

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.09.013

呼吸道及非呼吸道流感嗜血杆菌感染特征及耐药性分析^{*}

骆晓凤, 朱叶飞, 赵水娣, 胡慧敏, 徐新艳[△]

南京医科大学第二附属医院检验医学中心, 江苏南京 210011

摘要:目的 分析该院呼吸道和非呼吸道流感嗜血杆菌的感染特征及耐药情况, 为临床合理用药提供依据。**方法** 对 2016—2019 年该院呼吸道和非呼吸道标本检出的流感嗜血杆菌进行分析, 采用 Kirby-Bauer 法检测抗菌药物的敏感性, 采用头孢硝噻吩纸片法检测 β -内酰胺酶的活性。**结果** 共检出流感嗜血杆菌 284 株, 包括呼吸道来源 270 株(95.07%)和非呼吸道来源 14 株(4.93%)。婴幼儿(0~3 岁)对流感嗜血杆菌的易感性明显高于其他年龄段人群($P<0.05$), 老年人(>59 岁)较青少年($>14\sim18$ 岁)和成年人($>18\sim59$ 岁)易感($P<0.05$)。流感嗜血杆菌感染呈春、冬季高发性, 其感染高峰在 2—5 月。270 株呼吸道来源的流感嗜血杆菌包括 β -内酰胺酶阳性且对氨苄西林耐药 147 株(54.44%)、 β -内酰胺酶阴性且对氨苄西林耐药 34 株(12.60%)和 β -内酰胺酶阴性且对氨苄西林敏感 89 株(32.96%)。14 株非呼吸道来源流感嗜血杆菌包括 β -内酰胺酶阳性且对氨苄西林耐药 2 株, β -内酰胺酶阴性且对氨苄西林耐药 2 株, β -内酰胺酶阴性且对氨苄西林敏感 10 株。呼吸道来源的流感嗜血杆菌对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦和头孢吡肟的耐药率明显高于非呼吸道菌株($P<0.05$)。**结论** 该院呼吸道来源的流感嗜血杆菌耐药率高于非呼吸道菌株, 临床医师应根据病原菌分布及耐药特征选用抗菌药物, 确保合理用药。

关键词: 流感嗜血杆菌; Kirby-Bauer 法; β -内酰胺酶

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)09-1231-04

Infectious features and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* from respiratory tract and non-respiratory tract^{*}

LUO Xiaofeng, ZHU Yefei, ZHAO Shuidi, HU Huimi, XU Xinyan[△]

Center of Laboratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210011, China

Abstract: Objective To analyze the infectious characteristics and drug resistance of *Haemophilus influenzae* from respiratory tract and non-respiratory tract in this hospital to provide a basis for clinical rational medication. **Methods** *Haemophilus influenzae* detected from the respiratory tract and non-respiratory tract samples in this hospital during 2016—2019 was analyzed. The sensitivity of antibacterial drugs was detected by the Kirby-Bauer method and the β -lactamase activity was detected by the cephanosporin paper method. **Results** A total of 284 strains of *Haemophilus influenzae* were detected, including 270 (95.07%) strains of respiratory tract source and 14 (4.93%) strains of non-respiratory tract source. The susceptibility to *Haemophilus influenzae* of the infants (aged 0—3 years old) was significantly higher than that of other age groups, the elderly people (aged >59 years old) were more susceptible than the adolescents ($>14\sim18$ years old) and adults ($>18\sim59$) ($P<0.05$). *Haemophilus influenzae* infection showed high onset in winter and spring, its infection peak was in February to May. Among 270 strains of *Haemophilus influenzae* from respiratory tract, there were 147 strains (54.44%) of β -lactamase-positive and resistant to ampicillin, 34 strains (12.60%) of β -lactamase-negative and resistant to ampicillin and 89 strains (32.96%) of β -lactamase-negative and sensitive to ampicillin. Fourteen strains of *Haemophilus influenzae* from non-respiratory tract source included 2 strains of β -lactamase-positive and resistant to ampicillin and 2 strains of β -lactamase-negative and resistant to ampicillin and 10 strains of β -lactamase-negative and sensitive to ampicillin. The resistance rates of *Haemophilus influenzae* from respiratory tract to ampicillin, ampicillin/sulbactam and cotrimoxazole were significantly high-

