

- [23] Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy [J]. *J Circadian Rhythms*, 2010, 8(1): 3-5.
- [24] Gery S, Koeffler HP. Per2 is a C/EBP target gene implicated in myeloid leukemia [J]. *Integr Cancer Ther*, 2009, 8(4): 317-320.
- [25] Yang MY, Yang WC, Lin PM, et al. Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia [J]. *J Biol Rhythms*, 2011, 26(2): 136-148.
- [26] Sun CM, Huang SF, Zeng JM, et al. Per2 Inhibits K562 Leukemia Cell Growth In Vitro and In Vivo Through Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction [J]. *Pathol Oncol Res*, 2010, 16(3): 403-411.
- [27] Thoennissen NH, Thoennissen GB, Abbassi S, et al. Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and critical circadian clock downstream target gene PER2 are highly deregulated in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(8): 1577-1585.
- [28] Hoffman AE, Zheng T, Stevens RG, et al. Clock-Cancer Connection in Non-Hodgkin's Lymphoma: A Genetic Association Study and Pathway Analysis of the Circadian Gene Cryptochrome 2 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3605-3613.
- [29] Eisele L, Prinz R, Klein-Hitpass L, et al. Combined PER2 and CRY1 expression predicts outcome in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Eur J Haematol* 2009, 83(4): 320-327.
- [30] Soták M1, Sumová A, Pácha J. Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer [J]. *Annals of Medicine*, 2014, 46(2): 221-232.
- [31] Zeng ZL, Wu MW, Sun J, et al. Effects of the biological clock gene Bmal1 on tumour growth and anti-cancer drug activity [J]. *J Biochem*, 2010, 148(3): 319-326.
- [32] Takao Miki, Tomoko Matsumoto, Zhaoyang Zhao, et al. p53 Regulates Period2 Expression and the Circadian Clock [J]. *Nat Commun*, 2013, 2(4): 2444. doi: 10.1038/ncomms3444.
- [33] Wang Y, Solt LA, Kojetin DJ, et al. Regulation of p53 Stability and Apoptosis by a ROR Agonist [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34921.
- [34] Wang F, Li C, Yongluo, et al. The Circadian Gene Clock Plays an Important Role in Cell Apoptosis and the DNA Damage Response In Vitro [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2015, 12(1): 15-18. pii: 1533034615585433.
- [35] Hashiramoto A, Yamane T, Tsumiyama K, et al. Mammalian Clock Gene Cryptochrome Regulates Arthritis via Proinflammatory Cytokine TNF- α [J]. *J Immunol*, 2010, 184(3): 1560-1565.
- [36] Wang DN, Zhang L, Wan YF, et al. Space meets time: Impact of gravity on circadian timing systems [J]. *Supplement of Science*, 2014, 30(2): 215-217.
- [37] Lodish MB. Clinical review: kinase inhibitors; adverse effects related to the endocrine system [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(4): 1333-1342.

(收稿日期: 2015-11-28)

• 综 述 •

SHV 型超广谱 β -内酰胺酶的研究进展

张 玲 综述, 黄永茂 Δ 审校

(西南医科大学附属第一医院感染科, 四川泸州 646000)

关键词: SHV; 超广谱 β -内酰胺酶; 突变与耐药; 流行分布**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.029**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)07-0944-03

随着抗菌药物被大量应用于临床, 临床分离菌株产生超广谱 β -内酰胺酶成为细菌对新型 β -内酰胺类抗菌药物耐药的重要机制。超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum beta-lactamases, ESBLs), 是指由细菌质粒介导的能水解氧亚氨基 β -内酰胺抗菌药物, 并可被 β -内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸)所抑制的一类酶, Ambler 分类属于 A 类, Bush 分类属于 2be 群, 根据基因同源性的不同可分为 5 组: TEM 型、SHV 型、OXA 型、CTX-M 型和其他型(如: PER 型、VEB 型、BES 型等)。由于不同国家、地区的菌株来源和用药情况不同, 产 ESBLs 细菌的耐药基因型也有差异。SHV 型是较早发现的酶型之一, 且产 SHV 型 ESBLs 的菌株日益增多, 对第三代头孢菌素等呈现多重耐药现象, 给临床抗感染治疗带来很大的困难, 世界各地已引起高度重视^[1]。

