论著

文章编号:1000-5404(2014)23-2400-04

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

景春梅,王 偲 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院检验科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 统计分析2009－2013年重庆地区儿童感染流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*,Hi)的耐药性及血清型,为临床治疗Hi感染和推广Hi疫苗接种提供参考依据。**方法** 纸片扩散法检测Hi的耐药性,玻片凝集法对Hi进行血清分型。**结果** 共分离Hi 5 474株,以呼吸道标本多见,占97.4%(5 329株)。>6个月~3岁组和>3~5岁组的Hi分离率分别为21.8%和16.3%,高于<6个月组和>5岁组的分离率10.3%和6.6%,82.2%的分离株在≤5岁年龄段;复方新诺明、氨苄西林、头孢噻肟、氨苄西林/舒巴坦、左氧氟沙星的耐药率分别为77.0%、42.4%、0.2%、2.3%、0.4%。2009－2013年Hi对复方新诺明、阿莫西林/棒酸、氨苄西林、氯霉素、利福平、头孢呋辛、阿奇霉素耐药率有明显改变($P<0.05$),其余受试药物的耐药率均无明显改变($P>0.05$)。共分离出33株β-内酰胺酶阴性氨苄西林耐药Hi,占0.6%。2282株Hi产β-内酰胺酶,产酶率为41.7%。不可分型Hi占92.8%,可分型Hi中a、b、c型各占5.6%,d、e、f型分别为27.8%、38.9%、16.7%。**结论** ≤5岁儿童是Hi感染易感人群,Hi主要分离自呼吸道标本,复方新诺明已不宜用于Hi感染的经验用药,临床应重视Hi的耐药现象,并加强Hi对抗菌药物的耐药性监测。血清分型以不可分型株为主,Hie是重庆地区儿童Hi的主要血清型。

[关键词] 流感嗜血杆菌;耐药性;血清型;β-内酰胺酶;儿童
[中图法分类号] R181.36; R373.13; R915 [文献标志码] A

Antimicrobial resistance and serotype of *Haemophilus influenzae* isolates from Chongqing children during 2009 to 2013

Jing Chunmei, Wang Cai (Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Child Development Disease Research of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Base of Diagnosis, Treatment and Prevention for Children Development Major Diseases, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the antimicrobial resistance and serotype of *Haemophilus influenzae* (Hi) isolates from the children in Chongqing during the year of 2009 to 2013, and provide instruction for prevention and pharmacological application. **Methods** Antimicrobial susceptibility testing was performed by Kirby-Bauer disc diffusion method, and serotypes were measured by Hi antiserum. **Results** A total of 5 474 Hi isolates were collected, 97.4% (5 329 isolates) were from respiratory samples. All the samples were divided into 4 groups according to the children's ages, that is, younger than 6 months (group 1), 6 months to 3 years (group 2), 3 years to 5 years (group 3) and older than 5 years (group 4). The positive rate in group 2 (21.8%) and group 3 (16.3%) were significantly higher than that in group 1 (10.3%) and group 4 (6.6%). Among all the 5 474 Hi strains, 82.2% were identified from children younger than 5 years old. The resistant rate to trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, cefotaxime, ampicillin/sulbactam, levofloxacin was 77.0% 42.4%, 0.2%, 2.3% and 0.4%, respectively. There were significant changes among the resistance rates of trimethoprim-sulfamethoxazole, amoxycillin-clavulanic acid, ampicillin, chloramphenicol, rifampicin, cefuroxime, and azithromycin during the investigation period ($P<0.05$). However, the difference of resistance rates of the rest antibiotics had no statistically significance ($P>0.05$). A total of 33 isolates (0.6%) were beta-lactamase negative ampicillin-resistant (BLNAR) Hi. Total 2 282 isolates (41.7%) produced beta-lactamase. Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) accounted for

[基金项目] 国家自然科学基金(81071417)
[通信作者] 王 偲, E-mail:550418610@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1608.018.html (2014-11-06)

92.8% among all Hi strains, and Hia, Hib, Hic, Hid, Hie, and Hif accounted for 5.6%, 5.6%, 5.6%, 27.8%, 38.9%, and 16.7% respectively among all serotype of Hi. **Conclusion** Children younger than 5 years old are sensitive population for Hi infection. Most of Hi are isolated from respiratory samples, and trimethoprim-sulfamethoxazole is not suitable for Hi infection. More attention should be paid to resistant Hi, and to survey of antimicrobial resistance in Hi infection. NTHi is the major serotype of Hi, and the Hie is the main serotype.

