

【护 理】

应用宏基因组测序技术评估临床医护人员 手卫生方法的效果

曾泱 蔡丹 邓玲 胡娟 徐红英*

江西省妇幼保健院

摘要:目的 基于宏基因组测序技术深入评估临床医护手卫生效果, 分组比对不同手卫生方法对医护人员手部菌群组成、多样性及条件致病菌分布的影响。方法 采用随机抽样法, 将接触过患者的51名医护人员分为三组, 对照组(接触患者后未洗手即刻采样, $n=18$)、六步洗手法组(遵循《医务人员手卫生规范》WS/T 313-2019, $n=18$)和速干消毒剂组(使用含醇手消毒剂, $n=15$)。采集手部微生物样本, 通过宏基因组测序技术重点分析手部菌群组成、条件致病菌丰度及菌群多样性差异, 并采用SPSS 26.0进行统计学分析。结果 所有送检样本中均检测到正常菌群、条件致病菌及致病菌, 但各组间菌群丰度存在显著差异($P < 0.05$)。六步洗手法组对 *Cutibacterium acnes* 和 *Malassezia restricta* 的清除率优于速干型手消毒剂组($P < 0.05$); 对照组的Beta多样性和Alpha多样性最高, 组间多样性虽无统计学差异, 但存在一定趋势。结论 宏基因组测序技术能够更全面的揭示手卫生措施对医护人员手部微生物群落的影响, 规范的手卫生实践可有效降低致病菌载量, 优化菌群结构, 从而降低医院感染风险。

关键词: 宏基因组测序技术; 医院感染; 手卫生; 微生物群落

DOI: 10.65976/3078-8137.2025.12.006

医院感染是全球公共卫生和医疗质量安全领域重大的挑战。据统计, 全世界医院感染发生率占住院患者的5%~10%, 每年我国大约有7.5万例患者死于院内感染, 严重威胁患者生命安全并加重医疗负担^[1]。因此, 预防和控制院内感染是提高医疗质量、保障患者和医务人员健康的重要任务。

在从事临床活动过程中, 医护人员双手是接触病人或带污染物品最频繁的部位, 是导致院内感染的重要媒介^[2]。在所有医院感染中, 30%以上的院内感染是医护人员通过手传播造成的, 手的微生物污染是引发医院感染的重要因素之一^[3]。手卫生直接关系到患者安全, 是保障医疗安全和医疗质量控制中的重点环节。提高医务人员手卫生执行率及合格率, 对预防和控制医院感染有重要意义。多项研究表明, 加强对医务人员手卫生培训, 定期对医务人员手卫生合格率进行监测, 可以促进医务人员对手卫生的认识, 提高手卫生依从性和合格率, 达到降低医院感染发生^[4-5]。

宏基因组测序技术(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)是微生物组研究领域一项重要的突破技术, 由Handelsman等学者于1998年首次提出并命名^[6]。该技术通过直接提取环境微生物总DNA, 基于二代测序平台(Next Generation Sequencing, NGS)无需传统微生物分离培养即可全面解析样本中的基因组信息, 具有高灵敏检测能力, 全谱系病原覆盖能力及对未知病原体识别潜力, 单次实验即可完成复杂微生物群落分析等核心优势^[7]。在临床应用方面, mNGS技术通过直接检测临床样本微生物核酸, 实现感染病原体精准诊断^[8]。目前该技术已被《中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识》列为疑难、危重及新发传染病的首选分子诊断工具, 成为感染性疾病诊疗的关键技术支撑^[9]。

2020年国家卫生健康委员会正式实施的《医务人员手卫生规范》(WS/T 313-2019)^[10]。该规范不仅细

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划一般项目(项目编号: SKJP220201353)。

作者简介: 曾泱(1994—), 女, 本科, 研究实习生, 研究方向为基础医学方面。

通讯作者: 徐红英, 主任护师。

化了“六步洗手”中手部揉搓的技术要求，还创新性规定了医疗机构各部门在手卫生管理中的职责分工，并新增了手卫生效果检测的涂抹培养方法细则^[11]。然而，现行的菌落计数监测法仍存在明显的局限性。首先，采样过程存在选择偏倚，观察者的主观判断易致霍桑效应和观察者偏倚；其次，传统的培养方法仅识别可培养微生物，无法识别尚未形成菌落的潜在病原体，其中可能包含高致病性的微生物；再则，现有研究多侧重菌落计数，缺乏菌群基因组解析，致使对医务人员手部微生物携带的耐药基因、毒力因子等生物信息仍存认知盲区。

本研究拟采用宏基因组测序技术深入分析不同手卫生干预措施下医护人员手部潜在致病菌谱与总微生物群落的差异性特征。通过结合高通量测序平台、高性能计算分析系统以及特异性病原微生物核酸检测技术，比较不同手卫生干预措施下医护人员手部潜在致病菌谱与总微生物群落的差异性特征。研究旨在明确医护人员手部微生物特征，提升对未知致病微生物的认知，建立手卫生效果评价体系，以数据支撑医务人员对手卫生重要性的科学认识，提升临床医护人员手卫生依从性，优化感染防控策略，从而有效降低医院感染发生率。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究于2022年12月至2023年3月，采用随机抽样法纳入江西省妇幼保健院接触过患者的医护人员51例。纳入符合以下纳入标准的临床医护人员：（1）在本院工作满1年以上；（2）直接参与患者诊疗活动；（3）自愿参加本研究并签署知情同意书；（4）无严重皮肤疾病；（5）研究期间未使用抗生素。排除标准：（1）手部有明显伤口或感染；（2）对酒精或氯己定过敏；（3）研究期间因病假、休假等原因无法完成全程研究。通过随机数字表法，将受试者随机分为对照组（ $n=18$ ）、干预1组（ $n=18$ ）及干预2组（ $n=15$ ），三组人员均接受正规临床职业防护培训。

1.2 研究分组

三组医务人员在接触患者后分别采取六步洗手、手卫生消毒、接触患者后未洗手的方式，对其手卫生效果进行宏基因组测序分析。对照组：医护人员在接触患者后不进行任何手卫生处理，立即进行手部微生物采样。干预1组（六步洗手法组）：医护人员在接

触患者后，按照《医务人员手卫生规范》（WS/T 313-2019）推荐的六步洗手法进行手部清洁。第一步，掌心相对，手指并拢相互揉搓；第二步，手心对手背沿指缝相互揉搓，交换进行；第三步，掌心相对，双手交叉指缝相互揉搓；第四步，弯曲手指使关节在另一手掌心旋转揉搓，交换进行；第五步，一手握另一手大拇指旋转揉搓，交换进行；第六步，将五个指尖并拢放在另一手掌心旋转揉搓，交换进行。洗手时间不少于40s，使用流动水和洗手液。干预2组（速干消毒剂组）：医护人员在接触患者后，使用含75%乙醇和0.5%葡萄糖酸氯己定的速干手消毒剂进行手部消毒。取2~3ml消毒剂于掌心，按照六步洗手法的揉搓步骤进行揉搓，直至手部完全干燥，揉搓时间不少于20s。

1.3 标本的收集保存和处理

1.3.1 手部微生物收集

采用改良的WHO手部微生物采样方法。采样前，用无菌生理盐水湿润无菌棉签。采样时，采样者戴无菌手套，将湿润的棉签在受试者双手手指屈面、掌心、手背等区域往返擦拭，每个区域擦拭30s，确保覆盖整个手部表面，采样面积约为40cm²。将采样后的棉签放入含有5ml无菌生理盐水的采样管中，充分振荡1min，然后将棉签在管壁上挤压后丢弃。采样管密封后立即送往实验室进行处理，10000rpm离心15min，丢弃上清，收集管底微生物，并保存于-80°的环境中，以备下一步对DNA进行提取。

1.3.2 样本处理

（1）DNA提取：使用TIANampMicro DNA Kit（DP316，TIANGEN BIOTECH，Beijing，China）试剂盒提取高质量基因组DNA，通过酶标仪测定浓度；（2）DNA片段化：取1ug基因组DNA，使用Covaris M220超声波破碎仪（Covaris,USA）进行片段化；（3）片段大小选择：采用AMPure Xp磁珠（Beckman Coulter,USA）筛选200~400bp左右的片段化DNA条带；（4）末端修复、加A尾及接头连接：修复双链cDNA末端，在3'末端加上A碱基，使接头与DNA连接；（5）pCR反应及产物回收：对连接产物进行扩增，扩增产物用磁珠进行纯化回收；（6）产物环化：单链环化反应后消化线性DNA；（7）质控测序：Qubit质检合格文库，经标准化混合后，在MGISEQ-2000测序平台（华大智造，中国）采用pE150双端测序策略完成测序^[12]。见图1。

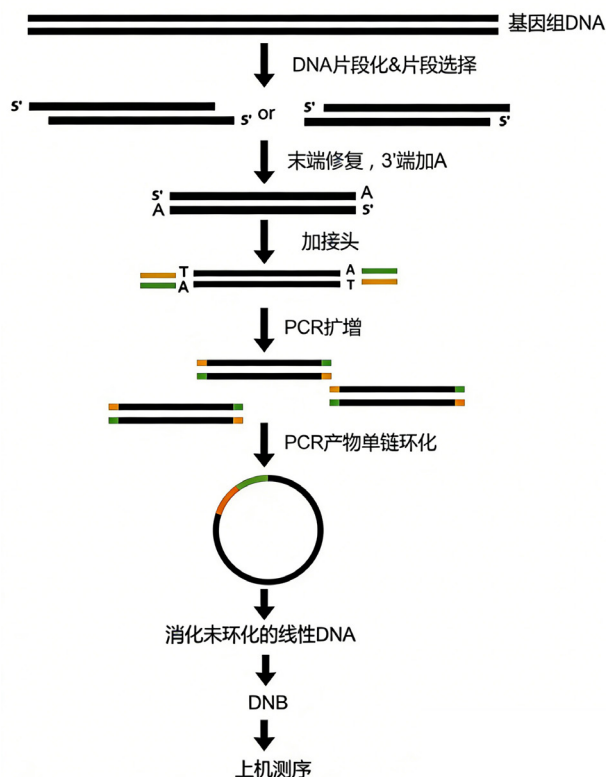


图1 华大平台文库构建步骤示意图

1.4 生物信息学分析

(1) 原始数据质控: 使用 FastQC 软件对原始测序数据进行质量评估, 去除低质量 reads ($Q20 < 80\%$) 和接头序列。(2) 序列比对: 使用 Bowtie2 软件将质控后的 reads 比对到人类参考基因组 (GRCh38), 去除人类宿主序列。(3) 物种注释: 使用 Kraken2 软件结合 RefSeq 数据库对非人类序列进行物种注释,

获得每个样本的物种组成信息。(4) Alpha 多样性分析: 计算 Chao1 指数 (物种丰富度)、Simpson 指数和 Shannon 指数 (物种多样性)。(5) Beta 多样性分析: 基于 Bray-Curtis 距离矩阵进行主坐标分析 (PCoA), 使用 PERMANOVA 检验组间差异。

1.5 统计学分析

通过宏基因组测序分析, 比较 3 组医护人员手部潜在致病菌和总微生物种类的差异性, 采用 SPSS 统计软件 (26.0 版) 进行数据统计分析。实验组与对照组之间的差异比较采用独立样本的 t 检验和邓肯氏 (Duncan) 多重比较检验, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 手部微生物群落组成及不同手卫生方法消毒的菌种残留情况

通过宏基因组测序分析, 在所有 151 个样本中共检测到 23 个门、45 个纲、89 个目、156 个科、312 个属的微生物。其中细菌占 97.3%, 真菌占 2.6%, 病毒占 0.1%。对照组与两种干预组在病原菌残留量上呈现显著差异。(1) 痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*): 残留量呈梯度下降趋势, 对照组显著高于干预 2 组 ($P < 0.05$), 干预 2 组又高于干预 1 组 ($P < 0.01$), 提示六步洗手法对清除该菌效果最优;(2) 限制性马拉色菌 (*Malassezia restricta*): 残留量分布与痤疮丙酸杆菌一致 (对照组 $>$ 干预 2 组 $>$ 干预 1 组), 且组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); (3) 革兰氏阳性杆菌、革兰氏阴性杆菌、链球菌及葡萄球菌及少量机会致病菌——肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella*

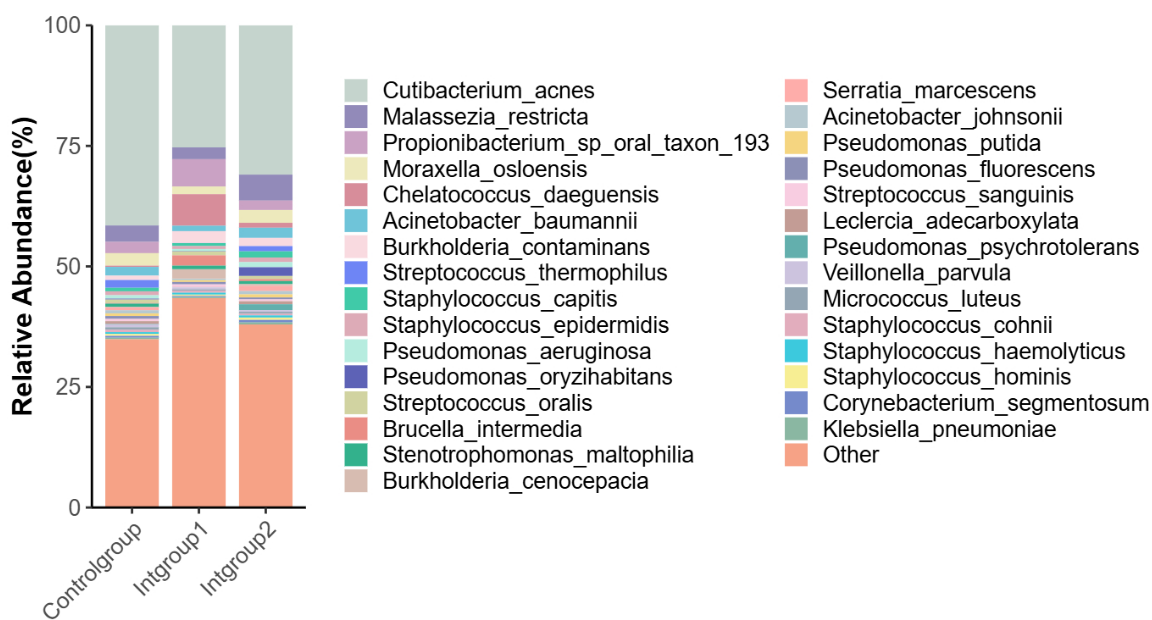


图2 不同手卫生方法消毒手部物种丰度柱状堆叠图

pneumoniae) 在各组中均有残留, 干预组整体丰度较对照组相对稍有降低但不明显, 表明规范手卫生可有效阻断院内感染潜在风险。见图 2。

2.3 不同手卫生方法消毒的 Beta 多样性分析

主坐标分析结果显示, 三组样本在 PCoA 图上形成了明显的聚类, 表明不同手卫生方法对微生物群落结构产生了显著影响。物种 Beta 多样性无统计学显著差异 ($P=0.092$), 但数据呈现趋势性。对照组的 Beta 多样性最高, 其次是干预 2 组, 而干预 1 组的 Beta 多样性最低。这一趋势提示, 手卫生干预措施可能影响菌群调控, 尤以六步洗手法效果更显著。见图 3。

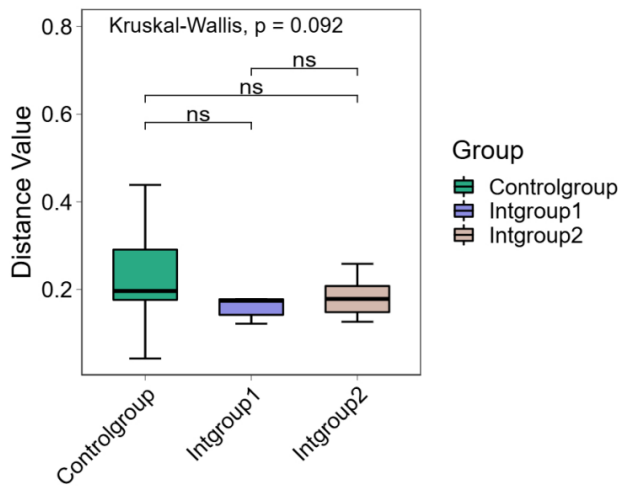


图 3 不同手卫生方法消毒的物种 Beta 多样性箱线图

2.4 不同物种之间 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析中观察得出以下特征: (1) Chao1 指数组间趋势未达到显著差异 ($P=0.072$), 但呈梯度递减趋势, 手卫生措施可能通过降低菌群的丰度来影响微生物的组成。(2) Simpson 指数 ($p=0.046$, $p < 0.05$) 和 Shannon 指数 ($p=0.04$, $p < 0.05$) 表明对照组物种多样性显著高于两组干预组, 提示手卫生

