

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.02.003

耐亚胺培南流感嗜血杆菌的临床特点与耐药性分析^{*}

邢凡凡, 黄锦月, 王 丽, 李惠娟, 叶海燕, 孙林琳, 邓超文, 劳锦辉, 陈福和[△]

香港大学深圳医院临床微生物及感染控制科, 广东深圳 518053

摘 要:目的 探究耐亚胺培南流感嗜血杆菌(Hi_Ir)的临床特点与耐药性。方法 对该院微生物实验室分离的 30 株 Hi_Ir 分别进行纸片扩散法(K-B 法)与 Epsilometer 测试法(E-test 法)药敏试验、 β -内酰胺酶检测及血清型鉴定,使用医院信息系统检索相关临床资料,分析菌株的临床特征。结果 30 株 Hi_Ir 菌株分离自 28 例患者,其中男 21 例,女 7 例;年龄 3 个月至 85 岁;0~<15 岁患者所占比例最高,为 57.14%。30 株 Hi_Ir 均分离自呼吸道标本,其中有 9 株为致病菌,14 株为呼吸道定植菌,其余 7 株为作用不明菌。有 12 份标本同时检出其他呼吸道病原微生物。 β -内酰胺酶阳性与阴性菌株各 15 株。两种药敏试验方法检测结果显示,30 株 Hi_Ir 对头孢曲松、左氧氟沙星均敏感,K-B 法检测出氨苄西林敏感株 7 株,K-B 法检测出 Hi_Ir 菌株对美罗培南均敏感,但 E-test 法检测出 4 株 Hi_Ir 对美罗培南耐药。K-B 法与 E-test 法检测的氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南的耐药率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 该院分离的 Hi_Ir 主要引起呼吸道感染,对头孢曲松、左氧氟沙星、美罗培南仍有高敏感性。

关键词:流感嗜血杆菌; 亚胺培南; 耐药性; 药敏试验

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)02-0153-04

Analysis of the clinical characteristics and drug resistance of imipenem-resistant *Haemophilus influenzae*^{*}

XING Fanfan, HUANG Jinyue, WANG Li, LI Huijuan, YE Haiyan, SUN Linlin, DENG Chaowen, LAO Jinhui, CHEN Fuhe

Department of Clinical Microbiology and Infection Control, the University of Hong Kong-Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518053, China

Abstract: **Objective** To explore the clinical characteristics and drug resistance of imipenem-resistant *Haemophilus influenzae* (Hi_Ir). **Methods** The 30 strains of Hi_Ir isolated from the microbiology laboratory of the hospital were tested for drug sensitivity by disk diffusion method (K-B method) and Epsilometer test method (E-test method), β -lactamase detection and serotype identification. The hospital information system was used to retrieve relevant clinical data and analyze the clinical characteristics of the strain. **Results** The 30 Hi_Ir strains were isolated from 28 patients, including 21 males and 7 females, aged from 3 months to 85 years old, patients aged 0 to younger than 15 accounted for the highest proportion of 57.14%. All 30 Hi_Ir strains were isolated from respiratory tract specimens, of which 9 strains were pathogenic bacteria, 14 strains were respiratory colonizing bacteria, and the remaining 7 strains were unknown bacteria. Other respiratory pathogenic microorganisms were also detected in 12 specimens. There were 15 β -lactamase positive and negative strains respectively. The results of the two drug susceptibility test methods showed that 30 Hi_Ir strains were all sensitive to ceftriaxone and levofloxacin, K-B method detected 7 ampicillin-sensitive strains, K-B method detected that the Hi_Ir strains were all sensitive to meropenem, but E-test method detected 4 Hi_Ir strains resistant to meropenem. There was no statistically significant difference on the resistance rates of ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, and meropenem detected by the K-B method and the E-test method ($P>0.05$). **Conclusion** The Hi_Ir isolated from this hospital mainly causes respiratory infections and is still highly sensitive to ceftriaxone, levofloxacin, and meropenem.

Key words: *Haemophilus influenzae*; imipenem; drug resistance; drug susceptibility test

^{*} 基金项目:广东省深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201911014)。

作者简介:邢凡凡,男,主治医师,主要从事感染性疾病、临床微生物学相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: jfwchan@hku.hk.

本文引用格式:邢凡凡,黄锦月,王丽,等.耐亚胺培南流感嗜血杆菌的临床特点与耐药性分析[J].检验医学与临床,2022,19(2):153-156.

