

• 论 著 •

2014 年成都某院流感嗜血杆菌的临床分布及耐药分析

罗宇鹏

(成都市第五人民医院检验科, 四川成都 611130)

摘要:目的 探讨该院临床分离的流感嗜血杆菌分布及抗菌药物的耐药情况。方法 以该院 2014 年 1~12 月所有已筛查合格且培养为阳性的下呼吸道标本 1 895 份、血液类标本 666 份、尿道分泌物标本 102 份, 共 2 663 份标本分离出的流感嗜血杆菌 438 株为研究对象, 采用头孢硝基噻吩纸片测定其 β -内酰胺酶, 用纸片扩散法(K-B 法)测定其对 8 种抗菌药物的敏感性, 利用 WHONET5.6 软件对试验数据进行统计分析。结果 438 株流感嗜血杆菌中 98.6% 来自住院患者, 1.4% 来自门诊; 儿童分离株有 176 株, 占 40.18%; 老年患者分离株 194 株, 占 44.29%; 下呼吸道标本来源 434 株, 占 99.09%。对复方磺胺甲噁唑耐药率最高, 达 82.90%, 氨苄西林和四环素的耐药率分别为 43.40%、29.00%; 而头孢呋辛、头孢曲松、环丙沙星、阿奇霉素、亚胺培南的耐药率均在 2.00% 以下。 β -内酰胺酶的阳性率为 43.40%, 在氨苄西林耐药菌株中有 1.57% 的菌株 β -内酰胺酶检测阴性。儿童分离株对氨苄西林的耐药率和产酶率(42.40%、40.43%)和成人分离菌株对氨苄西林的耐药率及产酶率(44.00%、44.00%)没有明显差异。结论 流感嗜血杆菌主要分离自下呼吸道标本中; 以儿童和老年患者为主, 第二、三代头孢菌素类与阿奇霉素可作为临床首选药物, β -内酰胺酶是该菌对氨苄西林耐药的主要机制。

关键词: 流感嗜血杆菌; 耐药性; 抗菌药物; β -内酰胺酶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)03-0333-03

Clinical distribution of Hemophilus influenzae and its drug resistance analysis

Luo Yupeng

(Department of Clinical Laboratory, Chengdu Municipal Fifth People's Hospital, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: **Objective** To study the distribution of clinically separated Hemophilus (H.) influenzae and its drug resistance situation. **Methods** Among 2 663 specimens of screening qualified and positive culture collected from the outpatients, inpatients and emergency patients of our hospital from January to December 2014, including 1 895 specimens of lower respiratory tract, 666 blood specimens and 102 urinary secretion specimens, 438 strains of H. influenzae were isolated. The cephalosporin nitro thiophene paper test strip was used to test its beta lactamase and the K-B method was used to detect its sensitivity to 8 kinds of antibacterial drugs. The testing data were statistically analyzed by using WHONET5.6 software. **Results** Among 438 strains of H. influenzae, 98.6% was originated from hospitalized patients, 1.4% from the outpatient department; 176 isolated strains were originated from children, accounting for 40.18%; 194 strains (44.29%) were from elderly patients, 434 strains (99.09%) were originated from the lower respiratory tract specimens. The resistance rate to compound sulfamethoxazole was highest and reached 82.90%, which to ampicillin and tetracycline were 29.00% and 43.40% respectively; but which to cefuroxime, ceftriaxone, ciprofloxacin, azithromycin, imipenem were below 2.00%. The β -lactamase positive rate was 43.40%, in ampicillin resistant strains, 1.57% of strain was negative in β -lactamase test. The resistance to ampicillin and enzyme production rate had no significant differences between the children isolated strains and adult isolated strains (42.43%, 42.40% vs. 44.00%, 44.00%). **Conclusion** H. influenzae is mainly isolated from lower respiratory tract specimens; which is dominated by children and elderly patients; the second and third generations of cephalosporins and azithromycin can serve as a clinical preferred drugs; β -lactamase is the primary mechanism of resistance to ampicillin.