^{*} 基金项目: 南京医科大学科技发展基金项目(2017NJMU031)。

作者简介: 骆晓凤, 女, 主管技师, 主要从事细菌耐药机制及能量代谢研究。 [△] **通信作者,** E-mail: 2312998342@qq.com。

本文引用格式: 骆晓凤, 朱叶飞, 赵水娣, 等. 呼吸道及非呼吸道流感嗜血杆菌感染特征及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(9):

er than those from non-respiratory tract. **Conclusion** The drug resistance rate of Haemophilus influenzae from respiratory tract source is higher than that from non-respiratory tract. Clinical doctors should choose antibacterial drugs according to the infection distribution and drug resistance characteristics of pathogenic bacteria for ensuring the rational medication.

Key words: Haemophilus influenzae; Kirby-Bauer method; β -lactamase

流感嗜血杆菌是最常见的一种导致儿童社区获得性肺炎和中耳炎的病原体^[1],还可引起小儿浸润性疾病,如脑膜炎和败血症^[2]。随着抗菌药物在全球范围内广泛使用,在许多国家和地区,流感嗜血杆菌对氨苄西林及其他常用抗菌药物的耐药率越来越高^[3],其耐药机制主要是由于 β -内酰胺酶的产生或是青霉素结合位点(PBPs)对 β -内酰胺类抗菌药物的亲和力下降^[4]。目前第三、四代头孢菌素及碳青霉烯类药物已经成为治疗耐氨苄西林流感嗜血杆菌感染的首选。为了解不同感染部位来源流感嗜血杆菌菌株的流行病学特征和药敏情况,本研究对 2016—2019 年非呼吸道和呼吸道检出的流感嗜血杆菌进行回顾性分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2016—2019 年分离的流感嗜血杆菌,剔除同一患者相同部位的重复菌株,共分离 284 株,感染患者中男 171 例、女 113 例。将呼吸道来源的流感嗜血杆菌患者按年龄划分为 A、B、C、D、E 5 组,其中 A 组为 0~3 岁(婴幼儿),B 组为 >3~14 岁(儿童)、C 组为 >14~18 岁(青少年),D 组为 >18~59 岁(成年人),E 组为 >59 岁(老年人)。流感嗜血杆菌 ATCC49247 质控菌株购于江苏英科新创医学科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定药敏仪及其配套的 NH 鉴定卡(奈瑟菌、嗜血杆菌鉴定卡),CO₂ 培养箱为美国赛默飞世尔科技(阿什威尔)有限公司 Forma3111。血琼脂平板、巧克力平板、M-H 平板、HTM 平板均购于上海科玛嘉微生物技术有限公司,Kirby-Bauer 法药敏纸片和 β -内酰胺酶由 OXOID 公司提供,所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 分离与鉴定 按照《全国临床检验操作规程》(第 4 版)要求,选用含 V 因子和 X 因子的巧克力培养基进行分离培养,将其置于 5%CO₂、35℃ 孵箱内培养 18~24 h。采用法国生物梅里埃 VITEK 2 Compact 全

自动细菌鉴定药敏仪及 NH 鉴定卡进行细菌鉴定。

1.3.2 β -内酰胺酶敏感性和药敏试验 采用头孢硝噻吩纸片法检测 β -内酰胺酶的敏感性,采用 Kirby-Bauer 法进行药敏试验。判断标准参照 2019 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)相关文件。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件分析药敏试验结果,采用 Graph Pad Prism 8.0.1 统计软件处理数据,计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流感嗜血杆菌的分布特征 分离的 284 株流感嗜血杆菌中包括呼吸道来源 270 株[其中痰液(属于下呼吸道标本)259 株、咽拭子 9 株、肺泡灌洗液 2 株],占 95.07%,非呼吸道来源 14 株(其中眼拭子 10 株、分泌物 2 株、脓液 1 株和静脉导管 1 株),占 4.93%。2016—2019 年下呼吸道(痰液)标本检出流感嗜血杆菌共 259 株,检出率为 0.31%,且 4 年间检出率存在一定的波动,2016—2019 年检出率分别为 0.43%、0.19%、0.28%、0.35%。因非呼吸道和上呼吸道(咽拭子)标本检出例数较少,不进行分析。

