

儿童呼吸道感染流感嗜血杆菌的耐药性分析及复合感染特点

胡琼 莫丽亚 李先斌 黄彩芝 刘健龙

作者单位: 410007 湖南长沙, 湖南省儿童医院检验中心

通信作者: 胡琼, Email: 824743448@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.04.002

【摘要】 目的 了解儿童呼吸道感染流感嗜血杆菌(HI)的耐药情况及合并感染多种病原体的特点。**方法** 收集 2018 年 6 月—2019 年 5 月在湖南省儿童医院检验中心检测的呼吸道感染患儿痰标本, 分离培养病原体, 分析 HI 及合并感染的病原体情况。使用全自动质谱仪鉴定细菌, 采用免疫荧光法检测呼吸道病毒抗原, 使用专用嗜血杆菌药敏板进行药敏试验及 β -内酰胺酶检测, 使用 WHONET 5.5 软件对菌株分布和药敏结果进行统计分析。**结果** 36 452 份痰标本共检出 HI 2 974 株(阳性率 8.16%), 其中 552 株(18.56%)同时合并感染其他病原菌, 分别是: 肺炎链球菌 266 株(占 48.19%)、肠杆菌科菌 112 株(占 20.29%)、金黄色葡萄球菌 81 株(占 14.67%)、非发酵杆菌 59 株(占 10.69%)、其他菌株 34 株(占 6.16%); 1 093 株(40.75%)同时合并呼吸道病毒感染, 分别是: 合胞病毒 499 株(占 45.65%)、副流感病毒 281 株(占 25.71%)、流感病毒 229 株(占 20.95%)、腺病毒 84 株(占 7.69%)。分离出的 2 708 株 HI 对氨苄西林/复方新诺明、氨苄西林/舒巴坦的耐药率分别是 67.91%、66.54%、64.84%, 但对第三代头孢菌素、氟喹诺酮类和哌拉西林/他唑巴坦敏感率高, 其中产 β -内酰胺酶有 1 060 株(占 39.14%), 且均对氨苄西林耐药; 另外 β -内酰胺酶阳性阿莫西林/克拉维酸耐药(BLPACR)型 HI 和 β -内酰胺酶阴性氨苄西林耐药(BLNAR)型 HI 分别检出 183 株和 779 株。**结论** 儿童呼吸道感染 HI 时常合并肺炎链球菌、合胞病毒、流感/副流感病毒感染; 本地区 HI 产 β -内酰胺酶阳性率高, 是氨苄西林耐药的主要机制。

【关键词】 流感嗜血杆菌; 儿童; 复合感染; β -内酰胺酶

Drug resistance analysis of *Haemophilus influenzae* in children with respiratory tract infection and characteristics of complex infection

Hu Qiong, Mo Liya, Li Xianbin, Huang Caizhi, Liu Jianlong. Laboratory Center, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: Hu Qiong, Email: 824743448@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the drug resistance of *Haemophilus influenzae* (HI) in children with respiratory tract infection and the characteristics complex infection of multiple pathogens. **Methods** Samples of sputum from children with respiratory tract infection were collected in laboratory center of Hunan Children's Hospital from June 2018 to May 2019, all samples were cultured and isolated, and the pathogens of HI and complex infection were analyzed. The bacteria were identified by automatic mass spectrometer, the respiratory virus antigen was detected by immunofluorescence method, drug sensitivity test and β -lactamase test were performed using special haemophilus drug sensitive plate, and the distribution of bacterial strains and the results of drug susceptibility were statistically analyzed by WHONET 5.5 software. **Results** A total of 2 974 strains of HI were detected from 36 452 sputum specimens (positive rate of 8.16%), among which 552 strains (18.56%) were infected with other pathogenic bacteria, including 266 strains of *Streptococcus pneumoniae* (accounted for 48.19%), 112 strains of *Enterobacteriaceae* (accounted for 20.29%), 81 strains of *Staphylococcus aureus* (accounted for 14.67%), 59 strains of non-fermentable bacteria (accounted for 10.69%) and 34 strains of other pathogens (accounted for 6.16%). There were 1 093 strains (accounted for 40.75%) simultaneously infected with respiratory virus, including 499 strains of syncytial virus (45.65%), 281 strains of parainfluenza virus (accounted for 25.71%), 229 strains of influenza virus (accounted for 20.95%) and 84 strains of adenovirus (7.69%). The drug resistance rates of the isolated 2 708 strains of HI were 66.54% for Sulfamethoxazole, 67.91% for ampicillin, and 64.84% for ampicillin/sulbactam,