[**Key words**] *Haemophilus influenzae*; antimicrobial resistance; serotype; beta-lactamase; children

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071417). Corresponding author: Wang Cai, 550418610@qq.com

呼吸道感染是我国儿童最常见的感染性疾病,而流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*,Hi)是引起儿童呼吸道感染的主要致病菌,可引起小儿肺炎、鼻咽炎、中耳炎、败血症、化脓性脑膜炎等多种感染,严重威胁儿童的健康。由于抗菌药物的广泛使用,Hi的耐药性不断上升,为了合理使用抗菌药物,有效控制Hi相关感染,了解Hi的耐药状况至关重要。研究表明不同年代、不同地区Hi血清型存在较大地区差异。Hi血清型与引起的疾病种类有一定的关系,其中不可分型流感嗜血杆菌(Nontypeable *Haemophlus influenzae*, NTHi)和Hib是两个重要的致病菌。Hi分型情况的研究可以了解菌株的型别变迁,是感染流行病学研究的重要手段。疫苗预防接种可降低Hi感染的发生,减少抗菌药物的使用和降低耐药菌株出现,进而减缓耐药菌株的传播。为此,我们研究重庆地区儿童感染Hi对常用抗菌药物的耐药性及血清型分布的流行病学特征,用以指导临床经验性治疗Hi感染时合理选择抗菌药物,并为Hi疫苗的合理使用提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

收集2009-2013年就诊于重庆医科大学附属儿童医院(本院是中国西部最大的综合性儿童医疗中心,患者主要来源于主城及周边区县)社区获得性呼吸道感染儿童分离Hi,剔除同一患者相同部位的重复分离菌株。年龄0~12(1.0±0.6)岁。所有入选患儿胸部听诊均闻及干、湿性啰音和(或)胸部X线检查异常,急性下呼吸道感染诊断参照《实用儿科学》的诊断标准[1]。按照儿童体内Hi抗体水平差异[2],将入选患儿分为<6个月、>6个月~3岁、>3~5岁、>5岁4个组。

1.2 抗菌药物纸片

抗菌药物纸片和用于测定β-内酰胺酶的头孢噻硝吩试剂均为OXID公司产品,受试抗菌药物品种参见结果。按统一方法进行药敏试验,结果按美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准判断。

1.3 培养基

Hi药敏试验培养基(HTM)为重庆宠通公司产品。

1.4 抗菌药物敏感性试验

采用纸片扩散法进行药敏试验,质控菌株为ATCC49247,质控频率为每周1次。

1.5 β-内酰胺酶检测

采用头孢噻硝吩纸片法检测β-内酰胺酶。

1.6 Hi血清型鉴定

2009-2013年每年随机抽取100株Hi,共500株进行血清型鉴定。用a、b、c、d、e、f型抗血清以玻片凝集法进行血清分型,发生凝集反应的为阳性。Hi分型血清使用日本DENKA SEIKEN株式会社产品。

1.7 统计学方法

采用WHONET 5.6分析Hi耐药性,SPSS 19.0软件进行数据统计、分析。Hi检出率,在不同标本中的分布,在不同科室分布及2009-2013年各年份耐药率均采用计数资料进行统计分析,相对数用率表示,平均耐药率用算术平均数计算。采用χ^2趋势检验分析2009-2013年耐药率有无变化趋势。

2 结果

2.1 临床常见病原菌分布

2009-2013年各类临床标本中共分离64 276株病原菌,其中Hi 5 474株。连续5年Hi的检出株数分别为558株,1 594株,2 145株,991株,186株,检出率分别为5.1%、14.6%、16.1%、6.7%和1.3%,平均检出率为8.8%。Hi检出率。见表1。

表1 流感嗜血杆菌检出率

年份	病原菌总数	革兰阴性菌		流感嗜血杆菌		革兰阴性菌
	株数(例)	株数(例)	检出率(%)	株数(例)	检出率(%)	中比例(%)
2009	10 911	7 627	69.9	558	5.1	7.3
2010	10 941	7 636	69.8	1 594	14.6	20.9
2011	13 313	8 868	66.6	2 145	16.1	24.2
2012	14 804	9 807	66.2	991	6.7	10.1
2013	14 307	9 189	64.2	186	1.3	2.0
合计	64 276	43 127	–	5 474	–	–
平均	–	–	67.4	–	8.8	12.9

2.2 Hi在不同标本中的分布

2009-2013年共分离Hi 5 474株,分离至呼吸道标本(痰、灌洗液、咽拭子)5 329株,占97.4%,其中5 280株分离至痰和灌洗液标本,49株分离至咽拭子标本,呼吸道以外的标本共145株,占2.6%。Hi在不同标本中的分布。见表2。

