

【临床研究】

作者简介:周艳君(1983-),女,河南禹州人,硕士,主管技师,研究方向:临床医学检验诊断。

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, Hi)是一种寄居于人类上呼吸道的苛养菌,又属于条件致病菌,可引起成人和儿童社区获得性肺炎、鼻窦炎和化脓性中耳炎等,是目前引起细菌性肺炎最常见、最主要的致病菌^[1-2],在冬春季节感染率最高。近年来,随着广谱抗生素的广泛应用,多重耐药率也随之增加^[3],从而给临床的抗感染治疗带来极大困难。而Hi对氨苄西林的耐药性呈逐年上升趋势,已引起临床高度重视^[4-5]。本研究回顾性分析新乡医学院第一附属医院2011~2015年临床分离的Hi,根据年龄分组、标本分组、科室分组,观察其分布特征,并对其血清学分型、 β -内酰胺酶检测和耐药性分析,希望能为本地区Hi感染的相关性疾病的防治提供流行病学依据,对临床合理选择抗菌药物提供参考。现将分析结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 849株Hi均来源于2011~2015年新乡医学院第一附属医院各临床科室住院患者送检的合格痰液、血液、脑脊液、咽拭子等标本。其中男558例,女291例;年龄1个月至78岁,未成年人(<18岁)596例,成年人(≥ 18 岁)253例,根据年龄分为5组: ≤ 1 岁组、2~6岁组、7~17岁组、18~49岁组和 ≥ 50 岁组。患者临床表现为咳嗽、流涕、发热、头疼、呕吐等,临床诊断为肺炎、毛细支气管炎、鼻窦炎、扁桃体炎、菌血症、脑膜炎等。

1.2 试剂和仪器 血平板、嗜血型巧克力平板(2.5×10^3 U \cdot L⁻¹去甲万古霉素)和普通型巧克力平板购自郑州安图生物公司,抗菌药物纸片和测定 β 内酰胺酶的头孢硝噻吩试剂购于英国OXOID公司,革兰染液由实验室自配(每批染液均由标准菌株做质控),体积分数5% CO₂ CHP160温箱购自上海市三发科学仪器有限公司,BACTEC-FX自动血培养仪购自美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有临床标本严格按操作规范进行采集^[6]。痰液标本:取清晨漱口后第1口痰液,置于无菌加盖广口瓶中,立即送检。咽拭子标本:漱口后,用无菌棉签粘取咽部标本,放于无菌加盖广口瓶中,立即送检。血液标本:在患者接受抗生素治疗前、寒战时或发热初期采集外周静脉血,采用乙醇—碘附—乙醇三步法消毒皮肤,按照血液与培养基1/10~1/5的比例采集,成人需氧瓶、厌氧瓶需接种5~8 mL血液,儿童瓶需接种1~3 mL血液。脑脊液标本:采用腰椎穿刺术无菌采集脑脊液标本,按照实际抽取标本量选择合适的血培养瓶。所有样本送

检时间控制在2 h之内。

1.3.2 标本接种、分离培养 痰液和咽拭子标本:首先进行痰涂片,经革兰染色后观察细胞及细菌种类、数量,依据《全国临床检验操作规程(第4版)》标准判断标本是否符合要求^[7],判断标准:每低倍镜视野上皮细胞<10个,白细胞>25个判断为合格。合格的痰液标本和其他类型判断无污染的标本,采用三区分区划线法接种于血平板和嗜血型巧克力平板,放于35℃、体积分数5% CO₂温箱培养18~24 h。血液和脑脊液标本:直接上机培养,培养周期为5 d,严格按照BACTEC-FX自动血培养仪操作说明执行。红色报警提示阳性瓶出现,查看阳性曲线,按仪器提示取下阳性瓶,用1 mL无菌注射器抽吸培养瓶内阳性培养物,采用三区分区划线法,将阳性培养物分别无菌转种于血平板、巧克力平板上,然后将培养基放于35℃、体积分数5% CO₂温箱培养18~24 h;绿色报警提示阴性,培养周期已到,直接取下培养瓶。

1.3.3 菌落涂片及染色镜检 用接种环挑取血平板上不生长、嗜血型巧克力平板上生长的灰色、透明或半透明、扁平、湿润、易乳化、露滴状的细小菌落(菌落具有刺鼻的碱味),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。油镜下可见具有多形性的革兰阴性球杆菌(点状、小杆状或细丝状),判断疑似Hi。