respectively. But the 2 708 strains were highly sensitive to the third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and piperacillin/sulbactam, among which 1 060 strains (39.14%) produced β -lactamase and were resistant to ampicillin. In addition, 183 strains of β -lactamase-positive amoxicillin-clavulanate-resistance (BLPACR) HI and 779 strains of β -lactamase-negative ampicillin resistance (BLNAR) HI were detected. **Conclusions** HI is often co-infective with *Streptococcus pneumoniae*, syncytial virus and influenza/parainfluenza virus in children with respiratory tract infection. The high positive rate of β -lactamase produced by HI in this region is the main mechanism of ampicillin resistance.

【Key words】 *Haemophilus influenzae*; Children; Complex infection; β -lactamase

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, HI)是引起儿童呼吸道感染的常见病原菌。有研究指出, HI是我国儿童发生社区获得性肺炎的一种重要病原菌,仅次于肺炎链球菌,可引起肺炎、支气管炎、化脓性脑膜炎、脓毒症等多种疾病,严重威胁儿童的身体健康^[1-2]。由于HI是专性寄生的苛养性细菌,常伴随其他细菌而生长,给分离培养带来困难,基于鉴定条件及耐药机制复杂,HI的分布和耐药性具有地域性差异。因此,本研究对湖南省儿童医院呼吸道感染患儿痰液标本分离出的病原菌进行分析,以了解本地区儿童HI感染及复合感染情况,持续监测耐药性变化。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集本院2018年6月—2019年5月因呼吸道感染住院患儿送检的合格痰标本共计36 452份。送检的痰标本先行涂片镜检,如果白细胞>10个/LP而鳞状上皮细胞<25个/LP的标本则视为合格标本。

1.2 培养基及试剂盒 嗜血杆菌分离培养基和哥伦比亚血琼脂平板均购自郑州人福博赛生物公司; VITEK MS及配套的质谱靶板购自法国生物梅里埃公司;嗜血杆菌专用药敏板购自湖南天地人生物公司;7项呼吸道病毒检测试剂盒购自上海贝西生物科技有限公司。

1.3 细菌的分离培养和鉴定 痰标本经离心镜检后,取沉淀分别接种于哥伦比亚血琼脂平板、麦康凯琼脂平板(Mac平板)、嗜血杆菌专用巧克力平板,置5% CO₂培养箱35℃培养18~24 h。挑取HI或其他病原菌,用质谱仪VITEK MS鉴定,并用药敏板进行药敏试验;呼吸道病毒用专用试剂盒检测;嗜血杆菌专用药敏板自带 β -内酰胺酶检测。

1.4 标准菌株 HI ATCC 49247。

1.5 药敏试验 用配套稀释液配成1.0麦氏标准的菌液上药敏板,置于35℃培养箱培养18~24 h,上机检测。

1.6 统计学分析 将检测数据录入WHONET 5.5软件,对菌株分布和药敏结果进行统计分析。

2 结果

2.1 细菌检出情况 36 452份痰标本共检出HI 2 974株,阳性率8.16%;其中有552株(18.56%)同时检出其他病原菌,分别是肺炎链球菌266株(占48.19%)、肠杆菌科菌112株(占20.29%)、金黄色葡萄球菌81株(占14.67%)、非发酵杆菌59株(占10.69%)、其他菌株34株(占6.16%)。

