

· 论 著 ·

呼吸道嗜血杆菌属的生物学分型及耐药性分析

江秀爱, 赵白云, 姜 蓓, 乔显森[△]

(山东省青岛市中心医院检验科, 山东青岛 266042)

摘要:目的 了解该院临床分离嗜血杆菌属的季节分布、生物学分型及耐药性。方法 收集呼吸道感染患者的痰液和咽拭子, 采用手工法、MicSCAN4 全自动细菌鉴定分析仪、HNID 鉴定板对分离培养的 221 株嗜血杆菌进行菌种鉴定, 并进行生物学分型。用纸片扩散(K-B)法进行药物敏感试验, 采用头孢硝噻吩纸片法进行 β -内酰胺酶检测。结果 临床分离流感嗜血杆菌 96 株(占 1.6%), 生物 I 型 10 株(10.4%), 生物 II 型 31 株(32.3%), 生物 III 型 40 株(41.7%), 其他生物型 15 株(15.6%)。副流感嗜血杆菌 125 株(占 2.1%), 生物 I 型 15 株(12.0%), 生物 II 型 23 株(18.4%), 生物 III 型 69 株(55.2%), 生物 IV 型 18 株(14.4%), 未检出其他生物型。冬季感染率最高。流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率分别为 40.6% 和 44.8%, 对复方磺胺甲噁唑的耐药率分别为 51.0% 和 66.4%。流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌 β -内酰胺酶产酶率分别为 40.6% 和 44.8%, 对头孢唑啉、头孢噻肟、美罗培南、氯霉素的敏感率都在 90.0% 以上。结论 呼吸道流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌感染好发于冬季, 感染的生物型均以生物 II 型、III 型为主, 对氨苄西林和复方磺胺甲噁唑的耐药率较高, 已不宜用于嗜血杆菌引起感染的经验治疗。对该菌所致呼吸道感染可选用头孢唑啉、头孢噻肟、美罗培南作为治疗的首选药物。

关键词:嗜血杆菌; 耐药性; 药物敏感试验; β -内酰胺酶; 生物学分型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2840-03

Biological typing and drug resistance analysis of Haemophilus strains from respiratory tract

Jiang Xiulai, Zhao Ziyun, Jiang Bei, Qiao Xiansen[△]

(Department of Clinical Laboratory, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong 266042, China)

Abstract: Objective To investigate season distribution, biological typing and drug resistant of Haemophilus in Qingdao Central Hospital. **Methods** The sputum and throat swab were collected from patients with respiratory tract infection, 221 Haemophilus strains were identified and typed by the manual method and MicSCAN4 automatic analyzer, HNID identification plate. Antimicrobial susceptibility was tested by Kirby-Bauer method, and cephalosporins nitrate thiophene paper method was used to detect β -lactamase. **Results** A total of 96 strains of Haemophilus influenzae (1.6%) were isolated, 10 (10.4%) strains of Haemophilus influenzae were identified as type I, 31 (32.3%) as type II, 40 (41.7%) as type III and 15 (15.6%) as other types. A total of 125 strains Haemophilus parv influenzae (2.1%) were isolated, 15 (12.0%) strains of Haemophilus parv influenzae were identified as type I, 23 (18.4%) as type II, 69 (55.2%) as type III and 18 (14.4%) as type IV, other types were not identified. The highest infected rate was in winter. Resistance rate of Haemophilus influenzae and Haemophilus parv influenzae to ampicillin were 40.6% and 44.8%, to trimethoprim-sulfamethoxazole were 51.0% and 66.4%. The prevalence of β -lactamase of all strains were 40.6% and 44.8%. But susceptible rates of Haemophilus to cefotaxime, cefuroxime, meropenem, chloramphenicol were over 90.0%. **Conclusion** The respiratory tract infections to Haemophilus influenzae and Haemophilus parv influenzae is more frequently found in winter. Type II and type III are the most prevalent types. The resistance rates of Haemophilus to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole are increasing, should not be used as empirical treatment of Haemophilus infection. Antibiotics such as cefotaxime, cefuroxime, meropenem could be chosen for the treatment of respiratory tract infection caused by Haemophilus.