1.3.4 卫星试验 点种质控菌株金黄色葡萄球菌,对上述疑似Hi的菌落进行V因子、X因子检测。实验操作严格遵照《全国临床检验操作规程(第4版)》^[7]。

1.3.5 β -内酰胺酶检测 采用英国OXOID公司提供的头孢硝噻吩纸片显色法检测。将纸片湿润,用接种环将被检菌置于头孢硝噻吩滤纸片上,观察纸片颜色变化,10 min内由黄色变为红色者判断为阳性,提示此菌产生 β -内酰胺酶;不变色者则为阴性。每批实验做阳性对照。实验严格按照试剂盒操作说明书的要求执行。

1.3.6 血清学分型 根据其有无荚膜分为定型株和不定型株,无荚膜株称为不定型Hi(nontypeable Hi, NTHi),有荚膜株称为定型株,根据其荚膜多糖抗原成分及结构的不同,Hi分为a、b、c、d、e、f 6个血清型。试验采用玻片凝集法:先制备菌液,再取10 μ L Hi菌液于玻片上,加入等量的各型特异性抗血清(a、b、c、d、e、f)与之混匀,1 min之内,若出现肉眼可见凝集者,即判定为相应的血清型;都不凝集者,则判定为NTHi。

1.3.7 药物敏感性试验 采用Kirby-Bauer(K-B)

法。分别在普通型巧克力平板上进行氨苄西林、复方磺胺甲噁唑、头孢噻肟、左氧氟沙星等 18 种抗菌药物的敏感性试验。按美国临床实验室标准化协会 2014 年发布的相关标准^[8]判定实验结果。根据此标准分为耐药 (resistance, R)、中介 (intermedium, I) 和敏感 (sensitive, S)。

1.4 质控菌株 质控菌株为 Hi ATCC49247 和 ATCC49766,金黄色葡萄球菌 ATCC25923,均由河南省临床检验中心提供。

1.5 统计学处理 应用 WHONET 5.5 和 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计数资料以百分比表示,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 菌株分离情况 共分离出 Hi 849 株,随着 2011~2015 年各年度标本量逐年增多,临床病原菌分离株也不断增多,Hi 检出率也不断增加;2011~2015 年各年份 Hi 检出率 (Hi 检出株数/总株数) 依次为 0.3% (14/5 143)、1.1% (68/6 211)、1.8% (140/7 543)、2.2% (214/9 770)、4.6% (413/9 067)。

2.2 菌株临床分布情况 临床分离的 849 株 Hi 中,男 558 株 (65.7%),女 291 株 (34.3%);未成年人 (<18 岁)596 株 (70.2%),成年人 (≥18 岁)253 株 (29.8%);年龄分组:≤1 岁组 420 株 (49.6%),2~6 岁组 131 株 (15.5%),7~17 岁组 45 株 (5.1%),18~49 岁组 102 株 (12.0%),≥50 岁组

151 株 (17.8%);主要集中分布在 ≤1 岁和 ≥50 岁 2 个年龄段;不同临床标本分布:痰液分离出 834 株 (98.2%),血液分离出 8 株 (1.0%),脑脊液分离出 5 株 (0.6%),咽拭子分离出 2 株 (0.2%),其中以痰液标本分离率最多;不同临床科室分布:小儿内科 539 株 (63.5%),呼吸科 62 株 (7.3%),结核科 106 株 (12.5%),儿科重症监护病房 62 株 (7.3%),重症监护病房 15 株 (1.7%),外科病房 12 株 (1.4%),其他科室 53 株 (6.3%),其中小儿内科占比例最高。

2.3 Hi β-内酰胺酶检出情况 对临床分离的 849 株 Hi 进行 β-内酰胺酶检测,其中成年人 (≥18 岁) 分离株和未成年人 (<18 岁) 分离株的 β-内酰胺酶检出率分别为 28.1% (71/253) 和 41.4% (247/596),总检出率 37.4% (318/849)。2 组 β-内酰胺酶检出率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。所有产酶株对氨苄西林均耐药。