Key words: Hemophilus influenzae; drug resistance; antibacterial agents; β -lactamase

流感嗜血杆菌一般存在于人类的上呼吸道中, 只侵犯人类的革兰阴性苛养细小细菌, 也是社区获得性肺病(CAP)、慢性支气管炎急性发作(AECG)的常见病原菌之一, 可侵入血液、脑脊液及皮肤黏膜等引起败血症、脑膜炎、肺炎、脓毒关节炎等^[1-2]。近年来, 由于抗菌药物的不合理使用, 流感嗜血杆菌的耐药率不断上升, 为了解本院流感嗜血杆菌对抗菌药物的耐药率, 指导临床合理用药, 对本院 2014 年全年所有培养标本分离出的流感嗜血杆菌进行分离鉴定、 β -内酰胺酶检测及纸片扩散法(K-B)法药敏试验, 并进行耐药性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年全年本院门诊及住院患者所有

已筛查合格且培养为阳性的下呼吸道标本 1 895 份、血液类标本 666 份、尿道分泌物标本 102 份, 共 2 663 份标本分离出流感嗜血杆菌 438 株; 考虑到流感嗜血杆菌的致病性及分离检出率, 其他常见临床标本如咽拭子、灌洗液、脑脊液等未纳入统计。

1.2 仪器与试剂 哥伦比亚血琼脂、麦康凯、巧克力培养基(含万古霉素)、HTM 药敏培养基、脑心浸液琼脂培养基、革兰染液均由成都瑞琦生物有限公司提供; 胰蛋白消化酶粉由上海源聚生物科技公司提供; 普通孵育箱、二氧化碳孵育箱、BD FX400 血培养仪 Olympus CX31 显微镜、游标卡尺等。复方磺胺甲噁唑(SXT)、氨苄西林(AMP)、环丙沙星(CIP)、头孢曲松

(CRO)、头孢呋辛(CXM)、阿奇霉素(AZM)、四环素(TCY)、亚胺培南(IPM)、V 因子、X 因子、(V+X)因子及 β -内酰胺酶药敏纸片均购自英国 OXOID 公司;质控菌株为流感嗜血杆菌 ATCC49247、流感嗜血杆菌 ATCC49766(补充 ATCC49247 不能涵盖的药敏质控)、金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.3 方法

1.3.1 下呼吸道标本 (1)下呼吸道标本的采集。漱口,深呼吸咳嗽深部痰液于无菌杯送检;晨痰最佳。(2)下呼吸道标本的筛查。直接或通过洗涤后达到显微镜镜下白细胞数目不低于 25 个/高倍镜,上皮细胞不高于 10 个/低倍镜视为合格标本,进一步洗涤匀质化;若镜下白细胞数目小于 25 个/高倍镜,视为不合格标本^[3]。(3)下呼吸道标本的洗涤、涂片、匀质化及接种孵育。对于合格的痰液标本,加入适量的生理盐水进行洗涤,挑取脓性痰液部分进行涂片染色镜检,同时加入胰蛋白酶粉(浓度为 1%)35℃进行匀质化 60~90 min 后,分区划线接种哥伦比亚血琼脂、麦康凯、巧克力培养基,麦康凯培养基放置普通孵育箱孵育(35℃,18~24 h),哥伦比亚血琼脂及巧克力培养基放置 CO₂ 孵育箱孵育(35℃ 5%CO₂ 18~24 h)。

1.3.2 血液类标本 标本采集由临床护士完成,直接采集 8~10 mL 血液注入成人血培养瓶,放置 BD FX400 血培养仪直接孵育,阳性报警则涂片接种培养基。

1.3.3 尿道分泌物标本 (1)尿道分泌物的采集。由皮肤科医生或外科医生采用专用尿道拭子伸入尿道 3~4 cm 处,停留 5 s,再旋转退出,放入无菌管内。(2)尿道分泌物的筛查。加入适量生理盐水润湿,涂片染色镜检;镜检标准及接种培养基同灌洗液。

