

• 临床检验研究论著 •

阿奇霉素非敏感嗜血杆菌的分离及其药敏试验观察

朱海平, 易思华, 张 羿, 姚立琼, 陈保锦, 金凤玲[△]

(兰州大学第一医院检验科, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 了解 2008~2011 年阿奇霉素非敏感嗜血杆菌的分离情况及药敏试验特点, 为临床治疗提供依据。方法 统计分析 2008~2011 年本院临床送检呼吸道标本阿奇霉素非敏感嗜血杆菌分离情况, 分析其对常用抗菌药物的药敏试验结果, 并与阿奇霉素敏感菌株进行对比观察。结果 22 986 份呼吸道标本, 分离嗜血杆菌 1 900 株, 其中阿奇霉素非敏感菌株共计 389 株, 分离率为 21.48%, 4 年间呈逐年上升趋势; 阿奇霉素非敏感嗜血杆菌菌株构成以副流感嗜血杆菌为主, 占 79.18%, 而流感嗜血杆菌只占 20.82%。阿奇霉素非敏感流感嗜血杆菌对阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛 3 种抗菌药物的耐药率高于副流感嗜血杆菌, 且两种嗜血杆菌对头孢曲松、头孢泊肟、氨曲南、美罗培南和左氧氟沙星均表现敏感性降低。2008~2011 年间阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率逐年增高; 与敏感菌株相比, 流感嗜血杆菌非敏感株对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢曲松、氨曲南、左氧氟沙星耐药率或非敏感率显著增高; 而对于副流感嗜血杆菌, 非敏感菌株对试验药物耐药率或非敏感率均显著增高。结论 嗜血杆菌阿奇霉素非敏感菌株逐年增加, 其对常用抗菌药物的耐药率或非敏感率均高于阿奇霉素敏感株。

关键词:嗜血菌属; 阿奇霉素; 抗药性; 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)15-1815-03

Analysis of antibiotics susceptibility and isolation of Haemophilus unsusceptible to azithromycin

Zhu Haiping, Yi Sihua, Zhang Yi, Yao Liqiong, Chen Baojin, Jin Fengling[△]

(The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To evaluate the status and antimicrobial susceptibility of azithromycin unsusceptible haemophilus strains isolated from respiratory tract infection from 2008 to 2011, to provide a basis for clinical treatment. **Methods** Azithromycin unsusceptible haemophilus strains isolated from respiratory tract specimens from 2008 to 2011 was analyzed by statistic methods, and their susceptibility to commonly used antibiotics was analyzed and compared with azithromycin susceptible strains. **Results** 1 900 haemophilus isolated from 22 986 respiratory specimens, among which 389 strains were azithromycin unsusceptible haemophilus, with isolation rate of 21.48%, and isolation rate had the trend to ascend during the four years. In 389 azithromycin unsusceptible haemophilus, Haemophilus parahaemolyticus accounted for 308 (79.18%), Haemophilus influenzae only accounted for 81 (20.82%). The resistant rate of azithromycin unsusceptible Haemophilus influenzae to amoxicillin/Clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cefuroxime was higher than that of azithromycin unsusceptible Haemophilus parahaemolyticus, and both of them were with reduced susceptibility to ceftriaxone, cefpodoxime, aztreonam, meropenem, levofloxacin. The resistant rate of azithromycin unsusceptible haemophilus to ampicillin increased year by year from 2008 to 2011. Compared with susceptible strains, azithromycin unsusceptible Haemophilus influenzae had a significantly higher resistant rate or unsusceptible rate to ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, aztreonam, levofloxacin. But for Haemophilus parahaemolyticus, azithromycin unsusceptible strains had a notable higher resistant and unsusceptible rate to the test antimicrobials. **Conclusion** Azithromycin unsusceptible haemophilus might increase year by year, with high resistant and unsusceptible rate to commonly used antibiotics.

