

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2015.02.001

· 论 著 ·

某院流感嗜血杆菌耐药性及其对氨苄西林耐药机制

田磊¹, 张真¹, 陈中举¹, 李丽¹, 张蓓¹, 朱旭慧¹, 闫少珍¹, 汪玥¹, 高随¹, 简翠¹, 孙自镛¹, 叶嗣颖²

(1 华中科技大学附属同济医院, 湖北 武汉 430030; 2 华中科技大学同济基础医学院, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 了解流感嗜血杆菌对常用抗菌药物的耐药性及其对氨苄西林的耐药机制。方法 采用纸片扩散法和头孢硝噻吩纸片法, 对 2012 年 1 月 1 日—12 月 31 日某院住院及门诊患者送检标本分离的流感嗜血杆菌耐药性和 β -内酰胺酶进行检测, 聚合酶链反应(PCR)法对耐氨苄西林菌株进行 *TEM* 型和 *ROB* 型 β -内酰胺酶基因扩增。结果 100 例流感嗜血杆菌感染患者, 年龄段分布主要为 1~10 岁, 占 61.00%。流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率为 35.00%(35 株), 对复方磺胺甲噁唑耐药率高, 达 64.65%; 对左氧氟沙星和阿奇霉素敏感率最高, 分别为 97.96%、96.84%, 对环丙沙星、头孢噻肟、氯霉素、头孢呋辛和氨苄西林/舒巴坦敏感率均较高, 依次为 96.91%、92.78%、85.71%、77.89% 和 74.75%。100 株流感嗜血杆菌中, 21 株 β -内酰胺酶阳性, 且均为氨苄西林耐药株。对 35 株耐氨苄西林菌株进行 *TEM* 和 *ROB* 基因检测, 结果 22 株 *TEM* 型阳性, 未检出 *ROB* 阳性株。结论 流感嗜血杆菌对复方磺胺甲噁唑敏感率低, 对其他常用抗菌药物敏感率高; 流感嗜血杆菌对氨苄西林的主要耐药机制为产 *TEM* 型 β -内酰胺酶。

[关键词] 流感嗜血杆菌; 耐药机制; 抗药性; 微生物; β -内酰胺酶; 氨苄西林; 抗菌药物
[中图分类号] R378.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)02-0073-04

Antimicrobial resistance and ampicillin resistance mechanism of *Haemophilus influenzae* from a hospital

TIAN Lei¹, ZHANG Zhen¹, CHEN Zhong-ju¹, LI Li¹, ZHANG Bei¹, ZHU Xu-hui¹, YAN Shao-zhen¹, WANG Yue¹, GAO Sui¹, JIAN Cui¹, SUN Zi-yong¹, YE Si-ying² (1 Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2 Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective** To study the resistance to commonly used antimicrobial agents and ampicillin resistance mechanism of *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*). **Methods** Antimicrobial resistance and β -lactamase of *H. influenzae* isolated from inpatients and outpatients in a hospital from January 1 to December 31, 2012 were detected by Bauer-Kirby disc diffusion method and nitrocefin-based test, *TEM* and *ROB* β -lactamase genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). **Results** Of 100 patients infected with *H. influenzae*, 61.00% were aged 1-10 years. The resistance rate to ampicillin was 35.00% ($n=35$), resistance to sulphamethoxazole/trimethoprim was up to 64.65%; susceptibility rate to levofloxacin, azithromycin, ciprofloxacin, cefotaxime, chloramphenicol, cefuroxime, ampicillin / sulbactam was 97.96%, 96.84%, 96.91%, 92.78%, 85.71%, 77.89% and 74.75% respectively. Of 100 *H. influenzae* isolates, 21 were β -lactamase positive strains, and all were resistant to ampicillin. 35 ampicillin-resistant strains were performed *TEM* and *ROB* genes detection, of which 22 were *TEM* positive, *ROB* positive strain was not found. **Conclusion** *H. influenzae* is sensitive to most antimicrobial agents except sulphamethoxazole/trimethoprim. Producing of *TEM* β -lactamase is the major mechanism of ampicillin resistance in *H. influenzae*.