Key words: Haemophilus; drug resistance; antimicrobial susceptibility; β -lactamase; biotyping

嗜血杆菌是专性寄生的苛养性细菌, 人类呼吸道感染的嗜血杆菌主要有流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌。嗜血杆菌是革兰阴性菌, 主要寄居于人类呼吸道黏膜, 在呼吸道感染中占有极为重要的地位, 属条件致病菌。该菌属可引起上呼吸道、泌尿道感染及脑膜炎、菌血症等疾病^[1]。近年来, 由于抗菌药物的滥用, 嗜血杆菌的耐药率呈逐年上升趋势, 给临床用药及疾病的治疗带来了极大的困难。本研究通过对 221 株嗜血杆菌进行鉴定分型, 并进行药物敏感性及 β -内酰胺酶试验, 探讨了本地区嗜血杆菌的生物学分型及耐药性, 现将结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 221 株嗜血杆菌均来自 2011 年 3 月至 2012 年 2 月医院门诊与住院呼吸道感染患者的痰液和咽拭子标本, 排除同一患者相同部位分离的重复菌株。

1.2 抗菌药物敏感纸片 氨苄西林、头孢噻肟、阿奇霉素、氯霉素、头孢唑啉、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、阿莫西林-克拉维酸、美罗培南抗菌药物敏感纸片均购于英国 Oxoid 公司。头孢硝噻吩纸片购于法国生物梅里埃公司。

1.3 培养基 哥伦比亚琼脂培养基、流感嗜血杆菌药物敏感试验普通水解酪蛋白(MH)琼脂培养基、营养补充剂 SRO158E 嗜血杆菌试验培养基(HTM)琼脂均为英国 Oxoid 公司产品。

1.4 方法

1.4.1 嗜血杆菌的分离及鉴定 根据《临床检验操作规程(第 3 版)》^[2] 的要求, 取临床送检的痰液及咽拭子合格标本立即在巧克力平皿及血平皿上接种, 在 5%~10% CO₂ 环境中 35℃ 培养 18~24 h, 挑取在血平皿上不生长, 在巧克力平皿上生长的表面光滑、细小、无色透明或半透明、圆形隆起、有光泽

似露滴状的菌落,进行革兰染色,镜检为革兰阴性菌(多形性)。然后将该菌与金黄色葡萄球菌 ATCC25923 共同接种在血平皿及普通 MH 琼脂平皿上,观察是否有卫星现象出现,如血平皿上有卫星现象,MH 平皿上无卫星现象,为流感嗜血杆菌;如血平皿与 MH 平皿上同时有卫星现象为副流感嗜血杆菌。再将革兰阴性菌纯分用 MicSCAN4 全自动细菌鉴定分析仪,HNID 鉴定板进行菌种鉴定并进行生物学分型。

1.4.2 药物敏感试验 采用纸片扩散(K-B)法测定嗜血杆菌对 10 种抗菌药物的敏感性,以 HTM 琼脂为培养基,并根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2013 年标准判定结果。质控菌株为流感嗜血杆菌 ATCC49247。

1.4.3 β-内酰胺酶检测试验 采用头孢硝噻吩纸片法,按照说明书操作,将纸片用无菌蒸馏水浸湿,涂上该菌菌落,观察纸片颜色变化,变红表明 β-内酰胺酶试验阳性,不变色为阴性。

1.5 统计学处理 采用 Whonet5.4 统计软件进行数据处理及统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,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 呼吸道感染患者嗜血杆菌的分离情况 6 189 份呼吸道感染患者的痰液及咽拭子标本中共分离出 221 株嗜血杆菌,检出率为 3.57%。其中流感嗜血杆菌 96 株(占 42.1%),副流感嗜血杆菌 125 株(占 56.6%)。

2.2 嗜血杆菌感染与季节的关系 不同季节嗜血杆菌的检出率不同,春季(3~5 月)、夏季(6~8 月)、秋季(9~11 月)、冬季(12 月至次年 2 月),其中以冬季最高。各季节检出流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌的构成比见表 1。

表 1 不同季节流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌的分离情况[n(%)]

季节	流感嗜血杆菌	副流感嗜血杆菌
春季	26(27.1)	34(27.2)
夏季	23(23.9)	29(23.2)
秋季	18(18.8)	17(13.6)
冬季	29(30.2)	45(36.0)
合计	96(100.0)	125(100.0)