1.3.4 致病菌与定植菌(或污染菌)的区分 (1)下呼吸道、咽拭子、灌洗液及尿道分泌物等标本。脓细胞内涂片查见革兰阴性细小短杆菌,视为致病菌;未查见则视为定植菌。(2)血液及脑脊液标本。涂片查见革兰阴性细小短杆菌,视为致病菌。

1.3.5 细菌分离培养及鉴定 哥伦比亚血琼脂培养基不生长或生长细小,麦康凯培养基不生长,巧克力培养基生长,革兰染色为革兰阴性细小或呈扭曲之长丝状;在巧克力培养基上菌落灰色/无色、半透明、露滴样菌落,0.6~2.0 mm 为流感嗜血杆菌;挑取可疑菌落做成 0.5 麦氏菌液浊度,再按要求接种于脑心浸液培养基和哥伦比亚血琼脂培养基,分别点种金黄色葡萄球菌进行卫星试验,在脑心浸液培养基上贴上 V 因子、X 因子及(V+X)因子 3 种生长因子,35℃孵育 24 h,如哥伦比亚血琼脂培养基上卫星试验阳性且不溶血的菌落、脑心浸液培养基上卫星试验阴性、(V+X)因子阳性、V 因子和 X 因子阴性则鉴定为流感嗜血杆菌。

1.3.6 药敏试验 采用 K-B 法分别进行 SXT、AMP、CIP、CRO、TCY、CXM、IPM、AZM 等 8 种抗菌药物的敏感性测定,按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2014 版的判定标准测量抑菌环直径,以及判定耐药及敏感性。

1.3.7 质控 采用流感嗜血杆菌 ATCC49247 及 ATCC49766 进行药敏试验质控,采用流感嗜血杆菌 ATCC49247 及金黄色葡萄球菌 ATCC25923 进行因子纸片、哥伦比亚血琼脂培养基及巧克力培养基质控。

1.4 统计学处理 采用 WHONET 5.6 进行统计分析。

2 结果

2.1 流感嗜血杆菌分布情况 在 438 株流感嗜血杆菌中,98.6%来自住院患者,1.4%来自门诊;科室的分布中儿科最高

37.67%,其次为内科 37.21%,重症监护室 5.94%,外科 3.88%,血液肿瘤科 2.28%,感染科 1.37%,其他科室 11.64%;年龄 10 岁以下占 40.18%,10~<20 岁占 0.68%,20~<30 岁占 0.68%,30~<40 岁占 1.14%,40~<50 岁占 3.65%,50~<60 岁占 9.36%,60 岁及以上占 44.29%。标本类型以下呼吸道标本分离菌株最多,为 434 株,血液标本中分离 2 株,尿道分泌物标本中分离 2 株。见表 1。

表 1 438 流感嗜血杆菌标本来源、科室分布及年龄分布构成比

标本来源	项目	株数(n)	构成比(%)
标本类型	下呼吸道标本	434	99.09
	血液	2	0.45
	尿道分泌物	2	0.45
科室	儿科	165	37.67
	内科	163	37.21
	重症监护室	26	5.94
	外科	17	3.88
	血液肿瘤科	10	2.28
	感染科	6	1.37
	其他科室	51	11.64
年龄(岁)	<10	176	40.18
	10~<20	3	0.68
	20~<30	3	0.68
	30~<40	5	1.14
	40~<50	16	3.65
	50~<60	41	9.36
	≥60	194	44.29

2.2 药敏试验 438 株分离菌株中共检测出 190 株(43.40%)产 β -内酰胺酶菌,在氨苄西林耐药菌株中有 3 株(1.57%)未检测出 β -内酰胺酶,438 株流感嗜血杆菌对各种抗菌药物的敏感性见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨论