2.4 Hi 血清学分型情况 849 株 Hi 血清学分型结果显示,检出 NTHi、a 型、b 型分别为 725、121、3 株,分别占 85.4%、14.3%、0.3%,其余血清型尚未检出。

2.5 Hi 耐药情况 结果见表 1。Hi 对氨苄西林、复方新诺明、四环素、利福平、氯霉素的耐药率较高,并呈逐年升高趋势,2015 年耐药率分别为 78.7%、88.8%、83.9%、72.2%、51.5%;对头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟的耐药率也逐渐增高;对抗生素左氧氟沙星、环丙沙星、莫西沙星、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美洛配能较为敏感,2015 年耐药率分别为 0.9%、3.6%、4.6%、10.8%、14.0%、12.0%。

表 1 流感嗜血杆菌对常规抗生素的耐药情况

Tab.1 Resistance of Haemophilus influenzae to the routine antibiotics

抗菌药物	2011 年		2012 年		2013 年		2014 年		2015 年	
	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%
氨苄西林	38.5	58.2	36.2	55.7	41.2	58.3	66.4	31.2	78.7	15.1
左氧氟沙星	0.0	100.0	4.4	95.6	0.7	99.3	0.5	99.5	0.9	99.1
环丙沙星	7.7	92.3	5.9	94.1	0.7	99.3	0.5	99.5	3.6	96.4
氨曲南	14.3	85.7	19.1	79.4	18.4	81.6	23.4	76.6	28.0	71.3
头孢噻肟	21.4	78.6	27.9	72.1	20.4	79.6	23.4	76.6	32.0	68.0
头孢他啶	7.1	92.9	23.5	76.5	21.7	78.3	32.8	67.2	42.0	58.0
头孢吡肟	11.2	88.8	21.5	78.5	34.4	65.6	33.8	66.2	46.0	54.0
头孢曲松	13.3	86.7	26.7	73.3	28.8	71.2	31.1	68.9	48.8	51.1
莫西沙星	4.3	95.7	1.5	98.5	0.7	99.3	1.1	98.9	4.6	95.4
阿莫西林/克拉维酸	21.4	78.6	27.9	72.1	24.8	75.2	26.8	73.2	39.1	60.9
氨苄西林/舒巴坦	23.1	76.9	25.5	74.5	20.4	79.6	18.3	71.7	30.8	69.2
哌拉西林/他唑巴坦	0.0	100.0	0.0	100.0	12.4	87.6	18.2	81.8	10.8	89.2
复方新诺明	41.7	58.3	79.4	20.6	70.7	29.3	74.6	25.4	88.8	11.2
氯霉素	20.0	80.0	35.3	63.2	38.4	61.4	47.3	52.7	51.5	48.5
利福平	61.4	38.6	60.3	34.9	63.1	36.2	53.2	46.8	72.1	21.6
四环素	57.7	41.7	61.8	36.8	79.3	20.7	84.9	15.1	83.9	15.9
亚胺培南	0.0	100.0	6.2	93.4	9.0	91.0	12.3	87.7	14.0	86.0
美洛配能	0.0	100.0	0.0	100.0	5.4	94.6	11.4	88.6	12.0	88.0

3 讨论

Hi 是一类无芽孢、无鞭毛,呈球杆状、长杆状、丝状、点粒状等多形性的革兰阴性短小杆菌,1892 年,波兰细菌学家 Pfeiffer 首次分离出此菌,之后在世界范围内,Hi 被不断检出。Hi 的主要传播方式是空气传播、飞沫传播、密切接触,通常可引起肺炎、中耳炎、会厌炎、扁桃体炎、败血症、化脓性脑膜炎等的原发和继发性感染,在我国主要以肺炎和扁桃体炎多见。有报道显示,Hi 在健康者上呼吸道的定植率可达 50%^[9]。因此,要想查清是定植还是感染,必须对下呼吸道标本进行严格镜检,以判断标本是否符合要求^[10]。患者抵抗力下降时,尤其是合并慢性支气管炎、慢性阻塞性肺病等基础性疾病时,Hi 将移位侵入到下呼吸道,从而加重基础疾病的病情。标本送检时应注意,Hi 很脆弱,离体后容易死亡,因此,留取标本后应立即送检,及时接种;分离培养时应选用专用的嗜血型巧克力培养基,Hi 属于苛养菌,需在体积分数 5% 的 CO₂ 环境下才能生长良好,注意观察 CO₂ 罐的压力情况,保证生长所需的营养;药物敏感性试验时应严格按照操作规程试验,依据最新美国临床实验室标准化协会发布的判断标准报告各种抗生素的敏感性和耐药性。