2.2 病毒检出情况 在本次检出2 974株HI的痰标本中,有2 682份标本同时进行了病毒检测,共计检出病毒1 093株(40.75%),分别是合胞病毒499株(占45.65%)、副流感病毒281株(占25.71%)、流感病毒229株(占20.95%)、腺病毒84株(占7.69%)。

2.3 药物敏感试验结果 对2 974株HI中的2 708株HI进行了药物敏感试验,结果显示:HI对第三代头孢菌素、哌拉西林/他唑巴坦和氟喹诺酮类药物均表现出良好的体外活性,而对复方新诺明、氨苄西林和氨苄西林/舒巴坦的耐药率较高。见表1。

表1 2 708株HI对抗菌药物的药敏结果

抗菌药物	HI (%)		
	S	R	I
氨苄西林	22.19	67.91	9.90
阿莫西林/克拉维酸	68.31	31.69	0
氨苄西林/舒巴坦	35.16	64.84	0
哌拉西林/他唑巴坦	98.67	1.33	0
头孢呋辛	40.20	55.80	4.00
头孢他啶	98.80	1.20	0
头孢曲松	100.00	0	0
头孢吡肟	93.01	2.00	4.99
复方新诺明	29.91	66.54	3.55
阿奇霉素	69.01	26.00	4.99
美罗培南	98.80	0	1.20
氨曲南	74.59	19.50	5.91
环丙沙星	100.00	0	0
利福平	100.00	0	0

注:S指敏感,R指耐药,I指中介

2.4 HI耐药机制情况 药敏测试板显示,2 708株HI中有1 060株产 β -内酰胺酶,均对氨苄西林

耐药; β -内酰胺酶阳性阿莫西林/克拉维酸耐药(BLPACR)型 HI 检出 183 株; β -内酰胺酶阴性氨苄西林耐药(BLNAR)型 HI 检出 779 株,且对头孢呋辛和氨苄西林/舒巴坦耐药。见表 2。

表 2 2 708 株耐药机制不同的 HI 分布情况

类别	数量(株)	占比(%)
产 β -内酰胺酶	1 060	39.14
BLPACR 型 HI	183	6.76
BLNAR 型 HI	779	28.77
其他	686	25.33

3 讨论

3.1 HI 是引起儿童呼吸道感染的常见病原菌。有研究表明, HI 可以通过黏附侵入呼吸道上皮细胞,又通过外膜蛋白的改变逃脱中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬,从而在呼吸道长期定植^[3-4]并继发下呼吸道感染,除此之外还可引起化脓性脑膜炎、蜂窝组织炎、关节炎及骨髓炎等原发或继发性感染。本研究结果显示,2018 年 6 月—2019 年 5 月本院从呼吸道感染患儿中共检出 HI 2 974 株,检出率 8.16%,低于杨晓华等^[5]报道的 10.2%。分析其可能的原因是: HI 的分布可能存在一定的地域和季节差异;但最主要的原因还是由于 HI 属于苛养性细菌,生长需要 V、X 因子,在一般巧克力平板上菌落小,不易识别,加上革兰阳性(G^+)球菌的干扰,生长速度慢,临床上容易漏检;而使用加了万古霉素等药物的巧克力培养基,生长的嗜血杆菌菌落较大,且能抑制 G^+ 球菌的生长,会更容易识别。因此,只有不断提高检验水平和检验技术,才能提高 HI 的检出率。

3.2 本研究显示,检出 HI 的呼吸道感染患儿中,有 18.56% 的患儿同时检出其他细菌,以肺炎链球菌多见。有文献指出, HI 与肺炎链球菌存在共生关系,共同在呼吸道感染致病中发挥协同作用^[6]。此外,本研究病毒检测结果显示,2 682 份 HI 标本中有 1 093 份同时检出了病毒,检出率达 40.75%,主要是合胞病毒,其中有 6 株同时合并 2 种呼吸道病毒,1 株同时合并 3 种呼吸道病毒。可能是因为当呼吸道感染病毒时,由于病毒的侵入造成上皮细胞变性、坏死,使 HI 的继发感染有了可趁之机,而当呼吸道感染 HI 时,其炎症反应也利于病毒的侵入。可见,儿童感染 HI 时可合并感染多种病原体。国内还有研究表明,患儿细菌合并病毒感染比单一细菌感染或单一病毒感染的临床症状更加严重,病程更长,并发症更多^[7]。因此,本研究提示,临床医师要提高