2.3 Hi的临床病区分布

2009-2013年连续5年Hi在病区的分布,均以呼吸病房构成比例最高,为58.8%。Hi在特需病房、心血管病房、新生儿病房、感染科病房、重症监护室、肾脏免疫病房的检出率分别为7.8%、6.3%、2.7%、2.4%、1.6%、1.2%。Hi在不同病房中的分布。见表3。

表2 流感嗜血杆菌在不同标本中的分布

标本	2009年(558例)		2010年(1 594例)		2011年(2 145例)		2012年(991例)		2013年(186例)		合计	
	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)
痰+灌洗液	541	97.0	1 579	99.1	2 027	94.5	963	97.2	170	91.4	5 280	96.5
分泌物	3	0.5	2	0.1	8	0.4	5	0.5	5	2.7	23	0.4
咽拭子	5	0.9	5	0.3	28	1.3	7	0.7	4	2.2	49	0.9
静脉血	2	0.4	3	0.2	2	0.1	4	0.4	6	3.2	17	0.3
其他标本	7	1.3	5	0.3	80	3.7	12	1.2	1	0.5	105	1.9

表3 流感嗜血杆菌在不同病房中的分布

科室	2009年(558例)		2010年(1 594例)		2011年(2 145例)		2012年(991例)		2013年(186例)		合计	
	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)	株数(例)	构成比(%)
呼吸病房	401	71.9	939	58.9	1 228	57.2	571	57.6	77	41.4	3 216	58.8
特需病房	59	10.6	103	6.5	140	6.5	99	10.0	28	15.1	429	7.8
心血管病房	23	4.1	152	9.5	160	7.5	7	0.7	5	2.7	347	6.3
新生儿病房	11	2.0	40	2.5	63	2.9	29	2.9	4	2.2	147	2.7
感染科病房	20	3.6	36	2.3	57	2.7	15	1.5	4	2.2	132	2.4
重症监护室	10	1.8	22	1.4	36	1.7	11	1.1	8	4.3	87	1.6
肾脏免疫病房	6	1.1	22	1.4	29	1.4	3	0.3	8	4.3	68	1.2
其他病房	28	5.0	280	17.6	432	20.1	256	25.8	52	28.0	1 048	19.1

2.4 Hi在不同年龄组中的分离率

有82.2%(4 497/5 474)Hi分离株分布在≤5岁年龄段,各组段Hi分离结果见表4。其中6个月~3岁和3~5岁组儿童Hi分离率明显高于<6个月和>5岁组。

表4 流感嗜血杆菌在不同年龄中的分离率

组别	<6个月		>6个月~3岁		>3~5岁		>5岁	
	株数(例)	分离率(%)	株数(例)	分离率(%)	株数(例)	分离率(%)	株数(例)	分离率(%)
2009	125	11.7	186	22.5	148	15.8	99	6.9
2010	335	9.8	518	21.3	456	17.4	285	6.7
2011	451	9.6	715	21.9	597	16.4	382	6.4
2012	215	9.9	324	20.9	275	15.9	177	6.1
2013	40	10.5	62	22.2	51	16.1	33	6.8
合计	1 166	–	1 805	–	1 526	–	977	–
平均	–	10.3	–	21.8	–	16.3	–	6.6

2.5 Hi对受试抗菌药物的耐药率

未检出亚胺培南、美洛配能耐药菌株。Hi对复方新诺明耐药率为77.0%,其次为氨苄西林42.4%,四环素30.4%,氯霉素22.8%,头孢丙烯9.4%;头孢曲松、头孢噻肟、阿奇霉素、阿莫西林/棒酸、头孢他啶、氨苄西林/舒巴坦、利福平、头孢呋辛、环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率均<5.0%。Hi对18种受试抗菌药物的耐药率经χ^2趋势检验有显著变化趋势($P<0.05$)的有:复方新诺明、阿莫西林/棒酸、氨苄西林、氯霉素、利福平、头孢呋辛、阿奇霉素,其余受试药物的耐药率均无明显改变($P>0.05$)。5 474株Hi对受试抗菌药物的耐药率。见表5。

2.6 Hi β-内酰胺酶检测结果

2 282株Hi β-内酰胺酶阳性,占41.7%。β-内酰胺酶阴性氨苄西林耐药Hi(BLNAR)33株,占0.6%。

2.7 Hi血清分型结果

500株Hi中,NTHi占92.8%,可分型菌株占7.2%,可分型菌株中a、b、c型各占5.6%,d、e、f型分别为27.8%、38.9%、16.7%。见表6。

表5 流感嗜血杆菌对受试抗菌药物的耐药率

抗菌药物	2009年(558例)		2010年(1 594例)		2011年(2 145例)		2012年(991例)		2013年(186例)		平均耐药率(%)	P
	株数(例)	耐药率(%)	株数(例)	耐药率(%)	株数(例)	耐药率(%)	株数(例)	耐药率(%)	株数(例)	耐药率(%)		
左氧氟沙星	2	0.4	3	0.2	11	0.5	7	0.7	0	0.0	0.4	0.461 9
复方新诺明	392	70.3	1 247	78.2	1 731	80.7	807	81.4	138	74.2	77.0	<0.01
阿莫西林/棒酸	7	1.3	18	1.1	34	1.6	11	1.1	15	8.1	2.6	<0.01
美洛配能	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
氨苄西林	193	34.5	663	41.6	890	41.5	471	47.5	87	46.8	42.4	<0.01
氨苄西林/舒巴坦	10	1.8	18	1.1	54	2.5	12	1.2	9	4.7	2.3	0.122 4
亚胺培南	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
氯霉素	104	18.6	355	22.3	513	23.9	263	26.5	42	22.6	22.8	<0.05
利福平	4	0.7	0	0.0	9	0.4	11	1.1	2	1.1	0.7	<0.05
头孢呋辛	4	0.7	14	0.9	26	1.2	49	4.9	17	9.1	3.4	<0.01
环丙沙星	9	1.6	21	1.3	36	1.7	15	1.5	0	0.0	1.2	0.583 0
头孢曲松	1	0.2	5	0.3	15	0.7	1	0.1	0	0.0	0.3	0.846 9
四环素	177	31.7	467	29.3	650	30.3	309	31.2	55	29.6	30.4	0.940 5
头孢噻肟	1	0.2	2	0.1	15	0.7	0	0.0	0	0.0	0.2	0.972 7
阿奇霉素	15	2.7	18	1.1	54	2.5	44	4.4	10	5.4	3.2	<0.01
氨曲南	10	1.8	14	0.9	47	2.2	19	1.9	4	2.0	1.8	0.226 9
头孢丙烯	42	7.5	198	12.4	178	8.3	94	9.5	17	9.4	9.4	0.482 3
头孢他啶	1	0.2	3	0.2	15	0.7	1	0.1	0	0.0	0.2	0.966 4

表 6 500 株流感嗜血杆菌血清分型结果

血清型别	阳性数(例)	占总菌株比(%)	占可分型菌株比(%)
NTHi	464	92.8	-
a 型	2	0.4	5.6
b 型	2	0.4	5.6
c 型	2	0.4	5.6
d 型	10	2.0	27.8
e 型	14	2.8	38.9
f 型	6	1.2	16.7

3 讨论

2009 - 2013 年从临床标本分离 64 276 株病原菌中检出 Hi 5 474 株,分离率为 8.8%,与王云桥[3]报道的 8.3%一致。本研究显示:82.2% Hi 分离株分布在≤5 岁年龄段,<6 个月组患儿 Hi 分离率明显低于>6 个月 ~3 岁组和 >3 ~5 岁组,说明从母体获得的 IgG 抗体在 <6 个月的婴幼儿体内发挥着重要的防御作用,而 2.5 岁以上儿童在接触 Hi 过程中不断产生抗体,与本研究 >6 个月 ~3 岁组 Hi 分离率最高(21.8%)相符合,6 岁以后儿童的抗体水平接近成人,Hi 分离率也明显降低。儿童的机体免疫不健全,是 Hi 的易感人群,Hi 感染与机体杀菌抗体水平密切相关,因此提高婴幼儿免疫能力是预防 Hi 感染的根本途径,接种 Hi 疫苗是预防感染的有效措施。

本研究表明,Hi 主要分离自呼吸病房,呼吸道(痰、灌洗液、咽拭子)标本分离率为 97.4%,这与 Hi 主要引起上呼吸道感染有较大关系,提示 Hi 在重庆地区儿童上呼吸道感染中占重要地位,这可能与儿童免疫系统发育不健全,缺乏对 Hi 的抑菌活力有关。重庆地区儿童分离的 Hi β-内酰胺酶阳性率为 41.7%,高于张泓[4]报道的儿童感染 Hi 产酶率 30.1 %,田磊等[5]报道的儿童组 Hi 产酶率 37.14%。而阿莫西林/棒酸耐药率仅 2.6%,说明重庆地区儿童分离的 Hi 对氨苄西林耐药多由 β-内酰胺酶产生引起。BLNAR 菌株在 1980 年首先被报道,其耐药机制主要是青霉素结合蛋白的改变和外膜蛋白的通透性下降,BLNAR 菌株检出率地区差异较大,我们的结果是 BLNAR 检出率 0.6%,明显低于国外文献的相关报道[6],表明 BLNAR 在重庆地区儿童分离的 Hi 中并不常见。对 BLNAR 耐药基因型和耐药表型的分析有待进一步研究。

随着抗生素的广泛使用,Hi 的耐药状况也越来越受到重视。氨苄西林作为治疗 Hi 感染的首选药物,在世界范围内其耐药性已经达到很高水平,一项对国内 9 所综合性医院和 2 所儿童医院的多中心监测结果[4]显示 Hi 对氨苄西林的耐药率达到 31.7%,本研究的耐药率为 42.4%,明显高于全国水平,低于文献[7]报道的日本 44.5%。在我国,氨苄西林因其价格低,副作用小,常作为第一线抗生素应用于临床,用量大,使用时间长。因此,造成了 Hi 对该药的耐药率迅速增长。Hi 对氟喹诺酮类抗菌药物的耐药率低,环丙沙星、左氧氟沙星耐药率分别为 1.2%、0.4%,可能与氟喹诺酮类抗菌药物对儿童软骨发育有影响,因此临床使用较少有关。复方新诺明耐药率高达 77.0%,说明该药已经不能作为临床经验用药。氯霉素耐药率为 22.8% ,高于张泓[4]报道的 12.5%。Hi 对头孢曲松、头孢噻肟、阿奇霉素、头孢他啶、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛的耐药率均 <5.0%,提示这些抗菌药物对 Hi 具有较高的抗菌活性,可作为治疗 Hi 所致感染的首选药物。

Hi 根据细胞壁外荚膜多糖的有无,将其分为有荚膜的可分型和无荚膜的不可分型两类。可分型 Hi a ~ f 六个血清型中,b 型对婴幼儿致病性最强且最常见,f 型次之。本研究 NTHi 占 92.8%,略低于文献[8] 的报道 94.51%,提示 NTHi 是重庆地区儿童 Hi 感染的重要致病菌。Hif 分离率 16.7%,高于国外报道的 4.8%[9]和 0.8%[10]。Hib 分离率 5.6%,低于文献[9]报道的 20.1%,Hie 分离率 38.9%,明显高于文献[10]报道的 0.8%,提示 Hie 是重庆地区儿童 Hi 感染的主要血清型。

参考文献:

[1] 胡亚美, 江载芳. 诸福堂实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1167.
[2] 袁曾麟, 李凤祥, 李亚楠, 等. 我国人群中抗 b 型流感嗜血杆菌多糖抗体水平的调查[J]. 中华流行病学杂志, 1999, 20(1): 42 - 44.
[3] 王云桥, 厉小玉, 陈刚, 等. 儿童感染流感嗜血杆菌分离培养与耐药性分析[J]. 中国当代医药, 2013, 20(32): 108 - 109.
[4] 张泓, 孔菁, 王传清, 等. 2010 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.
[5] 田磊, 陈中举, 李丽, 等. 2008 - 2010 年湖北省流感嗜血杆菌标本分布及耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(2): 125 - 127.
[6] Hoshino T, Kutsuna S, Sawada K, *et al*. Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenza isolated from pediatric patients at a pediatric facility between 2009 and 2012[J]. Kansenshogaku Zasshi, 2013, 87(5): 581 - 589.
[7] Otsuka T, Chang B, Shirai T, *et al*. Individual risk factors associated with nasopharyngeal colonization with Streptococcus pneumoniae and *Haemophilus influenzae*: a Japanese birth cohort study[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32(7): 709 - 714.
[8] 胡莹, 夏晓玲, 黄海林, 等. 昆明地区儿童下呼吸道感染流感嗜血杆菌分离株的耐药性和血清分型研究[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(2): 118 - 120.
[9] Efron A M, Moscoloni M A, Reijtman V R, *et al*. Surveillance of Haemophilus influenza serotypes in Argentina from 2005 to 2010 during the Haemophilus influenza type b conjugate vaccine era[J]. Rev Argent Microbiol, 2013, 45(4): 240 - 247.
[10] Morozumi M, Chiba N, Okada T, *et al*. Antibiotic susceptibility in relation to genotype of Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae*, and Mycoplasma pneumoniae responsible for community-acquired pneumonia in children[J]. J Infect Chemother, 2013, 19(3): 432 - 440.

(**收稿**:2014-06-20;**修回**:2014-09-05)
(编辑 邓强庭)