

• 论 著 •

某院 2012~2015 年流感嗜血杆菌分布特征及耐药性分析^{*}

杨勇文,李从荣[△]

(武汉大学人民医院检验科,武汉 430060)

摘要:目的 分析流感嗜血杆菌分布特征及耐药性。方法 回顾性分析 2012 年 1 月至 2015 年 9 月分离的流感嗜血杆菌药敏实验结果及相关临床资料。结果 共检出流感嗜血杆菌 369 株,93.2% 分离自痰标本,60.2% 分离自儿童患者。流感嗜血杆菌对复方磺胺甲噁唑的耐药率最高,达到 66.7%,对氨苄西林的耐药率为 41.1%,对环丙沙星和头孢噻肟的敏感率超过 93.0%,未检出美罗培南耐药菌株。检出多重耐药菌株 99 株,占 26.8%,主要耐药模式为氨苄西林+复方磺胺甲噁唑+氯霉素/头孢唑辛/阿奇霉素。 β -内酰胺酶产酶率为 37.1%,检出 β -内酰胺酶阳性、氨苄西林耐药菌株 127 株, β -内酰胺酶阴性、氨苄西林耐药菌株 27 株。分离自儿童患者的菌株对氨苄西林的耐药率和产酶率均高于分离自成人患者的菌株($P<0.05$)。结论 流感嗜血杆菌耐药机制复杂,应加强耐药监测,并根据药敏实验结果合理使用抗菌药物。

关键词:流感嗜血杆菌; 氨苄西林; β -内酰胺酶; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.13.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)13-1745-03

Distribution character and drug resistance of *Haemophilus influenza* in a hospital from 2012 to 2015^{*}

YANG Yongwen, LI Congrong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To analyze the distribution character and drug resistance of *Haemophilus influenza* (Hin). **Methods** Results of drug susceptibility test and related clinical data of Hin from Jan. 2012 to Sep. 2015 were retrospectively analyzed. **Results** Among the total of 369 strains of Hin, 93.2% were isolated from sputum samples, and 60.2% were isolated from child patients. The drug resistant rate to cotrimoxazole was the highest (66.7%), followed by the 41.1% to ampicillin. The drug sensitive rates to ciprofloxacin and cefotaxime were higher than 93.0%. All strains were sensitive to meropenem. Ninety-nine strains were with multi-drug resistance, accounting for 26.8%; and the main resistance patterns were cotrimoxazole + ampicillin + chloramphenicol/cefuroxime/azithromycin. The β -lactamase positive rate was 37.1%, and 127 strains were positive with β -lactamase and resistant to ampicillin, 27 strains were negative with β -lactamase and resistant to ampicillin. Ampicillin resistance rate and β -lactamase production rate of strains, isolated from child patients, were higher than those, isolated from adult patients ($P<0.05$). **Conclusion** Hin could be with complex resistance mechanisms. Drug resistance surveillance and rational usage of antibiotics should be strengthened.

Key words: *Haemophilus influenza*; ampicillin; β -lactamase; drug resistance

流感嗜血杆菌是一种寄生于健康者上呼吸道的苛养菌,可造成原发性化脓性感染和继发性感染,主要引起肺炎、咽炎及其他呼吸道化脓性感染等疾病^[1]。随着广谱抗菌药物的广泛使用,流感嗜血杆菌耐药性问题日趋严峻。本研究回顾性分析了本院 2012 年 1 月至 2015 年 9 月分离的流感嗜血杆菌分布特征及药敏实验结果,旨在为临床合理选择抗菌药物提供参考。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 1 月至 2015 年 9 月本院检验科分离的流感嗜血杆菌 369 株,来源标本包括痰、分泌物、血液、脓液等。

1.2 试剂 血平板、万古巧克力平板(含 5 mg/100 mL 万古霉素)和 HTM 药敏专用培养平板购自广州迪景微生物科技有限公司,V 因子、X 因子、V+X 因子和药敏纸片购自英国 Oxoid 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本接种培养 痰标本采集后 2 h 内直接涂片,95% 乙醇固定,革兰染色后观察细胞及细菌种类和数量,依据《临床微生物检验标准化操作规程(第 3 版)》标准判断标本是否符合要求^[2]。符合要求的痰标本(其他类型标本确定无污染后)接

种于血平板和万古巧克力平板,35℃、5%CO₂ 孵箱培养 18~24 h。

1.3.2 菌落涂片染色镜检 用接种环挑取血平板上不长、万古巧克力平板上生长的透明或半透明、扁平、湿润、露滴状细小菌落,涂抹于玻片上的生理盐水中,自然干燥、火焰固定,革兰染色后镜检。油镜下若见具有多形性的革兰阴性球杆菌(小杆状、点状),判为疑似流感嗜血杆菌。