Key words: Haemophilus; azithromycin; drug resistance, bacterial

嗜血杆菌属是专性寄生于人和动物咽喉及口腔黏膜的苛养性细菌, 可引起原发性化脓性感染及严重的继发感染。该菌属对营养要求严格, 人工培养时需供给新鲜血液才能生长, 故名“嗜血杆菌”。以往资料显示该菌属对大多数抗菌药物敏感, 对红霉素等大环内酯类药物不敏感。然而阿奇霉素作为 15 环大环内脂类药物, 对革兰阴性杆菌具有较高的活力, 尤其对流感嗜血杆菌体内外的抗菌活性都强。关于嗜血杆菌对阿奇霉素的敏感性试验, 美国临床和实验室标准化研究所 (CLSI) 只提供了敏感解释标准且提示非敏感株罕见, 现有资料对非敏感菌株报道不多。但近几年来笔者屡次分离到对阿奇霉素敏感性降低的嗜血杆菌, 药敏试验呈现非敏感结果。回顾 2008~2011 年 4 年间本院阿奇霉素非敏感嗜血杆菌分离及其药敏试验, 汇总报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 2008 年 1 月至 2011 年 12 月, 本院临床送检的 22 986 份呼吸道标本(痰液、咽拭子、肺泡灌洗液)中分离的嗜血杆菌; 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 用于卫星试验。

1.1.2 培养基及添加剂 哥伦比亚琼脂、MH 琼脂干粉为英国 OXOID 公司产品, 用于血平板、巧克力平板和 HTM 琼脂制备; 氯化血红素为南京奥多福尼生物科技有限公司产品, 4℃冰箱保存; 辅酶 I 为苏州工业园区亚科学试剂有限公司产品, 4℃冰箱保存; 痰消化液 SPUTASOL 为英国 OXOID 公司产品。

常规配制血琼脂、含万古霉素选择性巧克力琼脂、M-H 琼脂及 HTM 琼脂培养基; 痰消化液按照说明稀释为应用液, 避光 4℃冰箱保存备用。

1.1.3 试剂与药敏纸片 药敏试验纸片氨苄西林 (AMP, 10 μg)、氨曲南 (ATM, 30 μg)、头孢曲松 (CRO, 30 μg)、头孢泊肟 (CPD, 10 μg)、阿奇霉素 (AZI, 15 μg)、阿莫西林-克拉维酸

[△] 通讯作者, E-mail: jfljhk@163.com。

(AMC, 30 μg)、头孢呋辛(CXM, 30 μg)、美罗培南(MEM, 10 μg)、复方新诺明(SXT, 25 μg)、左氧氟沙星(LEV, 5 μg)、氨苄西林/舒巴坦(SAM, 20 μg)、氯霉素(ChL, 30 μg)均为英国 OXOID 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 样本筛选、液化和接种 痰液标本先涂片、革兰染色后镜检进行筛选,镜下鳞状上皮细胞不超过 10 个/低倍视野,白细胞至少 25 个/低倍视野为合格标本,同时观察标本细菌构成并记录结果。合格痰液中加入等量痰消化液,振荡使两者充分接触,放置 37℃培养箱内 30 min 使痰液完全液化,接种于血琼脂平板、巧克力平板,置于 5%~7%二氧化碳孵箱 37℃培养 18~24 h 后观察结果。

1.2.2 菌种鉴定 血平板上一般不生长,巧克力琼脂平板上生长直径 1~2 mm 大小的菌落,无色或灰白色,圆形、湿润、光滑或粗糙、透明或半透明(也可呈露滴样),有特殊气味,即为可疑嗜血杆菌菌落。挑取可疑菌落涂片,经革兰染色为革兰阴性细小杆菌,可呈球杆状或双球状,也可呈长杆状或丝状。

1.2.3 卫星试验 挑取上述可疑菌落,浓密连续划线分别接种于血琼脂平板、MH 平板上,然后取金黄色葡萄球菌 ATCC25923 与之垂直接种,于二氧化碳孵箱 37℃培养 24 h 后观察结果。如见葡萄球菌划线邻近处菌落较大,而远离金黄色葡萄球菌的菌落小或不生长,即为“卫星现象”,结合涂片结果可初步鉴定为嗜血杆菌属。若血琼脂平板“卫星现象”阳性,而 M-H 琼脂平板“卫星现象”阴性,即为流感嗜血杆菌;血琼脂平板、M-H 琼脂平板“卫星现象”均呈阳性,则为副流感嗜血杆菌。