流感嗜血杆菌是条件感染性致病菌,正常情况下存在于人的上呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道,不引起任何感染,但在适当条件下,如病毒感染或免疫力下降则会侵入呼吸道黏膜、血液及脑脊液引起感染而出现临床症状。与本院 2014 年所分离到的流感嗜血杆菌来自下呼吸道标本、血液及尿道分泌物标本中的结果相符。

流感嗜血杆菌是 CAP、AECG 常见致病菌之一,但在本研究中共检出该菌的患者主要以住院患者为主,占 98.6%,而门诊患者却很少,可能的原因是流感嗜血杆菌耐药率低,门诊患者自己经验性滥用抗菌药物或临床医生经验性使用抗菌药物过多有关,从而造成门诊阳性率偏低;但这从另一方面反映了在抗菌药物使用前采集合格的标本及合理使用抗菌药物的重要性;本研究中检测的 438 株流感嗜血感染主要来自儿童(占 40.18%)及老年患者(占 44.29%),老年患者所占比例略高于儿童患者。以上结果很好地证明了流感嗜血杆菌是 CAP、AECG 常见致病菌之一,且由于儿童及老年患者的抵抗力较弱,所以感染率相对较高,与中国大部分地区相似^[1-4]。

在体外药敏试验中,对流感嗜血杆菌耐药率最高的为复方

磺胺甲噁唑, 达 82.90%, 且儿童组(88.80%)的耐药率要高于成人组(79.40%); 其次为氨苄西林, 占 43.40%, 儿童组(42.40%)和成人组(44.40%)差别不大。青霉素类抗菌药物原为治疗流感嗜血杆菌的首选药物, 但是由于临床抗菌药物的不合理使用, 从而导致耐氨苄西林的耐药株不断增加, 给诊断和治疗带来了一定的困难, 所以本地区现不宜用氨苄西林和复方磺胺甲噁唑作为流感嗜血杆菌感染的经验性用药。而其他的抗菌药物, 如头孢呋辛、头孢曲松、环丙沙星、阿奇霉素、亚胺培南的耐药率均较低, 对于流感嗜血杆菌感染, 上述药物均有很好的抗菌活性, 可以适当选择, 但喹诺酮类药物会影响儿童软骨发育, 且由于有很强的诱导耐药性, 一般不推荐用于 18 岁以下患者。

流感嗜血杆菌的耐药性主要是由于 β -内酰胺酶的产生、青霉素结合蛋白的改变, 以及细胞膜对抗菌剂通透性的改变所引起。流感嗜血杆菌对氨苄西林的耐药于 1972 年首先在欧洲报道, 主要耐药机制是产生质粒介导的 β -内酰胺酶, 有 90% 以上为 TCYM-1 型基因, 少数为 ROB-1 型基因^[5], β -内酰胺酶可灭活氨基青霉素、羧基青霉素和脲基青霉素。在氨苄西林耐药菌株中, 有 3 株未检测出 β -内酰胺酶, 本试验中 β -内酰胺酶的检出率为 1.57%, 与国外报告的 β -内酰胺酶阴性菌的氨苄西林耐药率接近^[6], 耐药性通常是由于一种或多种青霉素结合蛋白的改变和外膜蛋白通透性下降所引起, 且影响所有的 β -内酰胺酶类药物, 但各菌株的耐药水平有差异。这些菌株所致感染的临床治疗结果不确定, 其耐药机制有待进一步研究^[7-8]。

综上所述, 流感嗜血杆菌对氨苄西林的耐药率有增高趋势, 在用药过程中应进行细菌培养, 及时调整抗菌药物, 微生物室应通知临床医生合理使用抗菌药物, 应重视和加强流感嗜血杆菌的培养及耐药性监测工作, 特别对于儿童和老年患者, 进

行细菌培养对提高其患者治愈率, 延缓细菌耐药性具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 836-839.
- [2] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(5): 321-329.
- [3] 陈东科, 孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 469-478.
- [4] 张泓, 恐青, 王传清, 等. 2010 年中国 CHINET 流感嗜血杆菌及卡他莫拉菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(3): 180-184.
- [5] Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, et al. Global distribution of TCYM-1 and ROB-1 beta-lactamases in Haemophilus influenza[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(4): 773-776.
- [6] Saikia KB, Bewal RK. Characterization of nasopharyngeal isolates of type b Haemophilus influenzae from Delhi[J]. Indian J Med Res, 2012, 136(5): 855-861.
- [7] 闵小春, 罗少锋, 王威, 等. 流感嗜血杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(15): 3665-3667.
- [8] 杨进, 卢先雷, 罗宇鹏. 痰液细菌学检验的标准化操作程序初探[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(2): 7-12.

