

· 综述 ·

超广谱内酰胺酶研究进展

张阳根¹ 张海艳¹ 江先海¹ 综述 周赞虎² 审校

中图分类号 R446.5, Q936 文献标识码 C 文章编号 1008-0023(2007)03-0254-03

超广谱 β -内酰胺酶 (extended spectrum β -lactamases, ESBLs) 是丝氨酸蛋白酶的衍生物,它能够水解青霉素、广谱及超广谱头孢菌素和单环 β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺酶,且能被克拉维酸抑制。ESBLs 主要由肠杆菌科细菌产生,以肺炎克雷伯杆菌和大肠埃希菌为代表。ESBLs 基因由质粒介导,可通过接合、转化和转导等形式在细菌间扩散,给临床抗感染治疗造成极大的困难。目前,ESBLs 已成为细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性的主要原因。

1 超广谱内酰胺酶类型

自 1983 年德国学者首次从臭鼻克雷伯菌中发现了超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum β -lactamases, ESBLs) (SHV-2)^[1]以来,ESBLs 种类已超过 200 多种,其类型可以分为 TEM 型、SHV 型、OXA 型、CTX-M 型、其它型等 5 类。其中 TEM 和 SHV 型酶是临床上较常见的超广谱 β -内酰胺酶。

1.1 TEM 型 ESBLs

TEM 型 ESBLs 由 TEM-1 衍化而来。在 TEM 家族中 TEM-3 是第一个显示 ESBLs 特点的 TEM 型 β -内酰胺酶。TEM-3 起初被叫做 CTX-1,因为这个酶能够增强细菌对头孢噻肟耐药而得名^[2]。Knox JR^[3]认为 Gly238-Ser 的突变提高了对头孢噻肟的水解能力。2005 年发现的 TEM-94^[4] 发生了 104,238 氨基酸位点的改变,药敏实验证实其对头孢泊肟和头孢噻肟耐药,证明了 Knox 的推论;但是 2006 年在广州地区发现的新型内酰胺酶 TEM-116 没有发生上述氨基酸位点的取代,却具备 ESBLs 特性^[5],其机理有待进一步研究。

在 TEM 型 ESBLs 中,还有小部分是抑制剂耐药性酶 (IRT)。2005 年 F. Robin 等^[6]报道了一种新型的抑制剂耐药性酶 TEM-109(CMT-5),它同时具有 TEM-6 超广谱内酰胺酶的特性和 TEM-33(IRT-5)对抑制剂的耐药性,它代表了一种新型 ESBLs 的出现。

1.2 SHV 型 ESBLs

SHV 型 ESBLs 是由 SHV-1 衍化而来。SHV 家族中第一个 SHV 型 ESBLs 是 SHV-2。SHV-2 发生了 Gly-238-Ser 位点的突变,这增加了对氧亚氨基类抗生素的亲力和水解能力。对比其它的 SHV 型 ESBLs 氨基酸序列分析发现,氨基酸的突变主要集中在 179, 238, 240, 205 位点,而 164, 179, 238

位点中任一位点的突变对 ESBLs 扩大底物范围是必需的。卢月梅等^[7]对新型 β -内酰胺酶 SHV-59 的研究发现,其发生了 Ala 134 Val 和 Pro 269 Leu 位点的变化。药敏实验结果显示,携带 SHV-59 基因的菌株对氨苄西林/舒巴坦耐药,对头孢噻肟中介,对其他药物均敏感。

1.3 OXA 型 ESBLs

至今已知的 OXA 亚型共有 49 种,其中属于 ESBLs 的只有 18 种。OXA 型 ESBLs 菌株对酶抑制剂均耐药或仅低度敏感,特别是对青霉素类抗生素(包括苯唑西林及相关复合制剂)有高度水解活性^[8]。有文献报道,OXA 型 ESBLs 主要涉及铜绿假单胞菌^[9]和鲍氏不动杆菌^[10,11]。2004 年 Poirat L. 等^[12]首次在肠杆菌科的肺炎克雷伯菌中发现了 OXA 型 ESBLs。研究发现,该菌对包括碳青霉烯类在内的几乎所有 β -内酰胺类抗生素耐药。