流感嗜血杆菌(Hi)是一种氧化酶阳性、兼性厌氧、无运动力的多形性革兰阴性杆菌。多糖荚膜是辨别 Hi 分型的一个重要特征,多糖荚膜可分为 6 种血清型,而没有多糖荚膜的属于不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)。Hi 广泛定植于人体鼻咽部,并发上呼吸道感染时其可能会引起侵袭性疾病并在密切接触者间传播^[1]。侵袭性 b 型流感嗜血杆菌(Hib)是引起细菌性脑膜炎的主要病原菌之一,同时其还会引起会厌炎、肺炎、脓胸等疾病。随着 Hib 疫苗的使用,Hib 感染相关疾病的发病率大大降低^[2],与此同时,NTHi 的致病力则大幅度上升^[3-4]。NTHi 通常从鼻咽部扩散引起感染,可导致鼻窦炎、中耳炎、支气管炎、肺炎、菌血症及创伤后脑膜炎等,并且可能与高风险人群的高病死率有关^[5-7]。氨苄西林既往一直是治疗 Hi 感染的首选药物,但自从耐氨苄西林菌株出现后^[8],广谱头孢菌素类药物开始被广泛用于抗 Hi 感染。此外,在治疗耐氨苄西林 Hi 侵袭性感染时,碳青霉烯类也被认为是一种有效的治疗药物。但近年来多个国家及地区相继从 β -内酰胺酶阴性的耐氨苄西林 Hi 中分离出耐亚胺培南或美罗培南的菌株,这为临床治疗带来了巨大挑战^[7]。本研究对耐亚胺培南流感嗜血杆菌(Hi_Ir)的临床特点进行了分析,对其耐药表型、 β -内酰胺酶、血清型进行了检测,并比较了纸片扩散法(K-B 法)与 Epsilometer 测试法(E-test 法)药敏试验结果,以进一步了解 Hi_Ir 的耐药机制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 研究对象为 2019 年 7 月至 2020 年 4 月本院微生物实验室分离出的 30 株 Hi_Ir 菌株。研究所需标准菌株 Hi ATCC 49247 购自美国模式培养物保藏所。本研究通过本院医学伦理委员会批准,伦理批号:伦[2021]063。

1.2 方法

1.2.1 菌株准备 将保存的 Hi_Ir 及标准菌株分别放入添加了 X、V 因子的脑心浸液肉汤中复苏,然后接种于巧克力琼脂培养基,在 37℃、5%CO₂ 的恒温箱中进行继代培养。从培养基上直接挑取过夜(20~24 h)培养的菌落,加入 0.85% 的氯化钠溶液制备菌株混悬液,将浑浊度调整至 0.5 麦氏浊度标准备用。每 1 mL 混悬液包含(1~4)×10⁸ 菌落形成单位。

1.2.2 临床数据检索 使用医院信息系统,检索 Hi_Ir 菌株相关患者的临床资料。根据患者是否诊断为呼吸道感染性疾病,是否同时检出其他呼吸道病原微生物,是否使用 Hi_Ir 敏感抗菌药物,是否使用检出的其他呼吸道病原微生物敏感的抗菌药物,以及症状是否改善,将 Hi_Ir 分类为致病菌、定植菌与作用不明菌。具体判定标准如下,致病菌:诊断为呼吸道感染性疾病,使用 Hi_Ir 敏感抗菌药物后症状改善则感染的 Hi_Ir 为致病菌;如同时检出其他呼吸道病原微生物,必须同时满足未使用针对其他呼吸道病原微生物

物的敏感抗菌药物。定植菌:(1)无呼吸道感染性疾病,但检出 Hi_Ir;(2)诊断为呼吸道感染性疾病,未使用 Hi_Ir 敏感的抗菌药物,但症状仍改善;符合以上任意一条。作用不明菌:(1)诊断为呼吸道感染性疾病,同时检出 Hi_Ir 与其他呼吸道病原微生物,但未使用针对 Hi_Ir 与其他呼吸道病原微生物的敏感抗菌药物,症状未改善;(2)诊断为呼吸道感染性疾病,同时检出 Hi_Ir 与其他呼吸道病原微生物,并使用了针对 Hi_Ir 与其他呼吸道病原微生物的敏感抗菌药物;符合以上任意一条。