1.2.4 药敏试验 采用 K-B 法,按照 CLSI 标准程序进行。挑取可疑菌落,在无菌生理盐水中制备成 0.5 麦氏单位的菌悬液,用棉签沾取后均匀涂抹于 HTM 平板上,用药敏纸片分配器加贴药敏纸片,于二氧化碳孵箱 37℃培养 24 h 后读取抑菌环直径,结果按 CLSI 指南判读,解释为敏感、中介、耐药、非敏感。

1.2.5 统计学处理 用 WHONET 5.5 软件统计嗜血杆菌临床流行病学特征和药敏试验结果,用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计学处理, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 年间年本院呼吸道标本 22 986 份,分离出嗜血杆菌 1 900 株,总分离率为 8.26%,2008、2009、2010、2011 年分离率分别为 7.21%、7.66%、9.95% 和 8.00%。1 900 株嗜血杆菌中,流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌占据绝大多数,共分离 1 888 株,剩余 12 株为溶血嗜血杆菌。其中流感嗜血杆菌 588 株,构成比为 30.94%(588/1 900),分离率为 2.56%(588/22 986);副流感嗜血杆菌为 1 300 株,构成比为 68.42%(1 300/1 900),分离率为 5.66%(1 300/22 986),副流感嗜血杆菌分离率显著高于流感嗜血分离率($P<0.01$),见表 1。

2.2 阿奇霉素非敏感嗜血杆菌分离 1 888 株流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌中,剔除未进行阿奇霉素药敏试验的 77 株嗜血杆菌(流感嗜血杆菌 30 株、副流感嗜血杆菌 47 株)后,以 1 811 株嗜血杆菌(流感嗜血杆菌 558 株、副流感嗜血杆菌 1 253 株)作为实验菌株,筛选出阿奇霉素非敏感嗜血杆菌共 389 株,嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感率为 21.48%(389/1 811)。2008、2009、2010、2011 年阿奇霉素非敏感率分别为 16.19%、15.27%、19.86% 和 29.34%,2011 年阿奇霉素非敏感率明显增加。阿奇霉素非敏感嗜血杆菌中流感嗜血杆菌 81 株,占 20.82%(81/389),而副流感嗜血杆菌 308 株,占 79.18%(308/389);流感嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感率为 14.52%(81/558),副流感嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感率为 24.58%(308/1 253),实验结果显示副流感嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感率显著高于流感嗜血杆菌($P<0.01$),见表 2。

表 1 2008~2011 年流感、副流感嗜血杆菌分离率

年份	呼吸道标本 (n)	流感嗜血杆菌		副流感嗜血杆菌	
		株数(n)	分离率(%)	株数(n)	分离率(%)
2008	4 820	170	3.52	173	3.58
2009	4 803	183	3.81	181	3.76
2010	5 846	161	2.75	419	7.16
2011	7 517	74	0.98	527	7.01
合计	22 986	588	2.56	1 300	5.66

表 2 流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感率比较

年份	流感嗜血杆菌			副流感嗜血杆菌			P
	总株数(n)	非敏感株(n)	非敏感率(%)	总株数(n)	非敏感株(n)	非敏感率(%)	
2008	143	22	14.78	141	24	17.02	>0.05
2009	182	21	11.53	178	34	19.1	<0.05
2010	160	21	13.13	414	93	22.46	<0.05
2011	73	17	23.28	520	157	30.19	>0.05
合计	558	81	14.52	1 253	308	24.58	<0.01

2.3 阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对常用抗菌药物的药敏试验 结果显示阿奇霉素非敏感流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛 4 种药物的耐药率差异具有统计学意义,除氨苄西林外,流感嗜血杆菌对阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛 3 种抗菌药物的耐药率均高于副流感嗜血杆菌。2 种嗜血杆菌对头孢曲松、头孢泊肟、氨曲南、美罗培南和左氧氟沙星 5 种药物出现敏感性降低现象,表现为不同程度的非敏感率,但流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌差异不具有统计学意义。4 年间阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率均较高,且呈逐年增高趋势;对氨苄西林/舒巴坦耐药率较为稳定,均接近 30%;对头孢曲松、氨曲南非敏感率为 11.1%~36.4%,且 2009~2011 年逐渐升高;对美罗培南的非敏感率为 0.9%~3.7%;对