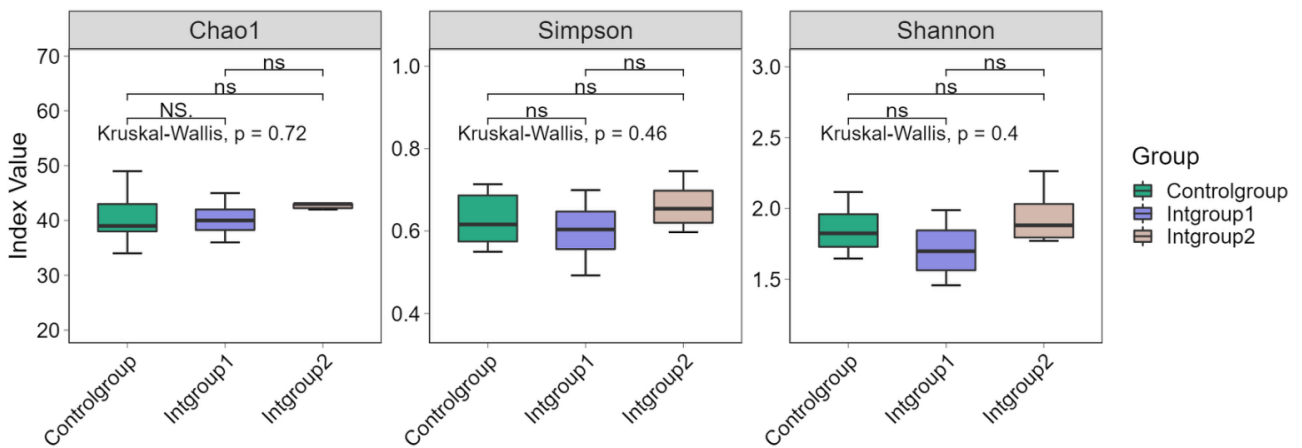


图 4 不同手卫生方法消毒的物种 Alpha 多样性箱线图

干预措施, 尤其是六步洗手法, 可有效降低优势菌群比例, 从而削弱群落的多样性水平。见图 4。

3 讨论

3.1 宏基因组测序技术在手卫生评价中的优势

本研究系统地应用宏基因组测序技术评估不同手卫生方法的效果, 结果表明该技术在手卫生评价中具有显著优势。与传统的菌落计数培养法相比, mNGS 技术能够全面显示手部微生物群落的组成和结构, 不仅可以检测细菌, 还可以同时检测真菌、病毒等多种微生物。

本研究共检测到 23 个门、312 个属的微生物, 远远超过了传统培养法能够检测的范围。这表明医护人员手部微生物群落的复杂性远超我们之前的认识。传统培养法通常只能检测到几种到几十种微生物, 而 mNGS 技术能够提供更全面、更准确的微生物群落信息。

此外, mNGS 技术还能够提供微生物多样性信息, 包括 Alpha 多样性和 Beta 多样性, 这些指标能够更全面地反映手卫生措施对微生物群落的影响。本研究发现, 手卫生措施不仅能够降低微生物的数量, 还能够改变微生物群落的结构和多样性, 这是传统培养法无法检测到的。

3.2 不同手卫生方法消毒效果评价

本研究结果显示, 六步洗手法和速干消毒剂都能够有效降低医护人员手部微生物的数量和多样性, 但两种方法在效果上存在一定差异。

在特定病原菌清除效能差异中, 六步法对痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*) 清除率显著优于卫生手消毒组 ($P < 0.05$), 且两者均显著高于对照组 ($P < 0.01$); 限制性马拉色菌 (*Malassezia restricta*) 在六步洗手法组同样表现出最优清除效果。痤疮丙

酸杆菌和限制性马拉色菌为皮肤常驻菌,但在特定条件下可转化为条件致病菌,因此有效清除具有重要意义^[13]。六步洗手法、卫生手消毒法显著提升新冠疫情期间条件致病菌清除效能,这与梁婧等^[14]的研究一致,均能有效降低接触传播风险。但六步洗手法、卫生手消毒法对消毒效果无统计学差异($P > 0.05$),结合张玉勤等^[15]和吴浩等^[16]研究建议优先选用速干手消毒剂,并通过手套外揉搓提升依从性及洗手效果。

3.3 不同手卫生方法消毒的 Beta 多样性分析

Beta 多样性分析结果显示,不同手卫生方法对微生物群落结构产生了显著影响。对照组、六步洗手法组和速干消毒剂组在 PCoA 图上形成了明显的聚类,表明手卫生措施改变了微生物群落的整体结构。组间差异比较:对照组(接触患者后未洗手组)的组内菌群差异最为显著,提示该组微生物群落结构最为复杂,可能同时包含致病菌、条件致病菌及正常共生菌等多种菌群,提高致病菌传播风险;干预组相比较下,手卫生消毒组的菌群丰度略高于六步洗手法组,但两组间差异不具有统计学意义($P=0.092$, $P > 0.05$),故六步洗手法与手消毒剂的作用机制差异须进一步探究。尽管手卫生消毒法在数值上略优,但因缺乏统计学支持,两类方法在临床场景中可依据操作便捷性互补使用。

3.4 不同手卫生方法消毒的 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性反映了菌群丰富度和均匀度。Chao1 指数分析虽未达到统计学显著性($P=0.072$),但梯度趋势提示手卫生干预可通过六步洗手法和速干手消毒剂双重作用或选择性减少特定菌群的定植,从而降低整体菌群的丰富度。

Simpson 指数($P=0.046$)和 Shannon 指数($P=0.04$)分析显示对照组物种多样性明显高于干预组,尤以六步洗手法组(干预1组)降幅最为显著。其可能通过双重机制发挥作用:一方面手卫生干预有助于削减高丰度条件致病菌(如葡萄球菌属、丙酸杆菌属)负载量;另一方面抑制特定菌种的过度增殖,维持菌群稳态。

3.5 研究局限性

本研究存在以下局限性:(1)样本量相对较小,可能影响结果的外推性;(2)研究时间较短,无法评估长期手卫生实践对皮肤微生态的影响;(3)未考虑个体差异、工作环境、季节变化等因素对结果的影响;(4)缺乏临床感染结局数据,无法直接证明手卫生措

施对医院感染发生率的影响。未来研究应扩大样本量,进行多中心研究,延长随访时间,收集临床感染数据,以更全面地评估手卫生措施的效果和意义。

综上所述,宏基因组测序技术能够全面、准确地评估手卫生措施的效果,为手卫生实践提供了新的技术手段,在临床应用过程中可以根据具体场景,相互转换结合使用。且本研究为优化手卫生实践、提升医院感染防控水平提供了重要的科学依据。未来应进一步推广宏基因组测序技术在手卫生评价中的应用,深入研究手卫生与皮肤微生态的关系,为制定更加科学、合理的手卫生指南提供支撑。

参考文献:

- [1] 高燕,杨芳,陈洪恩,等.强化措施干预对住院患者院内感染发生率的影响[J].齐鲁护理杂志,2024,30(20):166,封3.
- [2] 宋伟洁.奥马哈系统在临床医护人员手卫生管理中的应用效果[J].循证护理,2022,8(03):422-426.
- [3] 马跃英,邹学兰,杨燕丽.医护人员对手卫生知识的认知程度依从性及其影响因素分析[J].检验医学与临床,2018,15(16):2500-2502.
- [4] 彭威军,赖晓全,徐敏,等.手卫生依从性管理系统在医院感染管理中的效果评价[J].中国感染控制杂志,2023,22(11):1340-1344.
- [5] 于方方,孙惠英,杨志芳.“手卫生观察员”培训方法在提高医务人员手卫生依从性中的应用研究[J].解放军医学院学报,2023,44(12):1399-1402.
- [6] 胡晓熠.宏基因组二代测序在感染性疾病中的应用进展[J].微循环学杂志,2021,31(02):70-73+78.
- [7] 徐柳炎,钟娟.宏基因组测序技术在重症感染疾病中的应用进展[J].中国社区医师,2025,41(02):6-8.
- [8] 曹学秀,张瑜芯,陈力,等.病原体宏基因组分析技术在罕见感染中的应用[J].浙江临床医学,2024,26(12):1878-1881.
- [9] 罗越,胡洋洋,张兴,等.《中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识》解读[J].河北医科大学学报,2021,42(07):745-749.
- [10] 医务人员手卫生规范 WS/T313—2019[J].中华医院感染学杂志,2020,30(05):796.
- [11] 李六亿,徐丹慧.《医务人员手卫生规范》解读[J].中华医院感染学杂志,2020,30(05):793-795.
- [12] 谢娜娜.基于宏基因组测序的人尿液细胞游离DNA病原检测研究[D].安徽:安徽医科大学,2024.
- [13] 张鲁,隋长霖,魏艳杰,等.痤疮内在因素发病机制

- 的研究进展 [J]. 皮肤科学通报, 2024, 41(06): 690-694.
- [14] 梁婧, 梁晓虹, 项晓刚, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间利用 ImageJ 软件评价市民七步洗手法居家培训效果 [J]. 内科理论与实践, 2022, 17(02): 156-158.
- [15] 张玉勤, 高丽君, 赵奇, 等. 不同手卫生方式及干手措施对手卫生效果的影响 [J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(05): 466-469.
- [16] 吴浩, 马晓婷, 陈琬慈, 等. 采血中心医务人员不同策略手卫生研究 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(21): 3170-3172.