[收稿日期] 2014-06-29
[基金项目] 国家科技重大专项课题(2012ZX10004207)
[作者简介] 田磊(1980-), 男(汉族), 河北省晋州市人, 主管技师, 主要从事病原微生物检测和耐药机制研究。
[通信作者] 孙自镛 E-mail: zysun@tjh. tjmu. edu. cn

[Key words] *Haemophilus influenzae*; drug resistance mechanism; drug resistance, microbial; β -lactamase; ampicillin; antimicrobial agent

[Chin Infect Control, 2015, 14(2): 73-76]

流感嗜血杆菌引起的感染,一直都首选氨苄西林进行治疗。但是,随着抗菌药物的大量使用,对氨苄西林耐药的流感嗜血杆菌不断出现。流感嗜血杆菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要机制为 β -内酰胺酶的产生和青霉素结合蛋白的改变。目前,已知的 β -内酰胺酶主要有 TEM 型和 ROB 型。为探讨流感嗜血杆菌对氨苄西林的耐药机制,笔者对本院 2012 年分离的流感嗜血杆菌进行药敏试验,并对氨苄西林耐药株进行 TEM 和 ROB 基因检测。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2012 年 1 月 1 日—12 月 31 日本院住院及门诊患者送检标本中分离的流感嗜血杆菌 100 株,剔除来自同一患者相同部位的分离菌株。

1.2 材料 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛、头孢噻肟、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、阿奇霉素、氯霉素、头孢硝噻吩纸片、流感嗜血杆菌药敏培养基和营养添加剂 SR158,均为英国 OXOID 公司产品。

1.3 药敏试验方法 采用纸片扩散法进行药物敏感性试验,结果按美国临床实验室标准化协会(CLSI) 2012 年标准判断。质控菌株为 ATCC 49247,每周做 1 次室内质控。 β -内酰胺酶检测采用头孢硝噻吩纸片法检测。

1.4 细菌 DNA 模板的制备 采用煮沸法提取 DNA。取一环流感嗜血杆菌混匀于 100 μ L 蒸馏水中,制备悬液。100℃ 水浴中煮沸 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20℃ 保存。

1.5 β -内酰胺酶基因检测 β -内酰胺酶基因检测引物设计参考相关文献^[1],见表 1。PCR 反应体系总体积 50 μ L,包括 10 mmol/L dNTP 4 μ L,10 \times buffer 5 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L,上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 4 μ L,ddH₂O 34.75 μ L。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 1 min,53℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.6 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 产物 5 μ L 与 1 μ L 含溴酚兰的 Loading buffer 点样液混匀,加到含

GelRed 核酸染料的 1.0% 琼脂糖凝胶点样孔中,100V 电泳 30 min 后,在紫外灯下观察结果,并保存凝胶成像。

表 1 β -内酰胺酶 TEM 及 ROB 基因引物
Table 1 Primers of TEM and ROB genes of β -lactamase

名称	序列(5'-3')	产物长度(bp)
TEM-Forward	GAGTATTCAACATTTCGGTGTC	828
TEM-Reverse	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	
ROB-Forward	CGTTTATGTATGGGATACAGAA	185
ROB-Reverse	GGGTTACGTTATCGCCTAATT	

1.7 统计学分析 应用 WHONET 5.6 软件进行药敏数据分析。

2 结果

2.1 流感嗜血杆菌感染患者年龄分布 100 例流感嗜血杆菌感染患者,年龄段分布主要为 1~10 岁,占 61.00%。见图 1。

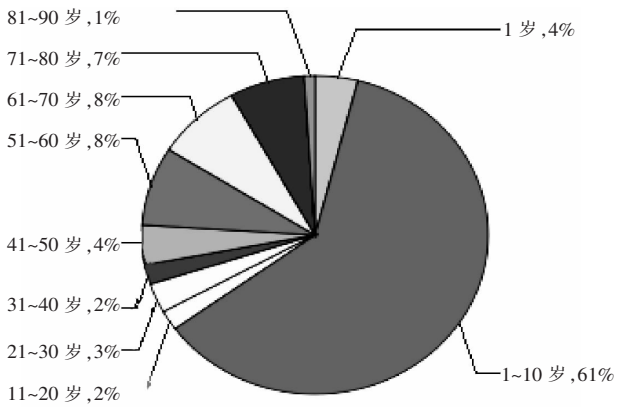


图 1 流感嗜血杆菌感染患者年龄分布
Figure 1 Age distribution of patients infected with *H. influenzae*

2.2 流感嗜血杆菌对常用抗菌药物药敏结果 流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率为 35.00%,对复方磺胺甲噁唑耐药率高,达 64.65%;对头孢噻肟、环丙沙星、左氧氟沙星、阿奇霉素、氯霉素、头孢呋辛和氨苄西林/舒巴坦的敏感率高(均>70%)。见表 2。

2.3 流感嗜血杆菌主要耐药表型分布 流感嗜血杆菌最常见的耐药表型为仅复方磺胺甲噁唑耐药型(对其余 5 种药物敏感),占 23.00%;其次为全部敏感型(氯霉素除外,未进行测试),占 22.00%。见表 3。

2.4 β-内酰胺酶检测 100 株流感嗜血杆菌中,21 株β-内酰胺酶阳性,且均为对氨苄西林耐药株。

2.5 TEM 和 ROB 基因检测 共 35 株菌耐氨苄西林,对其进行 TEM 和 ROB 基因检测,22 株 TEM 型阳性,未检出 ROB 阳性株。见图 2。

表 2 流感嗜血杆菌对常用抗菌药物的药敏结果(%)
Table 2 Susceptibility of *H. influenzae* to commonly used antimicrobial agents(%)