本研究结果显示,2011~2015 年 Hi 的检出株、检出率逐年增多,尤其是 2014、2015 年,其在临床病原菌分离株中所占比例也逐年增高。从发病年龄来看,Hi 主要集中在小儿(≤1 岁组 420 株,49.6%)和老年人(≥50 岁组 151 株,17.8%),此种群体机体抵抗力差。作为条件致病菌(正常情况下其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),在适当条件下(如病毒感染或免疫力下降时)会侵入到呼吸道黏膜、血液、脑脊液,从而引起相应部位的感染并出现一系列临床症状,应引起临床和检验部门的高度重视。本研究检出的 849 株 Hi,主要来自痰液标本(834 株,占 98.2%),与文献报道一致^[11-12]。从检出科室观察,以小儿内科为主,占 63.5%,其次结核内科,占 12.5%。查阅临床资料证实,病原菌检出结果与患者实际感染状况相符。由于其在结核科的检出率增高,因此,除了重视儿科患者外,应加强结核科患者 Hi 的培养。

血清学分型是研究 Hi 致病性和流行病学的重要基础,其中 Hib 型是目前公认为毒力最强、危害最大的一型。随着 Hib 型疫苗在全球覆盖率的增加,Hib 型的感染率显著下降,其他各型逐渐上升^[13]。国内不同地区、不同人群分离出的血清型存在差异^[14-15]。本研究分离出 NTHi、Hia、Hib 血清型分别

为 725、121、3 株,NTHi 型最多,占 85.4%,也要重视 Hia、Hib 型感染。报道显示,Hib 疫苗使用前,Hi 引起的感染较为严重,病死率高,几乎所有死亡病例为 5 岁以下儿童,严重威胁少年儿童的健康^[16-17]。Hib 型疫苗对其他各型无交叉免疫作用,对于 Hib 的预防主要依赖化学预防,研究新型、稳定、高效、多价疫苗已成为预防 Hi 感染的一项重要任务。

本研究对 Hi 的耐药性研究结果显示,Hi 对氨苄西林、复方新诺明、四环素、利福平、氯霉素的耐药率较高,不作为本地区常规选择用药,到 2015 年分别升为 78.7%、88.8%、83.9%、72.2%、51.5%。 β -内酰胺类抗菌药物(如阿莫西林和氨苄西林)是治疗 Hi 感染的首选药物,疗效较好,由于临床长期、大量应用,导致耐药株出现,1972 年检出第 1 例氨苄西林耐药株,随后在全球不断被检出^[18-20]。国内各地区耐药率不一,差异较大^[21-23]。主要耐药机制是产生 β -内酰胺酶后破坏抗生素的结构,使其失活;产生大量青霉素结合蛋白,降低抗生素的亲合力以及依靠菌膜的特性降低药物的通透性,改变抗生素作用的靶点,抑制菌膜与药物的结合^[24]。本研究 Hi 对氨苄西林的耐药率由 2011 年的 38.5% 升高到 2015 年的 78.7%,与其他报道差别不大^[25-26],引起关注和深思。ZHU 等^[27]报道北京地区 Hi 对氨苄西林敏感率由 2000 年的 96% 降至 2012 年的 61% 的同时,但产 β -内酰胺酶率由 4% 上升至 31%,虽为不同地区,本组结果(总产酶率 37.4%)与之较一致。由 β -内酰胺酶所致,氨苄西林/舒巴坦的耐药率由 23.1% 增至 30.8%,比报道高^[27]。磺胺类药物(如复方新诺明)主要是通过改变甲氧苄啶与二氢叶酸还原酶的亲和力而发生耐药,过去曾广泛应用于 Hi 的治疗,大量应用后耐药率会增高,本研究应用复方新诺明耐药率高达 88.8%,比报道的高^[28]。氯霉素具有很好的穿透力,是治疗 Hi 所致脑膜炎的首选药物,本报道其耐药率达 51.5%,在呼吸道疾病检出时,临床用药应谨慎。左氧氟沙星、环丙沙星、莫西沙星、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美洛配能作为敏感性较高(敏感性在 80% 以上)的药物,可为临床选用,尤其是左氧氟沙星、环丙沙星、莫西沙星,敏感性在 90% 以上,可首先考虑;而哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美洛配能的耐药率分别由 2011 年的 0.0% 升高到 2015 年的 10.8%、14.0%、12.0%,应引起重视。