1.3.3 卫星试验 对可疑菌落进行 V 因子、X 因子、V+X 因子卫星试验检测。实验操作严格遵照《临床微生物检验标准化操作规程(第 3 版)》^[2]。

1.3.4 β -内酰胺酶检测 严格按照试剂盒操作说明书的要求,以头孢噻吩纸片法进行 β -内酰胺酶检测。

1.3.5 药敏实验 采用 K-B 法分别在 HTM 平板上进行氨苄西林(AMP)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、头孢噻肟(CTX)、环丙沙星(CIP)、头孢唑辛(CXM)、氯霉素(CHL)、阿奇霉素(AZI)、美罗培南(MEM)药敏实验。按美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2012 年发布的相关标准判定实验结果。采用流感嗜血杆菌标准菌株(ATCC10211)作为质控菌株进行全程质量控制。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.6 和 SPSS21.0 软件进

^{*} 基金项目:国家临床重点专科项目(财社 2010305)。

作者简介:杨勇文,男,检验技师,主要从事临床微生物学检验研究。 [△] 通讯作者,E-mail:1225870670@qq.com。

行统计学分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 标本和科室分布 369 株流感嗜血杆菌中,344 株来源于痰标本,占 93.22%,12 株来源于分泌物标本,血液标本和脓液标本来源各 5 株,引流液、脑脊液和伤口渗出物标本来源各 1 株。202 株来源于儿科送检标本,占 54.7%,其次为重症医学科 32 株,肿瘤科 24 株,神经外科 21 株,神经内科 16 株,心内科和耳鼻喉科各 11 株,其他科室 52 株。

2.2 感染患者临床资料 369 例流感嗜血杆菌感染患者中,男 255 例、女 114 例,年龄 0.1~100 岁。237 例(64.2%)为单纯社区获得性肺炎,121 例(32.8%)合并基础疾病,包括慢性阻塞性肺病、支气管扩张症等。

2.3 混合感染检出情况 检出 40 例流感嗜血杆菌与其他细菌混合感染患者,占 10.8%。包括肺炎链球菌混合感染 24 例,其他混合感染细菌包括肺炎克雷伯菌(4 例)、卡他莫拉菌(3 例)、鲍曼不动杆菌(3 例)、金黄色葡萄球菌(3 例)等。

2.4 药敏实验结果 369 株流感嗜血杆菌对 SXT 的耐药率最高(66.7%),AMP 次之(41.1%);对 CIP 和 CTX 的敏感率均超过 93.0%;未检出 MEM 耐药菌株,见表 1。检出多重耐药菌株 99 株,主要耐药模式为 AMP+SXT+CHL/CXM/AZI。

表 1 流感嗜血杆菌药敏实验检测结果(%)			
抗菌药物	耐药率	中介率	敏感率
SXT	59.4	2.1	38.5
AMP	41.1	6.2	52.7
CHL	11.5	3.8	84.7
AZM	13.2	0.0	86.8
CXM	13.7	6.0	80.3
CIP	4.6	0.0	95.4
MEM	0.0	0.0	100.0
CTX	6.6	0.0	93.4

2.5 AMP 耐药与 β -内酰胺酶的相关性 369 株流感嗜血杆菌中,137 株为 β -内酰胺酶阳性菌株,产酶率为 37.1%。分离自成人患者的菌株 AMP 耐药率和产酶率(分别为 34.0%、27.2%)小于分离自儿童患者的菌株(分别为 45.5%、43.7%, χ^2 值分别为 4.823 和 10.293, $P<0.05$)。AMP 耐药与 β -内酰胺酶的相关性分析结果见表 2。

表 2 AMP 耐药与 β -内酰胺酶的相关性分析(n)		
AMP	β -内酰胺酶阳性	β -内酰胺酶阴性
敏感	6	189
中介	4	16
耐药	127	27

3 讨 论

流感嗜血杆菌通过自身的黏附素侵入鼻、咽和喉等部位的上皮细胞,同时通过改变外膜蛋白逃逸巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬,从而在上呼吸道长期定植^[3]。流感嗜血杆菌在健康者上呼吸道的定植率可达 50%^[4]。因此,对下呼吸道标本进行流感嗜血杆菌检测时,应对标本进行严格的镜检,以判断标本是否符合要求^[5]。当患者抵抗力下降,特别是合并基础疾病,

如支气管扩张、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺病等时,流感嗜血杆菌可移位侵入下呼吸道,加重基础疾病的病情^[3]。