抗菌药物	株数	耐药	中介	敏感	非敏感
氨苄西林	100	35.00	6.00	64.00	—
氨苄西林/舒巴坦	99	25.25	0	74.75	—
头孢呋辛	95	18.95	3.16	77.89	—
头孢噻肟	97	—	—	92.78	7.22
环丙沙星	97	—	—	96.91	3.09
左氧氟沙星	98	—	—	97.96	2.04
复方磺胺甲噁唑	99	64.65	3.03	32.32	—
阿奇霉素	95	—	—	96.84	3.16
氯霉素	98	11.23	3.06	85.71	—

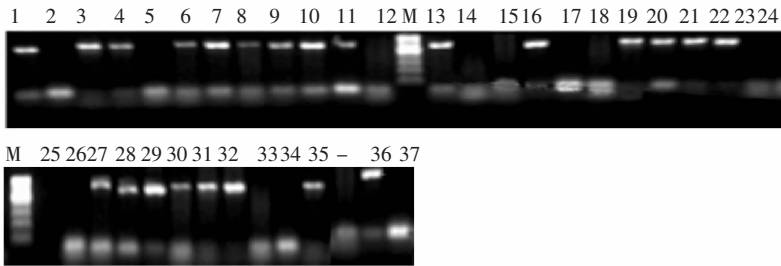
注:对头孢噻肟、环丙沙星、左氧氟沙星和阿奇霉素,CLSI 仅有敏感和非敏感折点

表 3 流感嗜血杆菌主要耐药表型分布

Table 3 Distribution of major drug resistance phenotypes of *H. influenzae*

耐药表型						菌株数量	%
氨苄西林	头孢呋辛	复方磺胺甲噁唑	头孢噻肟	环丙沙星	氯霉素		
敏感	敏感	耐药	敏感	敏感	敏感	23	23.00
敏感	敏感	敏感	敏感	敏感	—	22	22.00
耐药	敏感	耐药	敏感	敏感	敏感	15	15.00
耐药	敏感	耐药	敏感	敏感	耐药	8	8.00
耐药	耐药	耐药	敏感	敏感	敏感	7	7.00
耐药	耐药	敏感	敏感	敏感	敏感	5	5.00
耐药	敏感	敏感	敏感	敏感	敏感	4	4.00
耐药	耐药	耐药	耐药	敏感	敏感	3	3.00
敏感	耐药	耐药	敏感	敏感	敏感	3	3.00
耐药	耐药	耐药	敏感	敏感	耐药	3	3.00
耐药	耐药	敏感	耐药	敏感	敏感	2	2.00
敏感	敏感	耐药	敏感	敏感	敏感	2	2.00
敏感	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	2	2.00
耐药	敏感	耐药	耐药	敏感	敏感	1	1.00

—:表示未测试该药物



M 为 DL1000 DNA Marker (由 DAN 片段 1 000、700、500、400、300、200、100 bp 组成),编号 1—35 为 35 株耐氨苄西林菌株,36 为 TEM 基因阳性对照(828 bp),37 为 ROB 基因阳性对照(185 bp)

图 2 耐氨苄西林菌株 TEM-1 和 ROB-1 基因扩增产物电泳图

Figure 2 Amplification products of TEM-1 and ROB-1 in ampicillin-resistant strains

3 讨论

本次采用纸片扩散法对流感嗜血杆菌进行药敏试验,数据显示:流感嗜血杆菌对头孢噻肟、环丙沙

星、左氧氟沙星、阿奇霉素和氯霉素的敏感率较高,均>80.00%;对头孢呋辛和氨苄西林/舒巴坦敏感率亦较高,分别为 77.89%和 74.75%;仅对复方磺胺甲噁唑耐药率高,为 64.65%。耐氨苄西林的流感嗜血杆菌检出率为 35.00%。中国 CHINET 细