对患儿复合感染发生率的认知,尽量避免患儿临床治疗效果不佳、预后不良等情况的发生。

3.3 本研究药敏结果显示, HI 对氨苄西林的耐药率为 67.91%,比甄杨等^[8]报道的 52%、徐和平等^[9]报道的 28.4% 及陶云珍等^[10]报道的 32.7% 都高,而氨苄西林和阿莫西林是治疗 HI 感染最常用的药物,但由于耐药率逐年升高,不宜作为临床经验用药。

3.3.1 HI 的耐药机制主要是细菌产生 β -内酰胺酶(TEM-1 型或 ROB-1 型),水解氨苄西林使其失活。本研究中有 1 060 株 HI 产 β -内酰胺酶,占 39.14%,提示本地区产 β -内酰胺酶是导致 HI 对氨苄西林耐药的主要机制。

3.3.2 本研究还显示, HI 对氨苄西林耐药还有另一机制,即氨基酸位点突变引起青霉素结合蛋白改变,产生 BLNAR 型 HI。本研究发现有 779 株 BLNAR 型 HI,说明 BLNAR 型 HI 在本地区是大量存在的,而其耐药机制与以往不同,是 HI 耐药模式的一种新表现,原因还有待进一步研究。

3.3.3 除了存在 β -内酰胺酶耐药机制外,还存在 PBP_s 基因突变的 BLPACR 型 HI,本研究检出 183 株此类 HI。

3.3.4 此外,谢成彬等^[11]发现,非产酶 HI 的基因突变对氨苄西林和第二代头孢菌素影响较大,而对第三代头孢菌素影响较小,对非 β -内酰胺类抗菌药物影响很小。本研究中 HI 对环丙沙星和利福平等的敏感率均为 100%,第三代头孢菌素敏感率也达 98% 以上,几乎不受青霉素结合蛋白改变的影响。

3.3.5 本研究还表明,抗菌药物中复方新诺明的耐药率仅次于氨苄西林,其耐药机制主要是染色体介导的二氢叶酸还原酶过量产生,导致与甲基苄氧嘧啶的结合减少所致。

3.3.6 另外,阿奇霉素是新一代大环内酯类抗菌药物,对 HI 有较强的抗菌活性^[12]。但本研究中阿奇霉素耐药率也有 26.00%,这可能与儿童用药种类有限、临床将其作为儿童呼吸道感染常用药物等因素有关。随着抗菌药物的广泛使用,耐药率不断升高,本研究提示临床应慎重选择此药。

综上所述, HI 是儿童呼吸道感染的重要病原菌。肺炎链球菌、呼吸道病毒常合并 HI 造成儿童呼吸道感染,当检出 HI 时应警惕其他复合病原菌或呼吸道病毒感染的感染。HI 对哌拉西林/他唑巴坦、第三代头孢菌素、利福平等有高的敏感率,而对氨苄西林、复方新诺明、氨苄西林/舒巴坦有较高的耐药

率,尤其是 BLNAR 型和 BLPACR 型 HI 菌株的大量出现,使儿童 HI 感染控制面临挑战。因此应当加强耐药监测,指导临床合理使用抗菌药物,延缓耐药菌株的增长,从而为临床提供更全面的诊疗依据。