左旋氧氟沙星非敏感率四年间均保持在至少 45.1% 的高水平,可能与其口服制剂在上呼吸道感染时被大量使用有关。

2.4 阿奇霉素非敏感菌株与敏感菌株对抗菌药物耐药性对比(见表 3) 结果显示:除复方新诺明外,阿奇霉素非敏感菌株对抗菌药物耐药性均高于敏感菌株。统计学分析结果表明,流感嗜血杆菌非敏感株对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦耐药率、对头孢曲松、氨曲南、左氧氟沙星非敏感率显著高于敏感菌株;而副流感嗜血杆菌非敏感菌株对试验药物耐药率或非敏感率均显著高于敏感菌株;可见就非敏感菌株与敏感菌株耐药性而言,副流感嗜血杆菌表现更为突出。无论流感嗜血杆菌还是副流感嗜血杆菌,对美罗培南均呈现较低的非敏感率,与阿奇霉素敏感菌株相比两者无显著差异;对复方新诺明,阿奇霉素敏感菌株与非敏感菌株耐药率差异也不明显($P>0.05$)。

表 3 阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对抗菌药物耐药率

抗菌药物	流感嗜血杆菌		副流感嗜血杆菌		χ^2	P
	株数	耐药率	株数	耐药率		
	(n)	(%)	(n)	(%)		
氨苄西林	60	74.1	259	84.1	5.31	<0.05
阿莫西林/克拉维酸	13	26.0	38	14.0	4.53	<0.05
氨苄西林/舒巴坦	31	40.8	85	28.1	4.46	<0.05
头孢呋辛	20	25.9	47	15.5	3.95	<0.05
头孢曲松	13	16.2*	55	18.0*	0.13	>0.05
头孢泊肟	6	20.7*	6	13.0*	0.31	>0.05
氨曲南	20	26.7*	104	33.8*	1.39	>0.05
美罗培南	4	5.1*	6	2.0*	1.34	>0.05
左旋氧氟沙星	35	44.9*	148	47.9*	0.35	>0.05
复方新诺明	34	42.0	116	37.5	0.63	>0.05

* : 非敏感率。

3 讨 论

本研究显示 2008~2011 年随着本院呼吸道标本数量上升,嗜血杆菌的分离率也呈上升趋势。流感嗜血杆菌是嗜血杆菌中最常见的条件致病菌,是引起社区性获得性下呼吸道感染及化脓性脑膜炎的重要原因^[1]。以往认为副流感嗜血杆菌是一种上呼吸道正常菌群,但近年的多项研究证实,副流感嗜血杆菌是一种条件致病菌,并认为是下呼吸道感染和社区获得性肺炎的重要致病菌。本研究显示副流感嗜血杆菌构成比(68.42%)远高于流感嗜血杆菌(30.94%),2010、2011 两年副流感嗜血杆菌的的分离率明显高于流感嗜血杆菌,这一结果与朱泽航和蔡逸婷^[2]报道相似,但与 2010 年卫生部全国细菌耐药监测有关嗜血杆菌的报道^[3]数据不同,其原因可能与标本筛选、实验方法及临床用药等各个环节有关,有待探讨。

以往文献报道嗜血杆菌对阿奇霉素具有较高的敏感性^[4-8],近年来阿奇霉素已取代氨苄西林成为治疗嗜血杆菌感染的一线用药,阿奇霉素的大量使用,其耐药性问题也随之而来。2010 年全国监测流感嗜血杆菌对阿奇霉素耐药率为 11.3%,副流感嗜血杆菌对阿奇霉素的耐药率为 21.2%^[3]。

(上接第 1814 页)

是自制的,因此本研究的检测成本较低。在板式化学发光免疫分析中,每批次检测均需要绘制标准曲线,当临床样本量较少时,有可能存在校准品用量较大的问题,后续将研究如何实现“两点定标”或“一点定标”代替“六点定标”,以期降低检测成本。

综上所述,本研究应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 P 检测的化学方法已具备灵敏度高、检测范围宽、重复性好、稳定性高等优点,达到临床应用的要求。

参考文献

[1] Wu Y, Mitchell J, Cook C, et al. Evaluation of progesterone-ovalbumin conjugates with different length linkers in enzyme-linked immunosorbant assay and surface plasmon resonance-based immunoassay[J]. Steroids, 2002, 66(7): 565-572.

[2] Mitchell J, Wu Y, Cook C, et al. Technical note: protein conjugate-based immunoassay of whole milk progesterone[J]. J Dairy Sci, 2004, 87(9): 2864-2867.

[3] Wu Z, Xu L, Tu Y, et al. The relationship between the symptoms of female gonococcal infections and serum progesterone level and the genotypes of multi-antigen sequence type(NG-MAST) in Wuhan, China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30: 113-116.

[4] Abdul-Hussein MM, Abdul-Rasheed OF, Al-Moayed HA. The values of CA-125, progesterone, β -HCG and estrADiol in the early predic-

而本次研究显示流感嗜血杆菌对阿奇霉素的非敏感率为 14.52%,而副流感嗜血杆菌对阿奇霉素的非敏感率为 24.58%。

药敏实验结果显示,阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对常用抗菌药物的耐药率均高于阿奇霉素敏感菌株,而在副流感嗜血杆菌这一表现更为突出。两种阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对头孢曲松、头孢泊肟、氨曲南、美罗培南和左氧氟沙星均出现敏感性减低现象,且流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌无明显差异,提示阿奇霉素与此五种药物的敏感性机制可能存在某种关联,有待探索。此外,虽然试验菌株对氨苄西林的耐药率较高,但对氨苄西林/舒巴坦和阿莫西林/克拉维酸耐药率相对较低,是否间接说明嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感性与 β 内酰胺酶存在某种联系,还有待更深入研究。

参考文献

[1] Jeana SS, Hsuehb PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia[J]. Int Antimicrob Agents, 2011, 37(4): 291-295.

[2] 朱泽航, 蔡逸婷. 人群呼吸道中嗜血杆菌的分布及其非敏感性[J]. 解放军预防医学杂志, 2007, 25(1): 13-16.

[3] 吕媛, 马序竹, 崔兰卿. 2010 年度卫生部全国细菌耐药监测报告: 流感嗜血菌与副流感嗜血菌报告[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5144-5146.

[4] 张秀珍, 胡云建, 等. 2001~2003 年社区呼吸道感染病原菌耐药动态[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(7): 744-748.

[5] 张泓, 李万华, 王传清, 等. 2007 中国 CHINET 流感嗜血杆菌非敏感性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 207-209.

[6] 沙德高, 洪伍华, 李珍大, 等. 732 株嗜血杆菌对阿奇霉素敏感性分析[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(6): 353-354.

[7] 张智州, 李丽, 张蓓, 等. 流感嗜血杆菌耐药分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1244-1245.

[8] 李云. 45 株副流感嗜血杆菌感染及耐药性调查[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 29-31.

(收稿日期: 2012-01-09)

tion of ectopic pregnancy[P]. Oman Med J, 2012, 27(2): 124-128.

[5] Lv XH, Shi da Z. Variations of serum estrADiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus)[J]. Exp Anim, 2010, 59(2): 231-237.

[6] 邱振华, 曾再祥, 舒云华, 等. 血清孕酮联合 β -人绒毛膜促性腺激素检测再异位妊娠早期诊断及保守治疗中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 660-641.

[7] Ghosh S, Howlett M, Boag D, et al. Interference in free thyroxine immunoassay[J]. Eur J Intern Med, 2008, 19: 221-222.

[8] Yang H, Lou C, Xu M, et al. Investigation of folate-conjugated fluorescent silica nanoparticles for targeting delivery to folate receptor-positive tumors and their internalization mechanism[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6(15): 2023-2032.

[9] 孔海霞, 刘萍, 田云霞, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争游离三碘甲腺原氨酸(FT-3)化学发光法[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(3): 201-205.

[10] 陈茶, 孔海霞, 雷鹏, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争雌二醇(E2)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 676-678.

[11] 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[J]. 四川科技出版社, 1994: 45-60.

[12] 董雪, 钟青萍, 黄安诚, 等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 977-981.

(收稿日期: 2012-01-12)