2.3 嗜血杆菌生物学分型分离情况 根据对吡啶、脲酶及鸟氨酸脱羧酶试验 3 个生化反应结果的不同,将分离株分为 8 个生物型 I~Ⅷ型。其中流感嗜血杆菌 96 株(1.6%),I 型 10 株(10.4%),II 型 31 株(32.3%),III 型 40 株(41.7%),IV 型 8 株(8.3%),V~VII 型 7 株(7.3%)。副流感嗜血杆菌 125 株(2.1%),I 型 15 株(12.0%),II 型 23 株(18.4%),III 型 69 株(55.2%),IV 型 18 株(14.4%)。见表 2。

2.4 β-内酰胺酶试验 96 株流感嗜血杆菌中 43 株对氨苄西林耐药,共检出产 β-内酰胺酶菌 43 株,产酶率为 40.6%;125 株副流感嗜血杆菌中 63 株对氨苄西林耐药,共检出产 β-内酰胺酶菌 63 株,产酶率为 44.8%。流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌产酶率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.684, P = 0.408$)。试验中未发现 β-内酰胺酶阴性氨苄西林耐药(BLNAR)菌株,也未发现 β-内酰胺酶阳性阿莫西林-克拉维酸耐药的菌株。

2.5 嗜血杆菌的药物敏感结果 96 株流感嗜血杆菌对氨苄西林、复方磺胺甲噁唑敏感率为 59.4%、49.0%,对阿莫西林-克拉维酸、阿奇霉素、氯霉素、头孢噻肟、头孢呋辛、环丙沙星、左氧氟沙星和美罗培南的敏感率均在 80.0%以上。125 株副流感嗜血杆菌对氨苄西林、复方磺胺甲噁唑敏感率分别为 55.2%、33.6%,对阿奇霉素、氯霉素、头孢噻肟、头孢呋辛和美

罗培南的敏感率均在 80.0%以上。见表 3。

表 2 流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌的生物学分型

生物学分型	菌株数 [n(%)]	吡啶 反应	脲酶 反应	鸟氨酸脱羧 酶试验
流感嗜血杆菌				
I 型	10(10.4)	+	+	+
II 型	31(32.3)	+	+	-
III 型	40(41.7)	-	+	-
IV 型	8(8.3)	-	+	+
V 型	4(4.2)	+	-	+
VI 型	1(1.0)	-	-	+
VII 型	2(2.1)	+	-	-
VIII 型	0(0.0)	-	-	-
副流感嗜血杆菌				
I 型	15(12.0)	-	-	+
II 型	23(18.4)	-	+	+
III 型	69(55.2)	-	+	-
IV 型	18(14.4)	+	+	+
V 型	0(0.0)	-	-	-
VI 型	0(0.0)	+	-	+
VII 型	0(0.0)	+	+	-
VIII 型	0(0.0)	+	-	-

+: 阳性; -: 阴性。

表 3 流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌对抗菌药物耐药结果(%)

抗菌药物	流感嗜血杆菌(n=96)		副流感嗜血杆菌(n=125)	
	耐药	敏感	耐药	敏感
氨苄西林	40.6	59.4	44.8	55.2
阿莫西林-克拉维酸	16.9	83.2	28.8	71.2
阿奇霉素	10.4	89.6	18.4	81.6
氯霉素	7.3	92.7	5.6	94.4
头孢呋辛	3.1	96.9	7.2	92.8
头孢噻肟	2.1	97.8	3.2	96.8
环丙沙星	13.5	86.5	59.2	40.8
左氧氟沙星	11.5	88.5	23.2	76.8
美罗培南	0.0	100.0	7.2	92.8
复方磺胺甲噁唑	51.0	49.0	66.4	33.6

3 讨 论

嗜血杆菌主要寄生于呼吸道,是引起呼吸道疾病,尤其是社区获得性肺炎的重要病原菌之一。嗜血杆菌生化反应较弱,对糖发酵不稳定,可分解葡萄糖,产酸,不产气,根据流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌对吡啶试验、脲酶和鸟氨酸脱羧酶 3 个生化反应结果不同,均分为 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 型。