1.2.3 Hi_Ir 菌株血清型检测 根据玻片凝集法操作规范,按照使用说明书用 Hi 荚膜抗血清(天津生物芯片有限公司)进行 Hi_Ir 菌株血清型检测,设置无菌生理盐水和标准菌株 ATCC 49247 为阴性对照。

1.2.4 药敏试验 按照美国临床和实验室标准协会(CLSI)M100 相关标准^[9],分别采用 K-B 法、E-test 法对 Hi_Ir 菌株进行氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢呋辛、头孢曲松、左氧氟沙星和美罗培南的药敏试验。对所有 Hi_Ir 菌株与标准菌株 ATCC 49247 使用上述两种方法分别进行 3 次药敏试验,至少由 3 名经验丰富的实验室技术人员读取并记录抑菌圈直径和最小抑菌浓度。

1.2.5 β -内酰胺酶检测 按照显色头孢菌素法,使用 β -内酰胺酶检测纸片(温州市康泰生物科技有限公司)对 Hi_Ir 进行 β -内酰胺酶检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床特征 本研究 30 株 Hi_Ir 菌株分离自 28 例患者,其中 2 例患者均检出了 2 株 Hi_Ir。患者男 21 例,女 7 例;年龄 3 个月至 85 岁,中位年龄 4.5 岁。0~<15 岁患者所占比例最高,为 57.14%(16/28),其中 56.25%(9/16)为学龄前儿童,不同年龄组间性别分布比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.4286$, $P = 0.2885$)。28 例患者中有 23 例诊断为呼吸道感染性疾病,占 82.14%(23/28)。15 例患者合并基础疾病,以心血管疾病(7 例)、内分泌系统疾病(5 例)、呼吸系统疾病(7 例)所占比例较高。28 例患者中无脑膜炎等侵袭性 Hi 感染患者。见表 1。

2.2 标本来源及分类 30 株 Hi_Ir 均分离自呼吸道标本,包括 15 份咽拭子、13 份痰液、1 份肺泡灌洗液和 1 份鼻拭子标本。依据本研究对致病菌、定植菌、作用不明菌的定义,30 株 Hi_Ir 中有 9 株为致病菌,14 株为呼吸道定植菌,其余 7 株在感染过程中的作用不明,为作用不明菌。有 12 份标本同时检出其他呼吸道病原微生物,包括腺病毒、呼吸道合胞病毒、3 型副流感病毒、肺炎链球菌、肺炎支原体、化脓性链球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、白假丝酵母菌、口

腔正常菌群。

表 1 28 例患者的临床特征(n)

临床特征	男	女	合计
年龄(岁)			
0~<15	10	6	16
15~<60	5	0	5
≥60	6	1	7
临床诊断			
急性气管/支气管炎	6	2	8
吸入性肺炎	2	0	2
慢性支气管炎	1	1	2
支气管肺炎	1	1	2
社区获得性肺炎	1	1	2
慢性阻塞性肺疾病急性加重	2	0	2
医院获得性肺炎	0	1	1
间质性肺疾病伴感染	1	0	1
上呼吸道感染	3	0	3
非感染性疾病	4	1	5
基础疾病			
心血管疾病	7	0	7
内分泌系统疾病	5	0	5
胃肠及肝脏疾病	4	0	4
血液系统疾病	1	0	1
神经系统疾病	2	1	3
肿瘤	0	1	1
呼吸系统疾病	7	0	7
自身免疫性疾病	1	0	1
泌尿系统疾病	3	0	3
预后			
良好	19	6	25
不良	2	1	3

2.3 Hi_Ir 血清型、药敏试验与 β -内酰胺酶检测结果 β -内酰胺酶检测结果显示, β -内酰胺酶阳性与阴性菌株各 15 株。按照氨苄西林药敏试验(K-B 法)结果与 β -内酰胺酶检测结果, 30 株 Hi_Ir 可分为 β -内酰胺酶阴性氨苄西林敏感(BLNAS)组 7 株、 β -内酰胺酶阳性氨苄西林耐药(BLPAR)组 15 株和 β -内酰胺酶阴性氨苄西林耐药(BLNAR)组 8 株, 各组血清型分布情况见表 2。5 株 BLNAS 菌株对除亚胺培南以外的 6 种抗菌药物均敏感, 各组 K-B 法与 E-test 法检测的阿莫西林/克拉维酸与头孢呋辛的耐药率分布见表 3。两种药敏试验方法检测结果显示, 30 株 Hi_Ir 对头孢曲松、左氧氟沙星均敏感, K-B 法检测出氨苄西林敏感株 7 株, 占 23.33%, K-B 法检测出 Hi_Ir 菌株对美罗培南均敏感, 但 E-test 法检测出 4 株 Hi_Ir 对美罗培南耐药。K-B 法与 E-test 法检测的氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南的耐药率比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表 4。