1.4 CTX-M 型 ESBLs

自 Bauernfeind 等^[13]首次报道 CTX-M 型 ESBLs 以后,CTX-M 型 ESBLs 才逐渐被认识^[14]。CTX-M 型 ESBLs 表现出对头孢噻肟高水平耐药,而对头孢他啶的水解力很弱。在体外药敏实验中,产 CTX-M 型 ESBLs 的菌对头孢他啶相当敏感。但是能否用头孢他啶治疗由产 CTX-M 型 ESBLs 的细菌引起的感染一直缺少体内实验依据。周建英等^[15]用头孢他啶治疗产 CTX-M-14 型 ESBLs 大肠埃希菌造成的细菌性腹膜炎时,发现其治疗效果明显好于头孢噻肟,而与哌拉西林/他唑巴坦相当。这为利用头孢他啶治疗产 CTX-M 型 ESBLs 的细菌的感染提供了试验依据。

1.5 其它类型的 ESBLs

其他的一些 ESBLs,如 VEB、GES、BES、CME、PER 等,大多数容易水解头孢他啶,且呈区域性流行。VEB (Vietnamese extended-spectrum β -lactamase) 型 ESBLs 首次发现于越南,对氧亚氨基 β -内酰胺类抗生素高度耐药。GES (Guiana extended-spectrum β -lactamase) 型 ESBLs 首次发现于法国,对头孢他啶和头孢西丁耐药。BES (Brazil extended-spectrum β -lactamase) 型 ESBLs 首次发现于巴西,对氨曲南、头孢噻肟和头孢他啶高度耐药。CME 型 ESBLs 是从脑膜炎球菌 (Chryseobacterium meningosepticum) 中分离到的一类染色体介导的 β -内酰胺酶。PER 型 ESBLs 首次发现于法国,其主要在地中海沿岸国家流行。

2 ESBLs 的检测方法

在医院内,产 ESBLs 的菌株主要存在于临床分离的革兰阴性杆菌,以重症监护病房产 ESBLs 的菌株分离率为最高,其次为内科、外科^[16],这与上述病房危重患者多、住院时间长、

作者单位:363000 1.解放军 175 医院,厦门大学医学院附属医院;2.漳州出入境检验检疫局

作者简介:张阳根,男,1956 年生,江西奉新县人,副主任技师,科室主任,毕业于第三军医大学检验系,主要从事临床免疫学工作。

* 通讯作者, E-mail: zzh_523@163.com

机体抵抗力低下、长期滥用抗生素以及近期手术、机械治疗等原因有关。由于细菌可通过质粒的转化、结合、转导等形式使得耐药基因在细菌间快速扩散,从而造成严重的医院交叉感染和院外耐药菌的扩散,甚至引起爆发流行,所以准确检测 ESBLs 的产生至关重要,及早检测 ESBLs 有助于制定相应的抗感染措施,为其他的治疗和预防打下基础。目前对于产 ESBLs 的菌株的检测主要分为表型确认试验和分子生物学检测两大类。

2.1 表型确认试验

2.1.1 表型确认试验最经典的为肉汤稀释法和纸片扩散法,二者是美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)1999年标准推荐的检测 ESBLs 的标准方法。其主要原理是 ESBLs 水解第三代头孢菌素的活性可被酶抑制剂所抑制。

根据以上的标准方法,后来又研究出了 Etest 法、Vitek 法、三维实验法(TD)双纸片、协同扩散法(DDS)等快速简便的方法,特别 Etest 法、Vitek 法已经商品化,在临床上得到了广泛的应用。

2.1.2 Etest 法 Etest 是瑞典 AB BIODISK 公司推出一种商品化的 ESBL 检测试纸条 PDM psilometer。其原理是根据绝大多数 ESBL 对克拉维酸是敏感的,因此可用一种三代头孢菌素和含克拉维酸的该种三代头孢菌素作为一组测试系统,比较两者的 MIC 值可进行检测 Etest 检测融合了肉汤稀释法和纸片扩散法的优势,具有操作简单,无需特殊设备,不用作繁琐的稀释而能直接报告 MIC 值(具有 7 个连续的药物浓度梯度),而且基本不受接种菌量、细菌生长期以及低酶菌株等的影响,是一种确证试验。

2.1.3 Vitek 采用 vitek-NT 卡片,通过测定头孢噻肟和头孢他啶及它们与酶抑制剂克拉维酸的联合制剂对待检菌的抑制作用进行判断。Vitek 法敏感性和特异性远远优于单纸片法,而且用 Vitek 法检测产 ESBLs 菌株操作简便,结果准确,耗时短,影响因素少,还可同时进行 15 种抗生素耐药性分析。该方法在临床上得到了广泛的应用。

2.2 分子生物学的检测

主要有 PCR、核酸杂交、DNA 指纹和基因序列分析。

2.2.1 PCR 法是目前常用的检测方法。以往对 β -内酰胺酶基因检测与分型一般采用 PCR 扩增增加探针杂交技术。此方法过于繁复,费时费力,且随着亚型的增加需要不断再设计探针,目前已较少应用。

2.2.2 DNA 指纹。联用 DNA 指纹技术中的 PCR 单链构象多态性和 PCR 限制性片段长度多态性是检测 SHV 变种的一种快速检测基因突变的方法,但不能确定 SHV 型 ESBLs 的存在。

2.2.3 序列分析是基因型鉴定的标准方法,随着 DNA 测序技术的不断进步,测序费用平民化而且一次测序的长度大为延长,由于 β -内酰胺酶基因全长仅 1000bp 左右,目前已可方便地进行全长基因检测。糜祖煌等^[17]利用该方法在临床分离株中成功的检测出了 TEM 基因和 SHV 基因,这为国内耐药菌的监测、耐药机制和分子流行病学研究提供了手段。

3 对超广谱内酰胺酶的治疗与预防

3.1 对产 ESBL 菌株的引起的感染的治疗

对产 ESBL 菌株的严重感染的治疗可选用碳青霉烯类抗生素,轻、中度感染可选头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/三唑巴坦,也可根据药敏结果选用头霉素类、氨基糖苷类或喹诺酮类抗菌药物,疗效不佳时可改用碳青霉烯类抗生素。头孢他啶、头孢吡肟体外敏感性较高或感染部位浓度较高时可以使用,但需密切观察。

3.2 对超广谱内酰胺酶的控制

3.2.1 提高标本的送检率。2006 年刘强等^[18]报道一例由志贺菌引起的腹泻由于没有得到明确的病原学诊断,从而导致抗生素用药的失败。因此为了更好地控制临床感染,临床应提高标本送检率。早期发现多重耐药菌株,及早合理使用抗生素。

3.2.2 加强对 ICU 的监控。对产 ESBLs 菌的患者进行隔离。施保华等^[19]调查各科室感染 ESBLs 的情况,发现医院内 ICU 病房和长期住院的慢性重症患者是产 ESBLs 菌的主要来源,而且患者住院后,随着住院时间的延长,感染 ESBLs 菌的概率也越高。因此有必要对收入 ICU 病房的患者和长期卧床患者应加强隔离措施,严格消毒,及时对病房环境耐药菌株监测,以便控制产 ESBLs 菌在医院内的扩散。

3.2.3 寻找新的治疗手段。产 ESBLs 大肠埃希菌不仅对大部分 β -内酰胺类抗生素耐药,而且也对氨基糖苷类、喹诺酮类等一系列药物耐药,使相应抗菌药物的选择范围大为缩小,从而导致临床治疗失败,死亡率增加。因此,亟待寻找新型抗感染药物,而噬菌体抗感染作为一种有效的生物学治疗手段重新得到人们重视。徐敏超等^[20]运用宽噬噬菌体 9882 治疗小鼠产 ESBLs 大肠埃希菌全身感染显示出明显的治疗效应,未引起不良反应及强烈的免疫反应。因此,噬菌体生物制剂在临床抗多重耐药菌感染的应用有着极为广阔的前景。

临床微生物实验室应快速准确检测产 ESBLs 菌株,及时与临床联系,减少经验用药和盲目用药,合理使用抗菌药物,对有效地治疗疾病和控制 ESBLs 菌株感染具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Knothe H, Shah P, Kremery V, et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*[J]. *Infection*, 1983, 11:315-317.
- [2] Srot D, Srot J, Labia R, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987,20:323-334.
- [3] KNOX J R. Extended spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity and three-dimensional structure [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995,39:2593-2601.
- [4] Anna Baraniak, Janusz Fiett, Agnieszka Mro wka et al. Evolution of TEM-type Extended spectrum β -lactamases in Clinical Enterobacteriaceae Strains in Poland[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005,1872-1880.
- [5] Jeong S, Bae I, Lee J, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase produced by clinical isolat- (下转第 244 页)

变及多种抗生素耐药基因等有关,因此临床对铜绿假单胞菌感染主张应用阿米卡星、亚胺培南、哌拉西林/三唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦等一线抗菌药物治疗,必要时根据药物敏感性试验结果联合应用抗菌药物。鲍曼不动杆菌对亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦和阿米卡星的耐药率较低,可选用上述药物治疗,亦可根据药敏结果选用其他β-内酰胺类抗菌药物治疗,鲍曼不动杆菌耐药率在增高,与该菌的外膜通透性较低、产 OXA-23 碳青霉烯酶、外膜蛋白减少、AmpC 酶表达提高、青霉素结合蛋白(PBP)2 缺失等耐药机制同时存在^[6]。近年来,嗜麦芽窄食单胞菌分离有上升趋势,该菌主要产生两种β-内酰胺酶,即头孢菌素酶和金属酶以及氨基糖苷修饰酶^[7],因而对亚胺培南天然耐药,可选用头孢哌酮/舒巴坦、替卡西林/克拉维酸、哌拉西林/三唑巴坦、环丙沙星、左氧氟沙星等抗菌药物作为临床治疗。

非发酵菌的分离率、耐药性有升高趋势,动态了解病原菌的分离率,合理使用抗菌药物,降低非发酵菌的感染率,遏制院内感染扩大的趋势,延缓

细菌耐药性的产生,提高治愈率。

参 考 文 献

- [1] Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of clinical microbiology[M]. 7th Edition. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999, 552-554.
- [2] Quinn JP. Clinical problem posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens[J]. Clin Infect Dis, 1998,27(Suppl11):S117-124.
- [3] 王佩芬,黄源春.常见非发酵革兰阴性杆菌的体外抗菌活性分析[J].中华医院感染学杂志, 2003,13:1174-1176.
- [4] 罗百灵,王丽静,胡成平,等.1995-2004 年下呼吸道感染病原菌变迁[J].中国感染与化疗杂志, 2006,(3):182-185.
- [5] 颜秉兴.465 株非发酵菌耐药分析[J].江西医学检验, 2004,22(5):433-434.
- [6] Fernandez- Cuenca F, Martinez- Martinez L, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrob Chemother, 2003,51:565-574.
- [7] Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L-serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997,41(7):1460-1463.
- [8] (上接第 255 页)es of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey [J]. Clin Microbiol, 2004,42(7):2902-2906.
- [6] Robin F, Delmas J, Chanal C, et al. TEM-109 (CMT-5), a Natural Complex Mutant of TEM-1-Lactamase Combining the Amino Acid Substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5) [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005,44:443-447.
- [7] 卢月梅,张阮章,何林,等.一种新型β-内酰胺酶 SHV-59 的发现[J].中华医院感染学杂志, 2005,09(15):965-969.
- [8] Thomson K, Moland E. Version 2000: the new β-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium [J]. Microb Infect, 2000,2(10):1225-1235.
- [9] Weldhagen G, Poirer L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact [J].Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003,47:2385-2392.
- [10] Haluk V, Fatma B, Murat K, et al. High Prevalence of OXA-51-type class D-β-lactamases among cefazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.:coexistence with OXA-58 in multiple centres[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006,50:537-542.
- [11] T.W.Boo, F.Walsh, B.Crowley. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006,50:1101-1102.
- [12] Poirer L, Heritier C, Tolun V, et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004,48(1):15-22.
- [13] Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*[J]. Infection, 1999,18(5):294-298.
- [14] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat [J].Clin Microbiol, 2001,14:933-951.
- [15] 周建英,许攀峰,陈环,等.头孢他啶对家兔产 CTX-M-14 型超广谱β-内酰胺酶细菌性腹膜炎的治疗作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005,28(10):689-693.
- [16] 施保华,褚娜丽,孙胤,等.产超广谱β-内酰胺酶革兰阴性杆菌在医院内的分布及对抗菌药物耐药性监测[J].中华医院感染学杂志, 2006,16(7):814-816.
- [17] 糜祖煌,陆亚华,丁云芳.β-内酰胺酶 TEM、SHV 全长基因检测与应用[J].中华医院感染学杂志, 2004,14(11):1201-1203.
- [18] 刘强,陈宏霞.大便中检出产超广谱β-内酰胺酶的福氏志贺菌 1 例[J].中国实验诊断学, 2006,3(10):324-324.
- [19] 施保华,褚娜丽,孙胤,等.产超广谱β-内酰胺酶革兰阴性杆菌在医院内的分布及对抗菌药物耐药性监测[J].中华医院感染学杂志, 2006,16(7):814-816.
- [20] 徐敏超,王晶,严群,等.宽噬菌体治疗实验性小鼠产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌感染的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2006,16(3):252-255.