流感嗜血杆菌的生物学分型与所引起疾病之间有一定的关系。I 型可引起儿童急性下呼吸道感染、脓毒血症、多关节炎、绒毛膜羊膜炎等疾病;II 型可引起暴发性呼吸道疾病;III 型可引起蜂窝组织炎;IV 型引起新生儿败血症,常合并严重的呼吸窘迫,病情危重^[3]。相关文献报道,生物学分型一般与分离菌株采取的部位有关,II 型和 III 型多来自呼吸道、中耳和眼部,IV 型多来自生殖道^[4]。本研究所分离的流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌菌株生物型以生物 II 型(32.3%、18.4%)及 III 型(41.7%、55.2%)为主,这与陈碧英等^[5]的报道相似,与杨旭等^[4]报道的成年人呼吸道嗜血杆菌属生物型以 IV 型最多(69.5%、61.8%),其次是 III 型(26.3%、34.5%)不同。可能与区域环境、抗菌药物使用不同导致分离菌株(下转第 2843 页)

镇居民 2 031 例,阳性 382 例,阳性率 18.81%;农村居民 2 295 例,阳性 350 例,阳性率 15.25%;城镇居民阳性率高于农村居民,两者差异有统计学意义($\chi^2=9.64, P<0.01$)。

2.5 女性阴道分泌物检测结果 参与女性阴道分泌物检测共 2 163 例,阳性 501 例,阳性率 23.16%。其中城镇居民女性 1 275 例,阳性 271 例,阳性率 21.25%;农村居民女性 888 例,阳性 230 例,阳性率 25.90%;城镇居民女性阳性率低于农村居民女性,两者差异有统计学意义($\chi^2=6.34, P<0.05$)。

3 讨 论

孕前优生检查是一项提高人口质量的重要手段^[1],涉及家庭幸福及后代健康。目前认为出生缺陷发生的主要原因中遗传因素占 25%左右,环境因素占 10%以上,而 2 种因素同时存在,加上原因不明者占 65%以上^[2]。明确出生缺陷的病因是出生缺陷干预的前提条件。本研究表明兴宾区 2013 年孕前优生检查人群中,检出具有怀孕高危风险人数共 1 547 例,阳性率 35.76%,高于江西省南丰县 24.06%^[3]和江苏省南通市如皋地区 29.67%检出率^[4],低于福建省宁德市蕉城区的检出率(男性 36.23%,女性 56.85%)^[5]。女性存在怀孕高危风险因素明显高于男性,与宋文等^[6-8]报道一致,说明女性怀孕高危风险更高,符合生育风险一般规律,因此,笔者认为,对出生缺陷的预防,女性是关键,要进一步加强女性疾病的普查、普治工作。本次评估高危人群中生殖系统疾病检出率比较高,特别是女性,有 23.16%的女性阴道分泌物检出异常。生殖系统疾病居检出的高危因素首位,可能影响胎儿的正常发育,从而引起流产、早产、死胎、死产及导致出生缺陷的发生,应做到早发现,早治疗。

优生 4 项检测是这次优生健康检测的重点,包括对 4 种病原微生物,即弓形虫、巨细胞病毒、风疹病毒、梅毒的检测,这组病原体常可通过胎盘传给胎儿,引起围产期感染,导致流产、死

胎、早产、先天畸形和智力障碍等各种异常结果,本次优生 4 项检测结果总阳性率为 27.50%。高于张莉莉等^[9]和李慧萍^[10]的报道。农村居民检出阳性率高于城镇居民。而弓形体抗体检出阳性率城镇居民则低于农村居民,这可能与城镇居民喜欢养宠物而易受宠物传染有关。

参考文献

- [1] 张爱君. 孕前保健在优生优育中的作用[J]. 中国临床实用医学, 2010, 4(9): 256-257.
- [2] 李颖, 杨柳, 杨文芳. 出生缺陷的相关因素[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(12): 755-757.
- [3] 余豪情, 杨文静, 尧丽, 等. 8587 例孕前优生健康检查结果回顾性分析[J]. 中国医学创新, 2013, 10(33): 120-122.
- [4] 樊荷莲, 石太芬. 如皋地区 11306 对育龄夫妇孕前优生健康检查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(8): 144.
- [5] 宋文, 董剪春. 6 128 例孕前优生健康检查结果分析[J]. 中国保健营养, 中旬刊, 2013, 23(10): 426.
- [6] 孙巧霞, 孙京倩. 8511 例孕前优生健康检查结果分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2012, 20(4): 268-269.
- [7] 魏得力, 曹飞. 15 590 例孕前优生健康检查结果分析[J]. 吉林医学, 2014, 35(11): 2380-2381.
- [8] 张秀艳, 呼雅荣, 祖素梅. 7 800 例孕前优生健康检查结果分析[J]. 中国保健营养, 中旬刊, 2013, 23(5): 507-508.
- [9] 张莉莉. 孕前优生健康检查 1 220 例结果分析[J]. 交通医学, 2013, 27(4): 353.
- [10] 李慧萍. 优生四项检测 500 例临床分析与意义探讨[J]. 基层医学论坛: 上旬刊, 2011, 15(9): 790-791.