本研究回顾性分析了新乡医学院第一附属医院 2011~2015 年 Hi 的临床分布、流行趋势、耐药性变迁,随着年份的增加,Hi 所占的临床分离株比例越来越高,对抗生素的耐药率也逐渐增高,将慢慢成为

肺炎、扁桃体炎等的主要致病原因,临床应重视 Hi 的培养,避免漏检,找出真正致病原因。同时,应掌握其耐药变化,依据患者药物敏感性试验报告,合理用药,避免盲目用药或滥用药物^[29]。5 a 的耐药变迁数据可为豫北地区 Hi 感染的防治提供流行病学资料。

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]. *Clin Infect Dis*,2009,48 (suppl 2): 147-152.

[2] 唐晓燕,郭喜霞,徐亚丽,等. 豫北儿童诊疗中心肺炎住院患儿细菌病原学分析[J]. 新乡医学院学报,2016,33(5):411-413.

[3] 阮兆娟,左国营. 抗生素的联合应用对细菌耐药突变选择窗影响的研究进展[J]. 中国医疗前沿,2013,8(23):20.

[4] 杨晓华. 儿童呼吸道流感嗜血杆菌的耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):436-439.

[5] 张泓,孔菁,王传清,等. 2010 年中国 CHINET 流感嗜血杆菌和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.

[6] 倪语星,尚红. 临床微生物学检验[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2012:22-27.

[7] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2014:180-184.

[8] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Twentyfourth Informational Supplement,2014:M100-S24.

[9] VAN E J,SLACK M P E,LADHANI S,et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae*,an under-recognised pathogen[J]. *Lancet Infect Dis*,2014,14(12):1281-1292.

[10] HINZ R,ZAUTNER A E,HAGEN R M,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.

[11] 杨勇文,李从荣. 某院 2012~2015 年流感嗜血杆菌分布特征及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2016,13(13):1745-1749.

[12] 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.

[13] 沈徐庄. b 型流感嗜血杆菌疾病及疫苗[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(20):1535-1536.

[14] 景春梅,王恩. 2009~2013 年重庆地区儿童感染流感嗜血杆

菌的耐药性及血清型分析[J]. 第三军医大学学报,2014,36(23):2400-2403.

[15] 周凯,李立群,徐飞,等. 小儿下呼吸道流感嗜血杆菌感染的血清分型及耐药分析[J]. 现代预防医学,2016,43(4):643-645.

[16] 俞桑洁. 我国儿科流感嗜血杆菌耐药分析[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(1):16-19.

[17] 刘东华,胡艳华,王少敏. 5 岁以下儿童呼吸道感染流感嗜血杆菌血清学分型及耐药性分析[J]. 儿科学杂志,2014,20(12):27-29.

[18] 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.

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

[20] TRISTRAM S,JACOBS M R,APPELBAUM P C. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* [J]. *Clin Microbiol Rev*,2007,20(2):368-389.

[21] 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.

[22] 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.

[23] XIAO Y H,WEI Z Q,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.

[24] 桂和翠,王中新,沈纪. 流感嗜血杆菌的耐药性及耐药机制[J]. 安徽医药,2011,15(12):1471-1474.

[25] 罗宇鹏. 2014 年成都某院流感嗜血杆菌的临床分布及耐药分析[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(3):333-335.

[26] 隆丰厚,艾文卫,唐孝志,等. 流感嗜血杆菌成人呼吸道临床感染特点与耐药性分析[J]. 实用预防医学杂志,2014,21(11):1370-1371.

[27] ZHU H,WANG A,TONG J,et al. Nasopharyngeal carriage and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* among children younger than 5 years of age in Beijing,China[J]. *BMC Microbiol*,2015,15(1):6.

[28] 陈伟,刘文恩,李艳明,等. 流感嗜血杆菌分布及耐药性分析[J]. 临床检验杂志,2013,31(6):469-471.

[29] 王爱华. 流感嗜血杆菌感染与耐药[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(4):256-258.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)