1 SHV 型 ESBLs

SHV 型 ESBLs 是由革兰阴性菌产生的由质粒介导的 β -内酰胺酶, 属于 Bush 分类 2be 组, 分子生物学 A 类酶, 具有 ESBLs 的一般特性。SHV 是巯基变量的缩写, 具有水解头孢噻吩中巯基的作用。SHV 型 ESBLs 呈碱性, PI 为 7.0~8.2。

多数细菌均可产生 SHV 型 ESBLs, 如: 臭鼻克雷伯菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌、异型柠檬酸杆菌等。早在 1979 年, Matthew 等^[2]发现革兰阴性菌的质粒介导一种耐青霉素药物的 β -内酰胺酶, 与 TEM-1 的氨基酸序列具有 63.7% 同源性, 与 TEM 型 ESBLs 不同的是, 它完全不能水解苯唑西林, 但是水解氨苄西林的能力比 TEM 酶强, 根据这种酶的生物化学特性而命名为 SHV-1。初次被报道的 SHV 型 ESBLs 是 1983 年德国从耐头孢噻肟的臭鼻克雷伯菌中分离得到 SHV-2。SHV-2 与 SHV-1 相比, 仅是在 238 位点的甘氨酸被丝氨酸取代(Gly-238-Ser 突变), 这使得 SHV-2 具有超广谱的特性, 能作用的底物范围大大增加, 并对第三代头孢菌素有水解作用。此后, SHV 型系列的 ESBLs 陆续在法国、美国、瑞士、韩国、希腊、意大利、阿尔及利亚等全世界范围被发现。目前, Bush 和 Jacoby 在 lahey 网站[http://www.lahey.ory/studies]上公布了 100 多种 SHV 型酶。

2 SHV 型 ESBLs 的突变与耐药

SHV 型 ESBLs 均由 SHV-1 型广谱 β -内酰胺酶的编码基

因发生点突变后衍生而来,在氨基酸序列上常表现为酶蛋白结构中 1~4 个氨基酸点突变,引起底物谱的扩大从而导致细菌对新型 β -内酰胺类抗菌药物耐药,并且具有快速转导耐药基因的能力。第 130、179、205、238、240 等位点的突变是 SHV 型酶底物谱扩大的关键位点,其中第 238 位和第 240 位氨基酸是影响酶水解能力的主要位点。第 238 位由丝氨酸替换甘氨酸,增强了对头孢他啶的水解能力,降低了对头孢噻啶、头孢噻吩以及氨苄西林的水解活性;第 240 位由赖氨酸替换谷氨酰胺,增强了对头孢噻吩的水解能力;第 205 位由亮氨酸替换精氨酸,增强了对头孢他啶的水解能力,降低了对头孢噻肟、头孢吡肟以及头孢曲松的水解活性^[3];第 130 位由丝氨酸替换甘氨酸,影响了酶对底物的亲和力。根据文献报道,SHV-1 的第 179 位天冬氨酸和 149 位丙氨酸可以分别被丙氨酸和缬氨酸取代,突变为 SHV-6 和 SHV-38。由此可见,不同的突变方式和突变位点,都会产生新的 SHV 型 ESBLs,其特性也会有所不同。如:SHV-1 对氯霉素、磺胺类和四环素类耐药;SHV-2 对青霉素类、头孢氨噻、头孢曲松、头孢噻吩、头孢他啶和氨基南耐药;SHV-3 可能是 SHV-2 的突变酶;SHV-4 对氨基南、阿米卡星和第三代头孢菌素耐药;SHV-5 对头孢菌素和单环菌素耐药;SHV-6 对头孢哌酮/舒巴坦耐药;SHV-8 对广谱头孢菌素和单环菌素耐药;SHV-10 是 SHV-9 的突变酶,对部分青霉素耐药,且对 β -内酰胺酶抑制剂耐药;SHV-16 对氨苄西林、替卡西林和头孢他啶耐药;SHV-26 对头孢噻吩的耐药率高于 SHV-25 和 SHV-1,对阿莫西林/克拉维酸中度耐药。产 SHV 型 ESBLs 的革兰阴性杆菌对青霉素、头孢类、氨基南耐药,且部分还对 β -内酰胺酶抑制剂耐药,故针对其感染首选碳青霉烯类抗菌药物治疗^[4]。