(收稿日期: 2015-06-16)

(上接第 2841 页)

生物型不一致有关。

嗜血杆菌属于条件致病菌,引起呼吸道感染的原因主要与环境、温度、呼吸道黏膜的特异性免疫功能及菌株自身抗原性强弱等因素有关。寒冷季节人们减少了户外活动,吸入的冷空气在一定程度上使呼吸道黏膜的非特异免疫功能减弱,使纤毛功能受损,黏液产生增加和气道黏膜损伤,影响分泌物的排除,这些因素均有利于嗜血杆菌黏附在黏液上并且复制,从而引起感染^[6]。本结果显示冬季的阳性率最高(30.2%~36.0%),提示流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌引起的呼吸道感染好发于冬季,其次是春季,夏季较少,与国内相关报道较相似^[4,6]。

长期以来氨苄西林、复方磺胺甲噁唑是治疗流感嗜血杆菌感染的首选药物,近年来随着广谱抗菌药物的广泛应用,细菌耐药菌株不断增加,产 β -内酰胺酶菌株的不断升高,氨苄西林耐药菌株也随之逐年上升。本研究中,嗜血杆菌对氨苄西林耐药率为 40.6%~44.8%,高于国内报道(33.9%~40.0%)^[4]。经检测 β -内酰胺酶阳性的菌株,对氨苄西林均耐药,未发现 BLNAR 菌株,也未发现 β -内酰胺酶阳性而对阿莫西林-克拉维酸耐药的菌株,这说明嗜血杆菌对氨苄西林的耐药机制主要由质粒介导的 β -内酰胺酶 TEM-1 型引起^[7]。对复方磺胺甲噁唑的耐药率也较高(51.0%~66.4%),明显高于氨苄西林的耐药率,已不适用于临床嗜血杆菌感染的治疗。

本研究中,嗜血杆菌对头孢呋辛、头孢噻肟、美罗培南的敏感性都在 90.0%以上,可作为治疗嗜血杆菌感染的首选药物。对阿奇霉素的敏感性均在 80.0%以上,流感嗜血杆菌对阿莫

西林-克拉维酸、环丙沙星、左氧氟沙星的敏感性都在 80.0%以上,而副流感嗜血杆菌对阿莫西林-克拉维酸、环丙沙星、左氧氟沙星的敏感性均低于 80.0%。因而临床可以根据药物敏感结果合理选用抗菌药物。

随着广谱抗菌药物的使用,嗜血杆菌的耐药性可能会有所变迁,微生物室应加强对临床医生的指导,避免不合理用药,加强呼吸道寄生菌的分离鉴定及耐药性监测,提高嗜血杆菌的分离率也是实验室急需解决的问题。

参考文献

- [1] 张卓然, 倪语星. 临床微生物学和微生物检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 177.
- [2] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 744-745.
- [3] 张艳, 裴益辉, 华春珍. 流感嗜血杆菌分型的研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2009, 10(5): 430-433.
- [4] 杨旭, 杨红英, 吴盼, 等. 成人呼吸道嗜血杆菌属分离株生物学分型及药敏测定[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(6): 452-455.
- [5] 陈碧英, 马晨芸, 陈佩宏, 等. 146 株流感嗜血杆菌的生物学分型及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(2): 92-94.
- [6] 张丽菊, 崔凤芝. 127 株流感嗜血杆菌分离分型及药敏分析[J]. 山西中医学院学报, 2007, 8(3): 50-51.
- [7] 吴春风, 姜焕好, 曾东良, 等. 2004 至 2005 年我院嗜血杆菌的分离及其耐药性[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(1): 78-79.

(收稿日期: 2015-05-26)