表 2 各组 Hi_Ir 血清型分布情况(n)

组别	n	a 型	b 型	bcd 型	bd 型	c 型	d 型	NTHi
BLNAS 组	7	1	0	0	2	0	0	4
BLPAR 组	15	3	1	2	5	1	1	2
BLNAR 组	8	2	0	0	3	0	0	3
合计	30	6	1	2	10	1	1	9

表 3 各组两种方法检测的阿莫西林/克拉维酸与头孢呋辛的耐药率分布(%)

组别	n	方法	阿莫西林/克拉维酸	头孢呋辛
BLNAS 组	7	K-B	0.00	28.57
		E-test	14.29	28.57
BLPAR 组	15	K-B	60.00	93.33
		E-test	66.67	93.33
BLNAR 组	8	K-B	100.00	100.00
		E-test	100.00	100.00

表 4 两种方法检测的 Hi_Ir 对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南的耐药率比较[n(%)]

抗菌药物	K-B 法	E-test 法	P
氨苄西林	23 (76.67)	25 (83.33)	0.479 5
阿莫西林/克拉维酸	17 (56.67)	19 (63.33)	0.479 5
美罗培南	0 (0.00)	4 (13.33)	0.133 6

3 讨论

本研究中有 9 株 Hi_Ir 为致病菌, 有 14 株为呼吸道定植菌, 在检出 Hi_Ir 菌株的 28 例患者中有 23 例诊断为呼吸道感染相关疾病, 因此 Hi_Ir 可能与呼吸道感染有关, 其多定植于呼吸道。Hi 在呼吸道的定植开始于出生后, 由于不断的暴露与清除, 菌株定植是一个动态变化的过程。本研究 0~<15 患者中, 学龄前儿童所占比例(56.25%) 高于非学龄前儿童(43.75%), 与 BARBOSA-CESNIK 等^[10]发现的学龄前儿童 Hi_Ir 呼吸道定植率更高的情况类似。此外, 有 12 份标本同时检出其他呼吸道病原微生物, 提示对于疑似呼吸道感染的患者, 即使从呼吸道标本中分离出 Hi_Ir, 也应结合患者临床表现进行分析, 判断检出的 Hi_Ir 是定植菌还是致病菌, 而且不应忽视对合并其他病原微生物的排查。

对于阿莫西林/克拉维酸耐药的菌株, 本院微生物实验室会加做左氧氟沙星、头孢曲松、亚胺培南药敏试验, 以便于临床医生选择敏感抗菌药物。亚胺培南作为国家严格管控的高级别抗菌药物, 具有抗菌谱广、抗菌活性强等优点, 通常被应用于敏感菌引起的重症感染。但在本研究中, 30 株 Hi_Ir 均对头孢曲松、左氧氟沙星与美罗培南有高敏感性, 因此, 临床医生需要了解当地 Hi 耐药情况, 如果当地有耐亚胺培南菌株, 在治疗疑似或确诊 Hi 感染时, 经验性选择抗菌药物需要避免使用亚胺培南, 而选择头孢曲松、左氧氟沙星或美罗培南等其他敏感抗菌药物。

目前, 耐碳青霉烯类 Hi 的耐药机制尚未完全阐明。本研究的 30 株 Hi_Ir 中, BLNAS 菌株 7 株, BLPAR 菌株 15 株, BLNAR 菌株 8 株, 分别占 23.33%、50.00%、26.67%。BLNAS 与 BLNAR 菌株可能通过非 β -内酰胺酶机制产生对亚胺培南的耐药性。其

