌株无消毒效果。

由表 3 可知,3%过氧化氢作用 30 min 对除金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌外的 8 种菌种都有消毒效果;当作用时间延长至 40 min 才能对 12 种菌种都起到消毒效果。

由表 4 可知,45.7 mg/L 533 消毒液作用 5 min 对除金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌外的 9 种菌种都有消毒效果;当作用时间延长 8 min 才能对 12 种菌种都起到消毒效果。

2.4 消毒剂抗性最低抑菌浓度(MICs)测定

由于75%乙醇和3%过氧化氢的消毒时间较长,因此短时间内杀灭病原菌不能使用二者。故测定消毒剂抗性MICs时仅考察了碘伏和533消毒液。采用K-B纸片法,取各稀释度碘伏和533消毒液各2.5 ml,加入至2.5 ml灭菌双倍浓度培养液中,每管接种菌液0.1 ml($10^6 \sim 10^7$ CFU/ml),混匀作为试验组;同时设置阳性对照(培养液接种菌液不加消毒剂)和阴性对照(培养液中不加消毒剂及菌液)。置于37℃培养48 h,观察当阳性对照管混浊(有细菌生长)、阴性对照管透明(无细菌生长)且试验组以完全无细菌生长时的最高稀释浓度为对应消毒剂的MICs^[2-9]。碘伏和533消毒液对12种菌种及其标准株的MICs见表5。

表5 碘伏和533消毒液对12种菌种及其标准株的MICs (mg/L)

Tab 5 MICs of iodophor and 533 disinfectants on 12 kinds of strains and standard strains (mg/L)

实验菌种/标准株	消毒剂	
	碘伏	533消毒液
Sau/ATCC 29223	50.5/47.2	952/610
She/ATCC 21059	39.6/39.7	526/426
Spn/ATCC 49619	37.2/38.2	548/432
Eco/CMCC 44102	173.6/163.7	1307/653
Sen/CMCC 50094	87.1/87.6	670/521
Spa/CMCC 500011	90.8/90.8	714/547
Slf/CMCC 51592	79.4/78.7	691/532
Sso/CMCC 51572	80.1/80.6	706/539
Kpn/CMCC 49027	101.7/101.7	983/575
Pvu/ATCC 700603	106.2/98.4	971/562
Pau/CMCC 10101	162.5/158.3	1126/593
Aba/ACCC 401122	156.7/127.2	991/599

由表5可知,碘伏对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、福氏志贺菌、肺炎克雷伯菌、普通变形杆菌、绿脓杆菌、鲍曼不动杆菌等菌种的MICs均高于标准菌株;而对于533消毒液则所有实验室菌种的MICs均高于标准菌株。

3 讨论

本研究4种消毒剂为本实验室常备消毒剂,都可用于皮肤的消毒。碘伏是目前“三甲”医院常用消毒剂,是单质碘与聚乙烯吡咯酮的不定型结合物,具有广谱消毒作用。由试验结果可知,4种常用消毒剂中碘伏效果最佳,在常用剂量及消毒时间(1 min)内碘伏对12种实验菌种都有消毒作用,目前12种菌种对碘伏尚未产生抗性。

533消毒液是一种含氯消毒剂,可用于各种器具的消毒,也可用于消毒皮肤、瓜果蔬菜等。其保质期夏季为3个月,冬季为6个月,本次实验在其有效期范围内。本实验室常用剂量为市售商品120倍稀释(有效氯45.7 mg/L),用于学生实验结束后手部的消毒。试验结果可知,若要对所有菌种都起到消毒作用,则消毒时间需延长至8 min左右,其消毒效果比碘伏差。

75%乙醇和3%过氧化氢消毒效果位于最末,一些菌株(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌)对二者有较强的抗性,若要达到一定的消毒效果则消毒时间都要延长至40~50 min,因此要在较短时间内杀灭病原菌不能使用75%乙醇和3%过氧化氢。

由K-B纸片法测出的MICs可知对碘伏的抗性依次为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、普通变形杆菌、肺炎克雷伯菌;对533消毒液抗性最强的也是这几种细菌,这些都是革兰阴性(G⁻)杆菌。而通过实验室所存菌种与标准株的MICs比较,可看出12种实验菌种的MICs均高于标准株,这与含氯消毒剂早已被广泛应用于医院环境消毒,而我院所存菌种均来自于临床有关。通过试验发现K-B纸片法无法检测75%乙醇和3%过氧化氢的抗性,因这两种消毒剂经稀释后浓度降低失去作用。

细菌对消毒剂的抗性是指菌株对消毒剂的常用浓度不敏感,也指那些在能杀灭或抑制绝大部分该种细菌的消毒剂浓度下,出现不能被杀灭或抑制的菌株。近年来,随着多种皮肤消毒剂被广泛应用于临床,医院均存在依赖消毒剂、甚至滥用消毒剂的现象,细菌对消毒剂的耐药现象也逐渐增多,引起了专家的重视。但细菌对消毒剂的抗性目前还没有判断标准^[10],目前尚无特定的消毒剂抗性测定方法,常用的两种方法是测定消毒剂对该细菌的MICs和悬液定量杀菌试验^[8]。

由于不同菌种对不同消毒剂敏感程度不一样,为达到理想的消毒效果,实验室应根据不同的消毒对象选择不同的消毒剂;使用时严格按产品说明书配制和使用,且配制准确的浓度^[11],这样才能达到良好的消毒效果,避免实验室感染。

参考文献

- [1] 戎毅,王晓蕾,徐燕,等.14株临床分离铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌对碘伏抗性的监测结果[J].江苏卫生保健,2009,11(5):9.
- [2] 马明,林莉莉,诸绪娴,等.两种常见病原菌对多种消毒剂的抗药性[J].中国临床药理学杂志,2013,29(1):22.
- [3] 卫生部卫生法制与监督司.消毒技术规范[S].2002.
- [4] 唐毅,萧晨路,李和姐,等.安尔碘皮肤消毒剂对常见耐药细菌的体外杀菌试验[J].中华医院感染学杂志,2011,21(4):722.
- [5] 宋波,刘颀,吕丽艳.金黄色葡萄球菌对碘伏、乙醇、高铁酸钾和紫外线的抗性[J].中国微生物学杂志,2010,22(4):360.
- [6] 杨洪,高文凤,刘衡川.过氧化氢消毒液的中和剂筛选试验研究[J].中国消毒学杂志,2010,27(2):132.
- [7] 高文凤,曹冉冉,刘衡川.3种消毒剂对金黄色葡萄球菌杀灭效果的比较[J].现代预防医学,2012,39(4):977.
- [8] 陈越英,吴晓松,徐燕,等.几种常见微生物对酚类消毒剂抗力研究[J].现代预防医学,2012,39(9):2240.
- [9] 沈波,许琴芬,孙维敏,等.医院感染多药耐药菌对消毒剂抗性的分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(10):2048.
- [10] 周凤莲,杨莉娜,余阳,等.常用消毒剂对临床分离多重耐药铜绿假单胞菌的杀灭效果[J].中国消毒学杂志,2010,27(3):250.
- [11] 高伟,刘志敏,冯忠军,等.化学消毒剂使用中存在的问题及对策[J].中华医院感染学杂志,2010,20(1):69.

(收稿日期:2013-08-21 修回日期:2013-09-22)