3 SHV 型 ESBLs 基因型的检测方法

耐药基因检测已成为细菌耐药机制及分子流行病学研究中最为常用的研究方法^[5]。既往常用的 SHV 型 ESBLs 基因型检测方法有:聚合酶链反应(PCR)、*blashv* 基因测序及分型、聚合酶链反应:单链构象多态性分析(PCR-SSCP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)等。焦磷酸测序是近年发展起来的 DNA 序列分析技术^[6],以短片段 PCR 为基础,快速、准确、批量进行基因多态性分析,应用于细菌鉴定、细菌基因分型及检测细菌耐药基因。2012 年,黄源芳等^[7]应用焦磷酸测序技术对肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌进行 SHV 基因 35 位和 43 位密码子基因多态性分析,以对 SHV 型 ESBLs 基因型快速分型。焦磷酸测序技术使用 SNP 分析软件,分析 SHV 基因的 35 位和 43 位密码子;35 位密码子突变可使亮氨酸变为谷氨酰胺(L35Q);43 位密码子突变,可使精氨酸变为丝氨酸(R43S);根据氨基酸的改变,到 SHV beta-lactamase Engineer Database (<http://www.laced.uni-stuttgart.de/classA/SHVED/>) 对比,即可对 SHV 基因进行分型。

4 国内外 SHV 型 ESBLs 的流行分布情况

自 1983 年第一株产 SHV 型 ESBL 的鼻臭克雷伯菌报道以来,SHV 型系列超广谱 β -内酰胺酶陆续被分离。SHV 型 ESBLs 基因存在于质粒中,通过转化、转导、转座、接合转移和整合等方式使细菌的耐药性不仅可以通过质粒进行水平传播,使耐药性在不同种属细菌中传递,也可以通过染色体基因垂直传播给子代。根据目前的报道情况来看,SHV 型 ESBLs 多数存在于肠杆菌科细菌中,特别是肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌。后来在其他肠杆菌科细菌中也检出 SHV 型 ESBLs,如 2004

年在中国在我国浙江报道的鲍曼不动杆菌中携带的 SHV-12。另外,在非肠杆菌科细菌中亦有检出 SHV 型酶的报告,如 2004 年在希腊报道的铜绿假单胞菌携带的 SHV-5^[8]。迄今为止,大部分 SHV 型衍生酶为 ESBLs,但随着抗菌药物和酶抑制剂的广泛应用,出现了对 β -内酰胺酶抑制剂耐药的突变酶,如早期发现的 SHV-10 和 2013 年在深圳分离的对头孢哌酮/舒巴坦耐药的 SHV-6^[9]。由于不同国家和地区患者情况和用药习惯不同,使得临床分离的 SHV 耐药基因亚型存在差异,故进行 ESBLs 的流行分布情况调查,从而指导临床医生合理使用抗菌药物,预防和控制院内感染。

4.1 国内 SHV 型 ESBLs 的流行分布情况 在中国,SHV 型 ESBLs 以 SHV-12 型为主,其他亚型也在不断地出现,并且在全国各地出现了一定程度的流行。2007 年在合肥,SHV-89 在产 ESBLs 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中被发现,并在国内外初次被报道,序列号为 DQ193536。2009 年湖南湘雅医院收集 171 株多药耐药(至少对两类抗菌药物耐药)肠杆菌科细菌,发现 SHV-12 为主要流行的 SHV 型 ESBLs^[10]。2009 年在台湾地区报道一项在台大医院 ICU 研究产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的基因分型,发现 9 种 SHV 型 ESBLs:SHV-2、SHV-26、SHV-27、SHV-31、SHV-61 等,以 SHV-12 为主(26.7%)^[11]。2013 年安徽地区 40 株 PMQR(质粒介导的喹诺酮类药物耐药)基因阳性肠杆菌(21 株大肠埃希菌和 19 株肺炎克雷伯菌)中检出含 SHV 型 ESBLs 2 株,SHV-12 和 SHV-26 型各 1 株,余均为广谱 β -内酰胺酶 SHV-1 及 SHV-11 型^[12]。2015 年四川大学研究 153 株大肠埃希菌和 70 株肺炎克雷伯菌产 SHV 型 ESBLs 基因多态性,检出 151 株产 ESBLs,SHV 基因的比例为 18.5%,其中 9 株 SHV-28、7 株 SHV-11、4 株 SHV-1、3 株 SHV-12,另发现 1 种新基因,NCBI 基因组中未收录,在 GenBank 序列号为 JX192924^[13]。