2.2 呼吸道来源的流感嗜血杆菌流行病学特征 270 例呼吸道来源的流感嗜血杆菌感染患者分布存在季节性差异,呈冬、春两季高发性,1—5 月共分离流感嗜血杆菌 178 株,占 65.93%,感染高峰集中在 2—5 月(156 株,57.78%)。

不同年龄患者呼吸道来源的流感嗜血杆菌构成比不同:婴幼儿(172 例,63.70%)易感性明显高于儿童(35 例,12.96%)、青少年(1 例,0.37%)、成年人(16 例,5.93%)和老年人(46 例,17.04%),差异均有统计学意义($P<0.05$);老年人较青少年和成年人易感,差异有统计学意义($P<0.05$);儿童及成年人易感性均明显高于青少年,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 流感嗜血杆菌 β -内酰胺酶检测情况和耐药性分析 2017—2019 年下呼吸道(痰液)来源流感嗜血杆菌对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、阿奇霉素的耐药率较 2016 年有上升趋势。见表 1。

表 1 2016—2019 年 259 株下呼吸道(痰液)来源流感嗜血杆菌的耐药率(%)				
抗菌药物	2016 年($n=74$)	2017 年($n=39$)	2018 年($n=59$)	2019 年($n=87$)
氨苄西林	56.76	58.97	67.79	67.81
氨苄西林/舒巴坦	28.38	25.64	32.20	35.63
阿莫西林/克拉维酸	22.97	23.08	30.51	32.18

续表 1 2016—2019 年 259 株下呼吸道(痰液)来源流感嗜血杆菌的耐药率(%)

抗菌药物	2016 年(<i>n</i> =74)	2017 年(<i>n</i> =39)	2018 年(<i>n</i> =59)	2019 年(<i>n</i> =87)
阿奇霉素	22.97	28.21	30.51	31.03
头孢呋辛钠	35.14	35.90	35.59	37.93
头孢噻肟	6.76	5.13	6.78	5.75
复方磺胺甲噁唑	59.46	56.41	62.71	59.77

呼吸道检出 β-内酰胺酶阳性且对氨苄西林耐药的流感嗜血杆菌 147 株,占 54.44%(147/270)。检出 β-内酰胺酶阴性且对氨苄西林耐药的流感嗜血杆菌 34 株,占 12.60%,氨苄西林总耐药率为 67.04%;检出 β-内酰胺酶阴性且对氨苄西林敏感的流感嗜血杆菌 89 株,占 32.96%,β-内酰胺酶阳性且对氨苄西林敏感的流感嗜血杆菌 0 株。β-内酰胺酶阳性流感嗜血杆菌对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、阿奇霉素、头孢呋辛钠及复方磺胺甲噁唑的耐药率均明显高于 β-内酰胺酶阴性菌株($P<0.05$)。非呼吸道分离的 14 株流感嗜血杆菌中 β-内酰胺酶阳性且对氨苄西林耐药 2 株,β-内酰胺酶阴性且对氨苄西林耐药 2 株,β-内酰胺酶阴性且对氨苄西林敏感 10 株。见表 2。

2.4 不同年龄段患者呼吸道来源流感嗜血杆菌耐药情况分析 按年龄将 270 例流感嗜血杆菌感染患者分为 A~E 5 个组,因 C 组仅 1 例,且对表 3 中各种抗菌药物均敏感,故不列入表 3 进行分析。婴幼儿对氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、头孢呋辛钠的

敏感性均明显高于儿童和成年人($P<0.05$),且老年人对阿奇霉素较婴幼儿敏感($P<0.05$),儿童对氨苄西林的耐药率明显高于成年人($P<0.05$)。见表 3。

表 2 呼吸道来源的 β-内酰胺酶阳性和 β-内酰胺酶阴性流感嗜血杆菌的耐药情况(*n*)

药物	β-内酰胺酶阳性 (<i>n</i> =147)			β-内酰胺酶阴性 (<i>n</i> =123)			<i>P</i>
	R	I	S	R	I	S	
氨苄西林	147	0	0	34	0	89	<0.05
氨苄西林/舒巴坦	73	0	74	14	0	109	<0.05
阿莫西林/克拉维酸	65	0	82	11	0	112	0.82
阿奇霉素	69	0	78	6	0	117	<0.05
头孢呋辛钠	88	4	55	12	1	110	<0.05
头孢噻肟	12	3	132	6	0	117	0.33
复方磺胺甲噁唑	107	2	38	50	2	71	<0.05