中,5 株 BLNAS 菌株对除亚胺培南以外的其他 6 种抗菌药物均敏感,其可能存在亚胺培南异质性耐药机制。而 BLPAR 菌株对亚胺培南耐药则可能是 β -内酰胺酶与其他耐药机制共同作用的结果。LI 等^[11]对上海市 NTHi 的抗菌药物敏感性和遗传特征的研究发现,分离自成年人的近 10% 的菌株对美罗培南耐药,但未进一步探究其耐药机制;同时,其还发现 NTHi 菌株中普遍存在编码青霉素结合蛋白 3(PBP3)的基因突变和产 β -内酰胺酶,既导致了氨苄西林耐药,也降低了其他 β -内酰胺类药物的敏感性。KITAOKA 等^[12]报道了 7 株耐碳青霉烯类的 Hi 菌株,并发现其中 NUBL1772 菌株 PBP3 氨基酸序列的 525 位缬氨酸与 526 位天冬氨酸之间插入了蛋氨酸(V525_N526insM 变异)。将突变的编码 PBP3 的基因 *ftsI* 导入 Hi,然后将突变菌株进行药敏试验与 PBP3 亲和力试验,结果显示,包含 V525_N526insM 变异的 PBP3 影响了 Hi 对碳青霉烯类的敏感性。LÂM 等^[13]通过对 2016 年德国实验室监测的侵袭性耐碳青霉烯类 Hi 感染流行病学数据的研究发现,亚胺培南耐药主要见于 BLNAR 菌株和 β -内酰胺酶阳性的阿莫西林/克拉维酸耐药菌株,认为其耐药性可能与编码 PBP3 的基因突变有关。此外,CHERKAOUI 等^[14-15]通过染色体外排泵负性调节基因(*acrR*)测序、染色体外排泵(*AcrAB*)抑制实验等方法,探究外排泵对 NTHi 亚胺培南异质性耐药的影响,揭示了 *acrR* 的部分敲除能够导致其对 *AcrAB* 负性调控的缺失,同时发现外排泵抑制剂能够提高耐碳青霉烯类 Hi 对亚胺培南的敏感性,从而证明了增强的药物外排泵与变异的 PBP3、减慢的药物流入共同作用可能是导致亚胺培南耐药的重要机制。

本研究存在一定的局限性,未对 Hi_Ir 耐亚胺培南的分子机制进行研究。此外,对 Hi_Ir 的耐药模式、分子与遗传学特征及流行病学特点的研究还需要国内多中心共同合作完成,从而为新的抗菌药物作用靶点的选择、抗菌药物的研发、临床决策、感染性疾病相关诊疗指南的制定及疫苗的研发奠定基础。

参考文献

- [1] DE STEENHUIJSEN PITERS W A, HEINONEN S, HASRAT R, et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194(9):1104-1115.
- [2] KHATTAK Z E, ANJUM F. *Haemophilus Influenzae* [M/OL]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021; 12 [2021-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562176/>.
- [3] PHILLIPS Z N, BRIZUELA C, JENNISON A V, et al. Analysis of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates reveals selection for the expression state of parti-

- cular phase-variable lipooligosaccharide biosynthetic genes[J]. *Infect Immun*, 2019, 87(5):e00093-19.
- [4] NAITO S, TAKEUCHI N, OHKUSU M, et al. Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases in Japan from 2008 to 2015[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(7):e00141-18.
- [5] COLLINS L F, HAVERS F P, TUNALI A, et al. Invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* infection among adults with HIV in metropolitan Atlanta, Georgia, 2008—2018[J]. *JAMA*, 2019, 322(24):2399-2410.
- [6] VALLEJO J G, MCNEIL J C, HULTÉN K G, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease at Texas children's hospital, 2011 to 2018[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2019, 38(9):900-905.
- [7] LANGEREIS J D, DE JONGE M I. Invasive disease caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(10):1711-1718.
- [8] HEINZ E. The return of Pfeiffer's bacillus; rising incidence of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* [J]. *Microb Genom*, 2018, 4(9):e000214.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2020.
- [10] BARBOSA-CESNIK C, FARJO R S, PATEL M, et al. Predictors for *Haemophilus influenzae* colonization, antibiotic resistance and for sharing an identical isolate among children attending 16 licensed day-care centers in Michigan[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(3):219-223.
- [11] LI X X, XIAO S Z, GU F F, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in adult patients in Shanghai, China [J]. *Front Public Health*, 2020, 8:95.
- [12] KITAOKA K, KIMURA K, KITANAKA H, et al. Carbapenem-nonsusceptible *Haemophilus influenzae* with penicillin-binding protein 3 containing an amino acid insertion[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(8):e00671-18.
- [13] LÂM T T, NÜRNBERG S, CLAUS H, et al. Molecular epidemiology of imipenem resistance in invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany in 2016[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(8):2076-2086.
- [14] CHERKAOUI A, GAÏA N, BAUD D, et al. Molecular characterization of fluoroquinolones, macrolides, and imipenem resistance in *Haemophilus influenzae*; analysis of the mutations in QRDRs and assessment of the extent of the *AcrAB*-TolC-mediated resistance[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(11):2201-2210.
- [15] CHERKAOUI A, DIENE S M, RENZONI A, et al. Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(2):e9-e19.