(收稿日期: 2015-06-02)



(上接第 332 页)

- [2] Shenoy V, Mehendale V, Prabhu K, et al. Correlation of serum homocysteine levels with the severity of coronary artery disease[J]. Indian J Clin Biochem, 2014, 29(3): 339-344.
- [3] Qin X, Huo Y, Xie D, et al. Homocysteine-lowering therapy with folic acid is effective in cardiovascular disease prevention in patients with kidney disease: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 2013, 32(5): 722-727.
- [4] Motegi S, Toki S, Yamada K, et al. Elevated plasma homocysteine level is possibly associated with skin sclerosis in a series of Japanese patients with systemic sclerosis[J]. J Dermatol, 2014, 41(11): 986-991.
- [5] Nishi A, Numata S, Tajima A, et al. Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia[J]. Schizophrenia Bull, 2014, 40(5): 1154-1163.
- [6] 中国鼻咽癌临床分期工作委员会. 鼻咽癌'92 分期修订工作报告[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2009, 18(1): 2-6.
- [7] 白鹏, 罗雁, 李英, 等. 基于滤纸微孔板的酶联免疫吸附测定方法研究[J]. 分析化学, 2013, 41(1): 20-24.
- [8] 鄢盛恺, 宋耀虹, 张春玲, 等. 荧光偏振免疫法检测血浆同型半胱氨酸水平的临床评价[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(1): 11-14.
- [9] Głowacki R, Borowczyk K, Bald E. Fast analysis of wine for total homocysteine content by high-performance liquid chromatography[J]. Amino Acids, 2012, 42(1): 247-251.

- [10] 符俊超, 邸玉玮, 郑卫东, 等. 循环酶法检测同型半胱氨酸的性能验证分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(13): 1913-1915.
- [11] 顾炳权, 王多宁. 血浆同型半胱氨酸水平及临床诊断意义[J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(4): 630-634.
- [12] Aleksic D, Djokic D, Golubicic I, et al. The importance of the blood levels of homocysteine, folic acid and vitamin B12 in children with malignant diseases[J]. J BUON, 2013, 18(4): 1019-1025.
- [13] 张少华, 梁健智, 黄雄伟. 血清同型半胱氨酸水平变化在原发性肝癌中的临床价值[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(12): 2580-2581.
- [14] Pirouzpanah S, Taleban FA, Mehdipour P, et al. Plasma total homocysteine level in association with folate, pyridoxine, and cobalamin status among Iranian primary breast cancer patients[J]. Nutr Cancer, 2014, 66(7): 1097-1108.
- [15] 魏凯, 黄毅超. 血浆同型半胱氨酸、叶酸和维生素 B₁₂ 水平与非小细胞肺癌的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 699.
- [16] 薛莉, 陈树兰, 贾绍斌, 等. 同型半胱氨酸与冠心病的相关性及其机制探讨[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(9): 11-15.
- [17] Chen Y, Zhao S, Wang Y, et al. Homocysteine reduces protein S-nitrosylation in endothelium[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(5): 1277-1285.
- [18] 董燕燕, 陈光亮. 高同型半胱氨酸血症危害及致病机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(9): 1205-1208.
- [19] 李志强, 张建平, 赵明. 高同型半胱氨酸血症患者超敏 C 反应蛋白水平、血小板聚集率与同型半胱氨酸水平的相关性研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014(13): 38-40.

(收稿日期: 2015-09-28)