参考文献

- Anderson R, Wang X, Briere EC, et al. *Haemophilus haemolyticus* isolates causing clinical disease [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2462–2465. DOI: 10.1128/JCM.06575–11.
- Rudan I, O'Brien KL, Nair H, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries [J]. J Glob Health, 2013, 3(1): 010401. DOI: 10.7189/jogh.03.010401.
- Sy MG, Robinson JL. Community-acquired *Moraxella catarrhalis* pneumonia in previously healthy children [J]. Pediatr Pulmonol, 2010, 45(7): 674–678. DOI: 10.1002/ppul.21243.
- Kwak YH, Jung HS, Park SE, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Haemophilus influenzae* from Korean children in prevaccination era [J]. J Korean Med Sci, 2000, 15(6): 616–622. DOI: 10.3346/jkms.2000.15.6.616.
- 杨晓华, 谭南, 林爱心, 等. 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, 15(5): 436–439. DOI: 10.3969/j.issn.1009–7708.2014.05.017.
- Adegbola RA, DeAntonio R, Hill PC, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and other respiratory bacterial pathogens in low and lower-middle income countries: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e103293. DOI: 10.1371/journal.pone.0103293.
- 张勇, 张紫荆, 周少明, 等. 多重感染致儿童急性腹泻病的多中心临床研究[J]. 国际儿科学杂志, 2017, 44(8): 570–573. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673–4408.2017.08.015.
- 甄杨, 宋文琪, 董方, 等. 儿童患者中分离 350 株流感嗜血杆菌的分布和耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(6): 658–662. DOI: 10.16718/j.1009–7708.2017.06.009.
- 徐和平, 马晓波, 郑燕青, 等. 厦门地区呼吸道感染患儿嗜血杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(16): 1927–1928, 1930. DOI: 10.3969/j.issn.1672–9455.2011.16.004.
- 陶云珍, 王运中, 吾金彪, 等. 苏州地区 2011–2012 年儿童感染流感嗜血杆菌耐药新特征[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(9): 845–849. DOI: 10.3969/j.issn.1000–3606.2013.09.012.
- 谢成彬, 王频佳, 吴雨露, 等. 儿童呼吸道流感嗜血杆菌分离株耐药性与 *fts I* 基因分型研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(4): 324–329. DOI: 10.3969/j.issn.1009–7708.2015.04.005.
- Laopaiboon M, Panpanich R, Swa MK. Azithromycin for acute lower respiratory tract infections [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 8(3): CD001954. DOI: 10.1002/14651858.CD001954.pub4.

(收稿日期: 2019–12–10)

(本文编辑: 张耘菲)

读者·作者·编者

本刊常用不需要标注中文的缩略语 (一)

流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*, HI)
肺炎支原体 (*M.Pneumonia*, MP)
肺炎衣原体 (*Chlamydiapneumoniae*, Cpn)
嗜肺军团菌 1 型 (*Legionella pneumophila* 1, LP1)
Q 热立克次体 (*Q rickettsia*, QFR)
腺病毒 (adenovirus, ADV)
呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)
甲型流感病毒 (influenza A virus, IFVA)
乙型流感病毒 (influenza B virus, IFVB)
副流感病毒 (parainfluenza virus, PIVs)
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)
甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌
(methicillin sensitive *Staphylococcus aureu*, MSSA)
丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)
人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)
自身免疫性肝病 (autoimmune liver diseases, AILD)
自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH)
原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cholangitis, PBC)
原发性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC)
免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)
标准操作规程 (standard operation procedure, SOP)
间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence, IFA)

酶联免疫吸附试验
(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)
荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)
核酸检测法 (nucleic acid testing, NAT)
类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)
类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)
抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA)
红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)
C-反应蛋白 (C-reactionprotein, CRP)
尿微量白蛋白 (micro albumin, mALB)
胱抑素 C (cystatin C, Cys C)
肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR)
 β_2 微球蛋白 (β_2 -microglobulin, β_2 -MG)
血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A protein, SAA)
肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)
白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)
灶性指数 (focus score, FS)
自身免疫性疾病 (autoimmune disorders, AID)
慢性阻塞性肺疾病
(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)
干燥综合征 (sjogren syndrome, SS)
妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)
葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT)