

论著·实验研究

杭州市上呼吸道感染患儿分离的流感嗜血杆菌 分离株的血清分型及其对氨苄西林的耐药性分析

裘益辉¹, 张艳¹, 华春珍¹, 张焯仙², 李建平³

(1. 杭州师范大学临床医学院, 浙江 杭州 310018; 2. 杭州师范大学附属医院杭州市第二人民医院, 浙江 杭州 310015; 3. 浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310018)

[摘要] 目的 了解从呼吸道感染患儿分离出的流感嗜血杆菌血清分型及其对氨苄西林耐药性。方法 流感嗜血杆菌的鉴定采用V因子, X因子和V+X因子试验, 血清分型采用玻片凝集法, β 内酰胺酶检测采用头孢硝噻酚法, 药敏试验采用纸片扩散法和E-test法。结果 2006年12月至2007年7月共分离到的流感嗜血杆菌152株, 其中男性患儿108株, 占71.0%, 女性患儿44株, 占29.0%。血清分型显示不可分型流感嗜血杆菌148株, 占97.4%, 可分型流感嗜血杆菌4株, 占2.6%; 可分型菌株中, a, d, e, f型各1株, 无b, c型菌株发现。34株菌株(22.4%)产生 β 内酰胺酶。152株流感嗜血杆菌中, 全部菌株成功完成药敏试验, 113株菌株(74.3%)对氨苄西林敏感; 141株菌株用E-test法检验了最低抑菌浓度(MIC), 氨苄西林MIC₅₀为0.25 μ g/mL, MIC₉₀为12 μ g/mL。结论 该研究中流感嗜血杆菌分离株以不可分型菌株占绝对优势, 74.3%流感嗜血杆菌对氨苄西林敏感。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(3): 217-220]

[关键词] 流感嗜血杆菌; 血清型; 氨苄青霉素; 耐药; 儿童

[中图分类号] R378.4⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)03-0217-04

Serotypes and ampicillin resistance of *Haemophilus influenzae* isolates from children with respiratory infection in Hangzhou

QIU Yi-Hui, ZHANG Yan, HUA Chun-Zhen, ZHANG Zhu-Xian, LI Jian-Ping. Clinical Medical School of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310018, China (Hua C-Z, Email: huachunzhen@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the serotypes distribution and ampicillin resistance of *Haemophilus influenzae* isolates from children with respiratory infection in Hangzhou. **Methods** *Haemophilus influenzae* strains were identified with V factor and X factor tests. Serotypes were determined with the slide agglutination method. Nitrocefin test was used to detect β -lactamase. The sensitivities of ampicillin to *Haemophilus influenzae* were determined with the Kirby-Bauer diffusion method and the E-test method. **Results** One hundred and fifty-two *Haemophilus influenzae* isolates, 108 from boys and 44 from girls, were identified between December 2006 and July 2007. Of the 152 isolates, 148 (97.4%) were untypable, only 4 (2.6%) were typable, including type a, type d, type e and type f ($n=1$ each type). *Haemophilus influenzae* type b and c strain was not found. Thirty-four isolates (22.4%) were β -lactamase-positive. One hundred and thirteen isolates (74.3%) were susceptible to ampicillin, while 34 isolates (22.4%) were resistant to ampicillin. **Conclusions** Untypable strains were the most common in *Haemophilus influenzae* isolates from children with respiratory infection in Hangzhou. The isolates of *Haemophilus influenzae* kept susceptibility to ampicillin to a certain extent.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(3): 217-220]

Key words: *Haemophilus influenzae*; Serotype; Ampicillin; Resistance; Child

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, Hi)是引起我国儿童呼吸道感染最常见的病原菌,除此之外它还可引起儿童败血症,脑膜炎等严重疾病。根据细菌细胞壁外荚膜多糖的有无,流感嗜血杆菌可分有荚膜的可分型和无荚膜的不能分型两类。可分

型流感嗜血杆菌中,根据荚膜多糖抗原成份的不同又可分a, b, c, d, e, f 6个血清型,不同的型别引起的常见疾病种类不同。此外,临床上该菌对历史沿袭药物氨苄西林的耐药率呈上升趋势,氨苄西林的耐药株已遍及全球,但不同地区的耐药率存在较大

[收稿日期]2008-05-26; [修回日期]2008-07-15

[作者简介]裘益辉,男,大学。主攻方向:临床医学专业。

[通讯作者]华春珍,女,博士,教授,杭州师范大学临床医学院,邮编:310018。

差异。为了解杭州地区儿童分离的流感嗜血杆菌血清分型及其对氨苄西林耐药情况,本研究对2006年12月至2007年7月临床标本中分离的流感嗜血杆菌进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株为2006年12月至2007年7月从浙江大学医学院附属儿童医院呼吸道感染儿童中分离出的152株流感嗜血杆菌。其中2株来自咽拭子培养,其余150株均来自痰液培养。

流感嗜血杆菌荚膜型特异性抗血清“SEIKEN”为日本生研株式会社产品,生产番号为207016。流感嗜血杆菌专用巧克力培养基、Cefinase纸片均为法国bioMérieux公司产品;嗜血杆菌药敏基础琼脂,嗜血杆菌药敏用生长因子SR158E(NAD及氯化血红素)和标准抗生素纸片氨苄西林(AM, 10 μg)均为英国Oxoid公司产品。氨苄西林浓度梯度条(AM, 0.016~256 μg/mL)购自瑞典AB BioDisk公司。

1.2 方法

①菌株的鉴定:根据菌落的形态和革兰染色特点对嗜血杆菌进行初步筛选,用V因子,X因子和V+X因子试验鉴定流感嗜血杆菌。②血清分型:采用玻片凝集法。标准菌株ATCC49247(N型),ATCC9006(a型),ATCC10211(b型),ATCC9007(c型),ATCC9008(d型)ATCC8142(e型),ATCC9833(f型)为质控菌株,购自美国ATCC菌种管理中心。③β内酰胺酶试验的操作和结果判断完全按照产品说明进行。④药敏试验:药敏培养基的配制按照2007年NCCLS的指南和产品说明进行配制^[1],用纸片扩散法检测流感嗜血杆菌对氨苄西林的敏感性,同时用E-test法检测氨苄西林的最低抑菌浓度,E-test法的操作和结果判读完全按照产品说明进行。流感嗜血杆菌标准株ATCC49247作为质量控制株贯穿始终。

2 结果

2.1 一般资料

152株流感嗜血杆菌感染患儿的年龄分布范围为18天至13岁,平均年龄为14月。流感嗜血杆菌感染者中男性患儿的构成为71.0%,明显高于女性患儿中的29.0%;不同年龄组中,<1岁组的构成

比最高,达73.0%,高于1~3岁组和>3岁组。不同年龄、性别组中流感嗜血杆菌的菌株数见表1。

2.2 血清分型

152株流感嗜血杆菌中不可分型菌株148株,占97.4%,其中因自凝无法分型3株,e,f交叉凝集1株;可分型菌株4株,占2.6%,分别为a,d,e,f型各1株,无b,c型菌株发现。152株流感嗜血杆菌的血清分型情况见表2。

表1 不同年龄、性别组中流感嗜血杆菌的菌株数

项目	流感嗜血杆菌菌株数	构成比(%)
性别		
男	108	71.0
女	44	29.0
年龄		
<1岁	111	73.0
1~3岁	24	15.8
>3岁	17	11.2

表2 152株流感嗜血杆菌的血清分型情况

血清分型	株数	百分比(%)	
		占总株数	占分型株数
不能分型	146	97.4	/
可分型	4	2.6	100
a	1	0.7	25
b	0	0	0
c	0	0	0
d	1	0.7	25
e	1	0.7	25
f	1	0.7	25

2.3 药敏结果分析

152株流感嗜血杆菌中,全部菌株成功完成药敏试验,对氨苄西林敏感113株,占74.3%,中介株5株,占3.3%,耐药株34株,占22.4%。148株不可分型流感嗜血杆菌菌株中,33株菌株(22.2%)对氨苄西林耐药;4株可分型流感嗜血杆菌菌株中,1株(a型)对氨苄西林耐药。

检测氨苄西林对141株菌株的最低抑菌浓度(MIC),其范围为0.64~256 μg/mL。MIC₅₀为0.25 μg/mL, MIC₉₀为12 μg/mL。141株菌株中,105株(74.5%)对氨苄西林敏感,30株(21.3%)对氨苄西林耐药,6株(4.3%)为中介株。141株流感嗜血杆菌对氨苄西林的最低抑菌浓度(MIC)分布见图1。

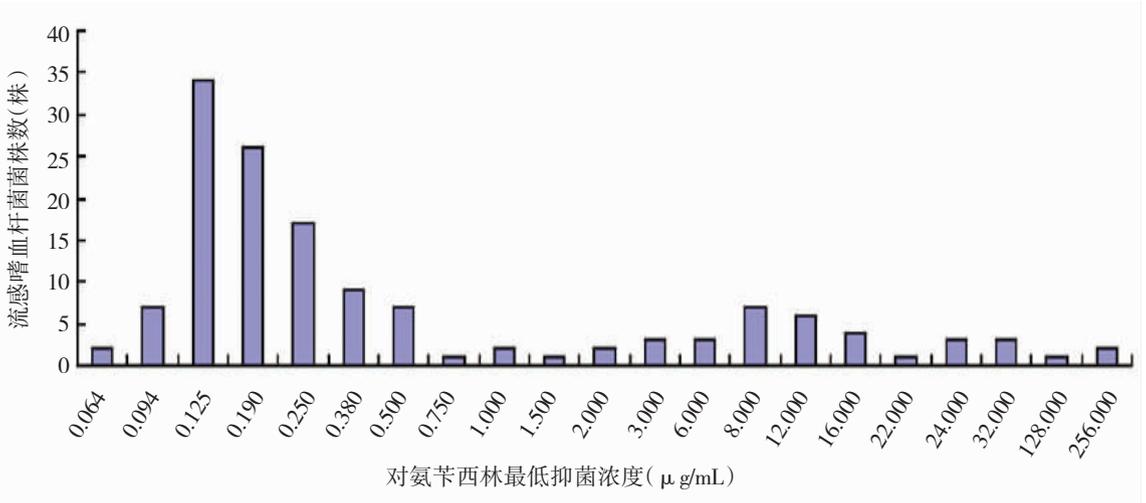


图1 141株流感嗜血杆菌对氨苄西林的最低抑菌浓度(MIC)分布

2.4 β内酰胺酶检测

152株流感嗜血杆菌中34株产生β内酰胺酶,占22.4%。34株对氨苄西林耐药的流感嗜血杆菌中32株产生β内酰胺酶,占94.2%,2株为β内酰胺酶阴性株。

3 讨论

本研究对152株流感嗜血杆菌临床株血清分型显示,不可分型流感嗜血杆菌148株,占97.4%,而可分型株优势型菌株不明显,未分离到b型和c型株。此血清型分布与本课题组2004、2005年对本地区菌株的研究报道结果不同^[1,2],华春珍等^[2]发现临床株不可分型株分别占61.9%、80.7%,而可分型株一直以d型为主,提示不可分型株在临床感染中的比例逐渐增加,而在不同时期流行的荚膜型别亦发生变异。研究表明,b型流感嗜血杆菌(Hib)是引起5岁以下婴幼儿肺炎,脑膜炎,会厌炎和蜂窝组织炎等侵入性感染发病和致死的重要病原菌^[3,4]。在发达国家,由于Hib结合疫苗(荚膜多糖类疫苗)的推广使用,使Hib的发病率大大降低。而与此同时,由于Hib结合疫苗的预防作用是针对含有特异性荚膜的血清型,它对NTHi无预防作用,由于水平转移、期相变换、噬菌体等作用,NTHi已拥有了侵袭性荚膜型Hib的相关毒力因子,其致病力较Hib疫苗投用前大大增强^[5,6]。因此,针对本地区的Hi血清型结果以不可分型株为主以及b、c型已极少见这一现状,提示对于流感嗜血杆菌感染的预防,研制针对无荚膜新型多价疫苗是科研工作的重点。本次研究中,还发现流感嗜血杆菌男性患儿的构成比高于

女性患儿,提示男性较易受流感嗜血杆菌感染。在用玻片凝集法进行血清分型时有可能发生对多种抗血清交叉凝集或菌株自凝而不能正确分型的现象,本研究中以a、b、c、d、e、f型标准菌株为质控菌株贯穿始终,虽有1株发生e、f交叉凝集,但凝集强度存在明显差异,说明本研究应用的抗血清分型率高。研究中另有3株菌株因在生理盐水中自凝无法分型而被归类为不能分型株,该现象不能通过改善分型血清本身质量解决,因此有必要开展血清分型联合荚膜基因检测的方法进行综合分型^[7]。

随着广谱抗生素的广泛应用,流感嗜血杆菌对氨苄西林的耐药率各国逐渐上升,在北美^[8],20%~40%的流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药,而我国,不同城市或地区耐药率在4.8%~38%^[9,10],例如北京14.3%^[11]、苏州17.8%^[12]、上海^[13]20.4%、成都^[14]31.4%,与本次研究的结果基本一致。本次研究中,74.3%的流感嗜血杆菌对氨苄西林敏感,从氨苄西林MIC的分布来看,大多数是敏感株,提示本地区流感嗜血杆菌对氨苄西林仍保持较高的敏感性。Hi对氨苄西林的主要耐药机制是β内酰胺酶的产生,包括TEM-1和ROB-1两种酶^[15],根据姜敏等报道^[16,17]我国呼吸道感染患儿鼻咽部携带的Hi对氨苄西林耐药机制,主要是TEM-1型β内酰胺酶的产生。本次研究所有菌株中仅有22.4%菌株产生β内酰胺酶,低于本地区临床株的27.4%的研究报道^[2]。β内酰胺酶阴性的耐药菌株(β-lactamase-negative and ampicillin-resistant, BLNAR),本组资料中有2株,在所有分离菌株中所占比例约1.3%,但最近西班牙报道已达到5.5%^[18],日本达3.4%^[19],上海,温州等地报道^[16,20]有10%的菌株为BLNAR,

提示 BLNAR 在本地区临床株中不常见。BLNAR 的耐药机制与细菌细胞壁上青霉素结合蛋白突变导致与氨苄西林的亲和力下降有关,因 BLNAR 的产生是由于细菌细胞壁上一种或多种青霉素结合蛋白发生改变所致,因此这些菌株也可对其他 β 内酰胺类抗生素表现一定抵抗性。所以了解本地区流感嗜血杆菌耐药情况、产酶情况及其机制,指导临床合理使用抗生素以及研究开发新型抗生素均具有十分重要的意义^[21,22]。

[参 考 文 献]

[1] 华春珍, 俞惠民, 尚世强, 李建平, 陈志敏, 王洁华. 流感嗜血杆菌患儿分离株的血清分型和耐药模式研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(11):854-858.

[2] 华春珍, 孙莉颖, 李建平, 赵丽娅, 陈志敏, 俞惠民. 杭州某幼儿园健康儿童流感嗜血杆菌携带状况及其血清分型[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(6):389-391.

[3] Tamargo I, Fuentes K, Llop A, Oteo J, Campos J. High levels of multiple antibiotic resistance among 938 Haemophilus influenzae type b meningitis isolates from Cuba (1990-2002) [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(4): 695-698.

[4] Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, et al. Haemophilus influenzae from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(1): 85-91.

[5] Ohkusu K, Nash KA, Inderlied CB. Molecular characterisation of Haemophilus influenzae type a and untypeable strains isolated simultaneously from cerebrospinal fluid and blood; novel use of quantitative real-time PCR based on the cap copy number to determine virulence [J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(8):637-643.

[6] Skoczynska A, Lewandowska M, Klarowicz A, Hryniewicz W. Prevalence and serotype distribution of encapsulated Haemophilus influenzae isolates from patients with lower respiratory tract infections in Poland [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2):938-941.

[7] 张莉滢, 张双民, 吕志跃, 吴忠道. 广州地区患儿流感嗜血杆菌分离株荚膜基因分型的研究[J]. 热带医学杂志, 2008, 7(8):722-755.

[8] Mathai D, Lewis MT, Kugler KC, Pfaller MA, Jones RN. Antibacterial activity of 41 antimicrobials tested against over 2773 bacterial isolates from hospitalized patients with pneumonia: I - results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North

America, 1998) [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001, 39(2): 105-116.

[9] 陈民钧, 谢秀丽, 张秀珍, 张淑兰, 王清涛, 林桂清, 等. 北京上海广州地区的流感嗜血杆菌分离及药敏试验 [J]. 中华传染病杂志, 1998, 16(4):236-239.

[10] 卢桂兰, 王小梅, 彭晓旻, 丁丽新, 石伟先, 董振英, 等. 2005年1~4月北京地区类流感样病例儿童流感嗜血杆菌感染情况分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1):90-91.

[11] 袁林, 俞桑洁, 李艳, 杨永弘. 2004年肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌耐药监 [J]. 临床儿科杂志, 2006, 24(6): 468-470.

[12] 陶云珍, 丁云芳, 张建华, 糜祖煌, 诸丽娟, 闵兰芳. 苏州地区儿童感染流感嗜血杆菌 β 内酰胺酶基因检测 [J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(2):108-110.

[13] 王传清, 王岱明, 王爱敏, 薛建昌, 宋建明. 2000~2002年患儿呼吸道致病菌的耐药性研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(2):114-116.

[14] 王莉, 夏万敏, 杨亚静, 谢诚, 黄诚, 张砾. 137例儿童急性下呼吸道感染流感嗜血杆菌耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(1):63-64.

[15] Karlowsky JA, Verma G, Zhanel GG, Hoban DJ. Presence of ROB-1 beta-lactermases correlatase with cefaclor resistance among-recent isolate of Haemophilus influenzae [J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 45(6):871-875.

[16] 姜敏, 胡翼云, 沈叙庄, 高薇, 俞桑洁, 杨永弘. 流感嗜血杆菌氨苄西林耐药基因 TEM-1, ROB-1 的检测 [J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(2):83-85.

[17] 张私, 吴文娟, 李万华, 孔青, 盖晶, 陆权. 流感嗜血杆菌氨苄西林耐药基因研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(6):377-379.

[18] Marco F, García-de-Lomas J, García-Rey C, Bouza E, Aguilar L, Fernández-Mazarrasa C. Antimicrobial susceptibilites of 1730 Haemophilus influenzae respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(11):3226-3228.

[19] Ohkusu K, Nakamura A, Sawada K. Antibiotic resistance among recent clinical isolates of Haemophilus influenzae in Japanese Children [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2000, 36(4):249-254.

[20] 俞桑洁, 沈叙庄, 袁林, 佟月娟, 高薇, 王咏红, 等. 儿童社区获得性呼吸道感染的肺炎链球菌和流感嗜血杆菌耐药性监测 [J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(5):297-300.

[21] 华春珍, 俞惠民, 陈志敏, 李建平, 尚世强. 小儿下呼吸道感染的细菌病原学分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(5):365-368.

[22] 苏怡凡, 魏莲花. 流感嗜血杆菌与小儿急性呼吸道感染关系的探讨 [J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(6):697-698.

(本文编辑:吉耕中)