流感嗜血杆菌的培养条件严格,营养要求较高,其检出率是判断临床微生物室工作能力的重要指标之一^[2]。本研究中,344 例痰标本同时进行直接涂片革兰染色镜检和接种培养,镜检结果表明,所有标本均符合要求(每个低倍镜视野中,白细胞数量超过 25 个,上皮细胞数量少于 10 个),可见大量白细胞及大量染色形态多样的细小杆菌或球杆菌。根据培养平板上单个菌落的形态,初步判断是否为流感嗜血杆菌可疑菌落,对高度可疑的菌落进行革兰染色镜检,并同时进行卫星试验检测,可最大限度地避免假阴性结果。本研究中,369 株流感嗜血杆菌主要分离自儿科送检标本,其次为重症医学科、肿瘤科和神经外科,可能与上述科室的患者免疫功能低下、接受侵入性诊疗操作破坏黏膜屏障等因素有关。本研究发现,流感嗜血杆菌是导致单纯社区获得性肺炎(237 例,占 64.2%)的主要病原菌之一,而肺炎链球菌是流感嗜血杆菌主要的混合感染菌株(40 例,占 10.8%)。有研究表明,定植于上呼吸道的流感嗜血杆菌和肺炎链球菌具有共生关系,IV 型菌毛结合细胞外 DNA(eDNA)的调节作用可使菌株产生多种生物膜,从而使其具有持久性定植和感染能力^[6]。

β -内酰胺类抗菌药物(如阿莫西林和 AMP)是治疗流感嗜血杆菌感染的首选药物^[7]。1997 年,在欧洲首先出现对 AMP 耐药的流感嗜血杆菌菌株,随后在全球范围内均有相关报道^[8-9]。目前,国内的研究报道显示流感嗜血杆菌对 AMP 的耐药率不断提升,且不同地区间存在一定的差异^[10-12]。本研究结果显示,流感嗜血杆菌对 AMP 的耐药率较高(41.1%), β -内酰胺酶产酶率则达到 37.1%;分离自儿童患者流感嗜血杆菌对 AMP 的耐药率和产酶率均高于分离自成人患者的菌株($P<0.05$),应引起高度重视。产 β -内酰胺酶是流感嗜血杆菌对 AMP 产生耐药性的主要机制^[13]。有研究证实,质粒介导产生的 TEM 型酶是流感嗜血杆菌的主要耐药酶, β -内酰胺酶阳性菌株可能对 AMP、阿莫西林和青霉素均耐药,且绝大多数 AMP、阿莫西林耐药株可产生 blaTEM 型 β -内酰胺酶^[14]。本研究中,27 株 β -内酰胺酶阴性菌株具有 AMP 耐药性,考虑可能与 fls I 基因突变造成青霉素结合蛋白 rPBP3 改变有关。此类菌株可能对阿莫西林/克拉维酸、AMP/舒巴坦、头孢克洛、头孢他美、头孢尼西、头孢丙烯、CXM 和氯碳头孢均耐药。此外,本研究检出 16 株 β -内酰胺酶阴性菌株对 AMP 中介,其耐药机制有待进一步研究。流感嗜血杆菌对 SXT 的耐药率最高(59.4%),表明 SXT 已不适用于流感嗜血杆菌感染的经验性治疗。流感嗜血杆菌对 AZI、CXM、CTX、CIP、MEM 较为敏感,可用于流感嗜血杆菌感染的经验性治疗。本研究检出多重耐药流感嗜血杆菌 99 株,主要耐药模式为 AMP+SXT+CHL/CXM/AZI,应该引起临床工作者的重视。

综上所述,临床微生物室应重视标本的形态学检验,优化苛养菌的培养条件,结合涂片和培养检测以提高对流感嗜血杆菌感染的病原学诊断水平。流感嗜血杆菌对常用抗菌药物的耐药率较高,耐药机制复杂,应根据药敏实验结果合理选用抗菌药物。

参考文献

[1] Mudhune S, Wamae M. Report on invasive disease and meningitis due to haemophilus influenzae and streptococcus pneumonia from the network for surveillance of pneumococcal disease in the east african region[J]. (下转第 1749 页)

义($P<0.05$);而 CEA、CA199 水平均升高的恶性肿瘤患者疾病分布相对集中,肺癌、肠癌、胃癌、胰腺癌和肝癌患者占 91.35%,其中胰腺癌患者 CEA 水平较低,肠癌、肺癌及乳腺癌患者 CEA 水平较高,而 CA199 水平以胰腺癌、乳腺癌及胆癌患者相对较高。由此可见,CEA 对胰腺癌的敏感性较低,而 CA199 是诊断胰腺癌较为理想的单项肿瘤标志物^[8]。一般认为,消化道肿瘤患者 CEA 与 CA199 水平较高,而实际上二者对肺癌的诊断亦有重要价值^[9]。在本研究中,肺癌患者在恶性肿瘤患者中占 32.82%,居首位,且 CEA 水平高于胰腺癌患者,而 CA199 水平低于胰腺癌。说明对于良性疾病而言,难以仅通过 CEA 或 CA199 水平升高进行疾病鉴别诊断;而 CEA 或(和)CA199 水平在不同恶性肿瘤患者间存在差异,因此具有一定的鉴别诊断价值。

本研究对于疾病,特别是肿瘤的分类概念较为宽泛,未详细分析不同疾病亚型与肿瘤标志物水平的相关性,而不同疾病亚型患者肿瘤标志物水平可能存在差异,例如肺癌中的小细胞肺癌与非小细胞肺癌患者 CEA 水平及其诊断敏感性存在一定的差异,这也是本研究存在的不足之处^[10]。总之,本研究证实 CEA、CA199 水平均升高的患者中,良性疾病患者占有不小的比例,以 10 ng/mL、90 U/mL 作为 CEA、CA199 的分界值,对良恶性疾病的鉴别有一定的辅助诊断价值。

参考文献

[1] 王传新. 肿瘤标志物的临床应用与研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 19(9): 641-644.

[2] Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers; European group on tumor markers 2014 guidelines update[J]. Int J Cancer, 2014, 134(11): 2513-2522.

(上接第 1746 页)

Clin Infect Dis, 2009(Suppl2): 147-152.

[2] 周庭银, 倪语星, 胡继红, 等. 临床微生物检验标准化操作规程[M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2015.

[3] King PT, Sharma R. The lung immune response to non-typeable *Haemophilus influenzae*(Lung Immunity to NT-Hi)[J]. J Immunol Res, 2015, 26(16): 1036-1042.

[4] Van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(12): 1281-1292.

[5] Hinz R, Zautner AE, Hagen RM, et al. Difficult identification of *Haemophilus influenzae*, a typical cause of upper respiratory tract infections, in the microbiological diagnostic routine[J]. Eur J Microbiol Immunol(Bp), 2015, 5(1): 62-67.

[6] Tikhomirova A, Kidd SP. *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*; living together in a biofilm[J]. Pathog Dis, 2013, 69(2): 114-126.

[7] Skaare D, Lia A, Hannisdal A, et al. *Haemophilus influenzae* with non-beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance; easy to find but hard to categorize[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(11): 3589-3595.

[8] Strausbaugh LJ. *Haemophilus influenzae* infections in adults; a pathogen in search of respect[J]. Postgrad Med, 1997, 101(2): 191-200.

[3] Polat E, Duman U, Duman M, et al. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer[J]. Curr Oncol, 2014, 21(1): 1-7.

[4] Bhattarai A, Jha B, Timilsina S. Serum CA 19-9 Levels in Benign and Malignant Diseases Associated with the Gastrointestinal Tract[J]. Ann Clin Chem Lab Med, 2015, 1(2): 35-41.

[5] 于晓静. 血清肿瘤标志物检测对消化系统良恶性肿瘤鉴别诊断的价值[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(10): 1397-1398.

[6] Bagaria B, Sood S, Sharma R, et al. Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination(ROC curve analysis)[J]. Cancer Biol Med, 2013, 10(3): 148-157.

[7] Zhu FL, Ling AS, Wei Q, et al. Tumor markers in serum and ascites in the diagnosis of benign and malignant ascites[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(2): 719-722.

[8] Bunger S, Laubert T, Roblick UJ, et al. Serum biomarkers for improved diagnostic of pancreatic cancer; a current overview[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(3): 375-389.

[9] 张亚男, 赵宗兴, 张亚坤, 等. 血清肿瘤标记物在肺癌诊断中的意义[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(2): 219-222.

[10] Grunnet M, Sorensen J. Carcinoembryonic antigen(CEA) as tumor marker in lung cancer[J]. Lung Cancer, 2012, 76(2): 138-143.

(收稿日期: 2016-02-18 修回日期: 2016-04-24)

[9] Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(2): 368-389.

[10] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与控制杂志, 2015, 15(5): 401-410.

[11] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与控制杂志, 2014, 14(5): 365-374.

[12] Xiao Y, Wei Z, Shen P, et al. Bacterial-resistance among outpatients of county hospitals in China; significant geographic distinctions and minor differences between central cities[J]. Microbes Infect, 2015, 17(6): 417-425.

[13] Cherkaoui A, Diene SM, Emonet S, et al. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in Geneva; serotype, antimicrobial susceptibility, and β -lactam resistance mechanisms[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(10): 1937-1945.

[14] San Millan A, Santos-Lopez A, Ortega-Huedo R, et al. Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(6): 3335-3341.

(收稿日期: 2016-02-27 修回日期: 2016-05-02)