4.2 国外 SHV 型 ESBLs 的流行分布情况 在国外,不同的国家和地区,SHV 亚型各不相同。2007 年荷兰报道产 SHV-31 型 ESBLs 的肺炎克雷伯菌是造成医院感染爆发的主要原因^[14]。2009 年 Rodriguez 等^[15]在西班牙研究发现,产 SHV 型 ESBLs 是社区获得性大肠埃希菌感染的显著原因,最普遍的是 SHV-12,同时发现分离出 SHV 型菌株的患者特点是年龄大于 60 岁和患有严重的基础疾病。2010 年韩国研究由产 ESBLs 肺炎克雷伯菌引起的菌血症和尿路感染发现,SHV 型 ESBLs 占 41.6%,其中以 SHV-12 为主(23.3%)^[16]。2010 年美国德克萨斯州检测肠杆菌科中 SHV 型 ESBLs 的基因型,发现仍是以 SHV-12 为主^[17]。2011 年意大利研究 SHV 型 ESBLs 在肠杆菌科流行中发现 4 种 SHV 型酶:SHV-2a、SHV-5、SHV-12 和 SHV-28,最普遍的是 SHV-12^[18]。2014 年土耳其安卡拉检测 43 株志贺氏菌的 ESBLs 基因分类,发现 5 株产 SHV-12^[19]。2015 年在伊朗北部研究儿科尿路感染大肠埃希菌产 ESBLs 的基因型发现 SHV 型占 44%,其中以 SHV-12 和 SHV-26 为主^[20]。提示在世界范围内仍是以 SHV-12 型 ESBLs 为主要流行株。与既往研究结果,即 SHV-4、SHV-5 有在世界范围内流行的趋势有所不同。

综上所述,产 SHV 型 ESBLs 菌株在世界范围内广泛的流行,且新的 SHV 型 ESBLs 亚型也在不断出现,这与大量使用广谱抗菌药物所造成的选择和进化压力有关,同时也与质粒介导的耐药基因在不同种属细菌之间转移和传播有关,这极易造成医院感染的爆发。因此,在临床工作中应重视产 SHV 型

ESBLs 菌株的相关监测研究,以控制 SHV 型 ESBLs 菌株的传播。

参考文献

[1] Liu HH, Wang YL, Wang G, et al. The prevalence of Escherichia coli strains with extended spectrum beta-lactamases isolated in China[J]. Front Microbiol, 2015, 6(3): 335.

[2] Abolfazl G, Neda S, Dariush S, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Produced by Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae Isolates in an Educational Hospital[J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(10): e11758.

[3] Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(1): 144-153.

[4] Sibhghatulla S, Jamale F, Shazi S, et al. Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in North-Indian hospitals[J]. Saudi J Biol Sci, 2015, 22(1): 37-41.

[5] Mojtaba M, Shahin NP, Taghi ZS, et al. Occurrence of SHV, TEM and CTX-M β -Lactamase Genes Among Enteropathogenic Escherichia coli Strains Isolated From Children With Diarrhea [J]. Jundishapur J Microbiol, 2015, 8(4): e15620.

[6] Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, et al. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release[J]. Anal Biochem, 1996, 242(1): 84-89.

[7] 黄源芳, 宋晓红, 尹亚非, 等. 焦磷酸测序检测产 ESBLs 革兰阴性菌的 SHV 基因型[J]. 检验医学, 2012, 27(10): 824-829.

[8] Poirel L, Lebossi E, Castro M, et al. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamases SHV-5-Producing isolates of Pseudomonas aeruginosa in Achens Greece[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(20): 2277-2279.

[9] 蔡朝民, 程明刚, 刘香萍, 等. 产 ESBLs 肺炎克雷伯杆菌 SHV 型 β -内酰胺酶临床研究[J]. 中国热带医学, 2013, 13(12): 1528-1529.

[10] 李虹玲, 刘文恩, 陈腊梅, 等. 湖南地区 SHV 型超广谱 β -内酰胺酶的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(11): 1328-1331.

[11] Shu JC, Chia JH, Kuo AJ, et al. A 7-year surveillance for ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae at a univer-

sity hospital in Taiwan; the increase of CTX-M-15 in the ICU[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(2): 253-263.

[12] 陈聪, 叶英, 江洋, 等. 安徽地区 PMQR 基因阳性大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中 ESBLs 流行特征的研究[J]. 中国抗菌药物杂志, 2013, 38(3): 239-244.

[13] Li JL, Ji XL, Deng XH, et al. Detection of the SHV genotype polymorphism of the extended-spectrum β -actamase-producing Gram-negative bacterium[J]. Biomedical Reports, 2015, 3: 261-265.

[14] Mazzariol A, Roelofsens E, Koncan R, et al. Detection of a New SHV-Type Extended-Spectrum β -Lactamase, SHV-31, in a Klebsiella pneumoniae Strain Causing a Large Nosocomial Outbreak in The Netherlands [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(3): 1082-1084.

[15] Rodríguez J, Alcalá J, Cisneros JM, et al. Escherichia coli producing SHV-type extended-spectrum β -lactamase is a significant cause of community-acquired infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(4): 781-784.

[16] Ko KS, Lee JY, Baek JY, et al. Predominance of an ST11 extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(7): 822-828.

[17] Trent G, James S, Monica H, et al. Detection of SHV-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase in Enterobacter Isolates [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 298-299.

[18] Perilli M, Segatore B, Mugnaioli C, et al. Persistence of TEM-52/TEM-92 and SHV-12 Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Italy [J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(4): 521-524.

[19] Kacmaz B, Unaldi O, Sultan N, et al. Drug resistance profiles and clonality of sporadic Shigella sonnei isolates in Ankara, Turkey [J]. Brazilian J Microbiol, 2014, 45(3): 845-849.

[20] Rezai MS, Salehifar E, Rafiei A, et al. Characterization of Multi-drug Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli among Uropathogens of Pediatrics in North of Iran [J]. Bio Med Res Interna, 2015, 30(1): 7-9.

(收稿日期: 2015-10-28)

• 综 述 •

基层医院嗜血杆菌检测方法及其耐药性的研究应用

梁建芬¹综述, 吴开进²审校

(1. 贵港市第二人民医院检验科, 广西贵港 537132; 2. 玉林市红十字会医院检验科, 广西玉林 537000)

关键词: 嗜血杆菌; 分离鉴定; 生物型; 抗菌药物耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)07-0946-03

嗜血杆菌引起人类机会性感染致病越来越受到临床关注, 主要有流感嗜血杆菌(haemophilus influenzae, HI)和副流感嗜血杆菌(hemophilus parainfluenzae, HPI), 国内对嗜血杆菌研究也有 60 年历史。嗜血杆菌初次培养对营养要求高, 在血平板上不生长或易被革兰阳性球菌抑制, 不易培养。在基层医院由于缺乏可培养菌的分离培养条件, 如专用培养基、CO₂ 环境、

人员业务水平所限而不能辨别菌落等因素影响, 实验室往往忽略嗜血杆菌分离而导致其检出率极低, 对其致病性、分布、分型及耐药研究应用较少, 本文就此作简单的综述。

1 嗜血杆菌检测分离培养

1.1 直接涂片染色镜检 革兰染色镜检对具有特殊形态的病原微生物检查是一种快速有效的方法, 在基层实验室里仍然是