注:R 为耐药;I 为中介;S 为敏感;*P* 为 β-内酰胺酶阳性菌株与 β-内酰胺酶阴性菌株的耐药率比较。

表 3 不同年龄段患者呼吸道来源流感嗜血杆菌对常用抗菌药物的耐药率分析[*n*(%)]

抗菌药物	A 组(<i>n</i> =172)	B 组(<i>n</i> =35)	D 组(<i>n</i> =16)	E 组(<i>n</i> =46)
氨苄西林	119(69.19)	29(82.86)	8(50.00) [△]	32(69.56)
氨苄西林/舒巴坦	43(25.00)	16(45.71)*	6(37.50)*	22(47.83)*
阿莫西林/克拉维酸	24(13.95)	21(60.00)*	5(31.25)*	26(56.52)*
阿奇霉素	56(32.56)	11(31.43)	2(12.50)	6(13.04)*
头孢呋辛钠	49(28.49)	21(60.00)*	7(43.75)*	23(50.00)*
头孢噻肟	1(0.58)	6(17.14)*	0(0.00)	11(23.91)*
复方磺胺甲噁唑	106(61.63)	20(57.14)	8(50.00)	27(58.70)

注:与 A 组比较,* $P<0.05$;与 B 组比较,[△] $P<0.05$;A 组为婴幼儿;B 组为儿童;D 组为成年人;E 组为老年人。

2.5 不同感染部位流感嗜血杆菌的耐药情况分析 呼吸道分离的流感嗜血杆菌对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛钠的耐药率高于非呼吸道菌株($P<0.05$)。非呼吸道标本仅有 14 株,结果代表性不强。见表 4。

表 4 呼吸道标本与非呼吸道标本流感嗜血杆菌耐药率分析[<i>n</i> (%)]			
抗菌药物	呼吸道流感嗜血 杆菌(<i>n</i> =270)	非呼吸道流感嗜血 杆菌(<i>n</i> =14)	<i>P</i>
氨苄西林	188(69.63)	4(28.57)	<0.05
氨苄西林/舒巴坦	87(32.22)	0(0.00)	<0.05

续表 4 呼吸道标本与非呼吸道标本流感嗜血杆菌耐药率分析[*n*(%)]

抗菌药物	呼吸道流感嗜血 杆菌(<i>n</i> =270)	非呼吸道流感嗜血 杆菌(<i>n</i> =14)	<i>P</i>
阿莫西林/克拉维酸	76(28.15)	1(7.14)	0.12
阿奇霉素	75(27.78)	3(21.43)	0.76
头孢呋辛钠	100(37.04)	2(14.29)	<0.05
头孢噻肟	18(6.67)	0(0.00)	0.99
复方磺胺甲噁唑	161(59.63)	7(50.00)	0.14

3 讨 论 流感嗜血杆菌已经成为呼吸道感染的重要致病

菌之一。本院下呼吸道(痰液)标本流感嗜血杆菌的检出率为 0.31%, 低于 2016 年中国细菌耐药性监测网(CHINET)结果(2.76%)^[5], 可能的原因:(1)本文仅统计了 1 所医院的住院患者;(2)患者早期经验性地使用抗菌药物;(3)流感嗜血杆菌对生长环境和营养条件要求高, 不易分离。

本研究结果与 2016 年的一项多中心研究结果相近^[6], 感染呈季节性分布, 春、冬两季高发。另有研究显示, 3 岁以下婴幼儿的免疫系统发育未健全, 缺乏对流感嗜血杆菌的抑菌活力, 因此该年龄段流感嗜血杆菌感染率高^[7]。本研究 284 例流感嗜血杆菌感染患者中, 婴幼儿易感性明显高于其他各年龄段人群($P < 0.05$), 支持了以上观点。

氨苄西林是抗流感嗜血杆菌感染的首选药物。流感嗜血杆菌对氨苄西林等 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制主要是产 β -内酰胺酶, 可水解抗菌药物的 β -内酰胺环, 从而使抗菌药物失活^[8-9]。2016 年 CHINET 数据显示, 国内流感嗜血杆菌儿童株和成人株的产酶率分别为 28.3% 和 29.9%^[5]。本研究 270 例呼吸道感染流感嗜血杆菌感染患者, 分离出 β -内酰胺酶阳性且对氨苄西林耐药菌株为 147 株, 产酶率为 54.44%, 结果提示, 产 β -内酰胺酶是流感嗜血杆菌的主要耐药机制。本院流感嗜血杆菌产酶率高于 2016 年 CHINET 数据可能原因:(1)随着时间的推移, 患者抗菌药物的暴露增加;(2)标本量不足够大, 仅反映本院数据。 β -内酰胺酶阴性且对氨苄西林耐药的机制主要是由青霉素结合蛋白(PBP)改变引起的, 使 PBP 对 β -内酰胺类药物的亲和力减弱, 导致耐药性的出现^[10]。本研究有 34 株呼吸道来源 β -内酰胺酶阴性且对氨苄西林耐药的菌株, 占 12.59%, 略高于 2016 年我国的一项多中心研究结果(9.3%)^[6]。

流感嗜血杆菌还会引起尿道和生殖道感染。有研究显示, 呼吸道分泌物中的流感嗜血杆菌对氨苄西林、头孢呋辛、克拉霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率明显高于阴道分泌物^[9]。本院调查结果显示, 呼吸道来源的流感嗜血杆菌对大多数常用抗菌药物的耐药率均高于非呼吸道, 即不同感染部位流感嗜血杆菌对抗菌药物的敏感性不同。总体而言, 针对流感嗜血杆菌治疗的最佳抗菌药物可能因感染部位不同而有所区别。

本研究存在的不足: 非呼吸道分离的流感嗜血杆菌仅有 14 株, 样本量太小, 代表性不强, 但总体上还是可以反映本院非呼吸道标本流感嗜血杆菌感染对

各类抗菌药物的耐药情况。治疗流感嗜血杆菌的敏感抗菌药物可能因感染部位而异, 临床医师应根据感染部位选择性用药。本研究致力于掌握流感嗜血杆菌的分布特征及不同感染部位来源流感嗜血杆菌的耐药特点, 进而指导临床合理使用抗菌药物、控制耐药菌株的传播。

参考文献

- [1] BUTLER D F, MYERS A L. Changing epidemiology of *Haemophilus influenzae* in children[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2018, 32(1): 119-128.
- [2] WHITTAKER R, ECONOMOPOULOU A, DIAS J G, et al. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 2007–2014[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(3): 396-404.
- [3] THOMAS E, GUILLOUZOUIC A, JUVIN M E, et al. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with alteration of PBP 3 sequence over a 1-year period in a French hospital: focus on a clinical failure after ceftriaxone treatment[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2019, 93(2): 89-91.
- [4] SONDERGAARD A, NORSKOV-LAURITSEN N. Contribution of PBP3 substitutions and TEM-1, TEM-15, and ROB-1 beta-lactamases to cefotaxime resistance in *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*[J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(4): 247-252.
- [5] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(9): 481-491.
- [6] WANG H J, WANG C Q, HUA C Z, et al. Antibiotic resistance profiles of *Haemophilus influenzae* isolates from children in 2016: a multicenter study in China[J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2019, 2019: 6456321.
- [7] LI J P, HUA C Z, SUN L Y, et al. Epidemiological features and antibiotic resistance patterns of *Haemophilus influenzae* originating from respiratory tract and vaginal specimens in pediatric patients[J]. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2017, 30(6): 626-663.
- [8] 周世娟, 刘云香, 林华杰, 等. 呼吸道感染流感嗜血杆菌生物学分型及耐药基因研究[J]. *中国当代医药*, 2017, 14(4): 162-165.
- [9] 桂和翠. 流感嗜血杆菌的耐药性及同源性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [10] 张春玲, 许亚亚, 牛津, 等. 耐 β -内酰胺类抗生素肺炎链球菌青霉素结合蛋白 PBP3 的氨基酸基因变异[J]. *中国微生物学杂志*, 2012, 24(12): 1088-1092.