菌耐药性监测网 2013 年数据分析 968 株流感嗜血杆菌对氨苄西林的耐药率为 39.30%^[2]。2010 年中国 CHINET 耐药性监测结果显示,流感嗜血杆菌对复方磺胺甲噁唑的耐药率较高,达 64.50%,对头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸、阿奇霉素以及头孢呋辛的耐药率均<10%^[3]。卫生部全国细菌耐药性监测网 2010 年中南地区监测结果显示,耐氨苄西林流感嗜血杆菌检出率为 46.30%,对复方磺胺甲噁唑耐药率最高,为 58.90%,对头孢呋辛、头孢曲松、头孢噻肟、氯霉素和左氧氟沙星的敏感率较高,均>70%^[4]。2008 年湖北省细菌耐药性监测结果显示,耐氨苄西林流感嗜血杆菌检出率为 43.10%,流感嗜血杆菌除对复方磺胺甲噁唑耐药率较高(56.60%),对头孢噻肟、环丙沙星、左氧氟沙星、阿奇霉素、氯霉素、头孢呋辛和氨苄西林/舒巴坦的敏感率均较高,均>70%^[5]。本院 2012 年流感嗜血杆菌的药敏结果与上述文献报道的数据一致,对复方磺胺甲噁唑耐药率高,对头孢噻肟、环丙沙星、左氧氟沙星、阿奇霉素、氯霉素、头孢呋辛和氨苄西林/舒巴坦的敏感率高。

本次选择氨苄西林、头孢呋辛、复方磺胺甲噁唑、头孢噻肟、环丙沙星和氯霉素用于流感嗜血杆菌的耐药表型分析,耐药表型中抗菌药物按此顺序排列。结果显示,最常见的耐药表型为仅复方磺胺甲噁唑耐药型和全部敏感型(氯霉素除外,未进行测试)。本院分离的流感嗜血杆菌除对复方磺胺甲噁唑耐药率较高外,对其他常用抗菌药物依然保持着较高的敏感性。但随着 β -内酰胺类药物的大量使用,出现了多重耐药菌株。对 3 类及 3 类以上抗菌药物同时耐药的菌株称为多重耐药株(MDR),对除多粘菌素和替加环素以外的抗菌药物均耐药的菌株称为泛耐药菌株(XDR),对能得到的、有潜在抗菌活性的药物均耐药的菌株称为全耐药菌株(PDR)^[6]。由于本院未进行多粘菌素的药敏试验,替加环素也只是少量使用,所以本研究仅能分析多重耐药株。耐药表型分析,结果显示 MDR 占 24.00%,主要是对复方磺胺甲噁唑、氨苄西林和头孢类药物的联合耐药。MDR 的出现给临床治疗带来极大困难,临床医生应根据药敏结果合理选用抗菌药物,避免滥用药物。对喹诺酮类药物耐药的菌株较少,仅 2 株对环丙沙星耐药。分析原因,发现分离的流感嗜血杆菌主要来自儿童(1~10 岁儿童占 61%),可能与喹诺酮类药物在儿童中限制使用有关。

长期以来,氨苄西林一直作为治疗流感嗜血杆

菌感染的首选药物。但随着氨苄西林等 β -内酰胺类抗生素的应用,耐药菌株开始出现。编码 β -内酰胺酶的基因主要存在于质粒 DNA 上,少部分存在于染色体 DNA 上。质粒介导的耐药基因有两种,分别是在 1972 年和 1981 年命名的 TEM 型和 ROB 型^[7]。我们对 2012 年本院分离的 35 株耐氨苄西林流感嗜血杆菌进行 TEM 和 ROB 基因检测,发现 22 株产 TEM 型 β -内酰胺酶,未检测到产 ROB 型 β -内酰胺酶。用头孢硝噻吩纸片法检测流感嗜血杆菌产 β -内酰胺酶情况,发现 21 株 β -内酰胺酶检测阳性。1 株菌 β -内酰胺酶为阴性,但 TEM 基因检测呈阳性。分析出现此差异的原因可能是该菌株产 β -内酰胺酶量很少,常规方法(如头孢硝噻吩纸片法)难以检测出。说明本院流感嗜血杆菌产 β -内酰胺酶主要是 TEM 型。研究^[1,8]显示,绝大部分流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药是由于产 TEM 型 β -内酰胺酶。除产生 β -内酰胺酶外,流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药的另一机制是青霉素结合蛋白基因突变。此类菌株在临床上被称为 β -内酰胺酶阴性氨苄西林耐药株(BLNAR)。本次检测筛选出 13 株 BLNAR,关于其耐药机制及同源性分析,有待于进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 桂和翠,王中新,沈继录. 48 株流感嗜血杆菌耐药性分析及 β -内酰胺酶基因检测[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(1):56-59.
- [2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [3] 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.
- [4] 李丽,田磊,陈中举,等. 卫生部全国细菌耐药监测网 2010 年中南地区细菌耐药性监测[J]. 中国临床药理学杂志,2011,27(12):940-947.
- [5] 简翠,张蓓,王斌,等. 2008 年湖北省细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(1):8-12.
- [6] Falagas M E, Karageorgopoulos D E. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (PDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(7):1121-1122.
- [7] 俞桑洁. 我国儿科流感嗜血杆菌耐药分析[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(1):16-19.
- [8] Kim I S, Ki C S, Kim S, et al. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus influenzae* strains isolated in Korea[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2):453-460.

(本文编辑:李春辉)