

多重耐药铜绿假单胞菌中 I 型整合子新结构的发现及其与耐药的相关性

朱玉莹¹, 易勇², 杨犀¹, 律娜¹, 李晶¹, 朱宝利^{1*}, 胡永飞^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国人民解放军第 306 医院, 北京 100101

摘要:【目的】研究临床多重耐药铜绿假单胞菌中 I 型整合子的结构特征, 探讨整合子与细菌多重耐药之间的相关性。【方法】收集临床样品中的铜绿假单胞菌, 从中挑选多重耐药菌。采用聚合酶链式反应扩增 I 型整合子可变区, 应用酶切方法和 DNA 测序技术分析整合子基因结构, 并采用 SPSS19.0 软件分析整合子与耐药表型间的相关性。【结果】多重耐药铜绿假单胞菌中 I 型整合子的检出率为 27.3%。I 型整合子基因盒排列形式共有 3 种 (1500 bp、2300 bp 和 4000 bp), 其中 2 种在其他细菌中也有发现。基因盒所编码的耐药基因有氨基糖苷类抗生素抗性基因 (*aadA*、*aadB*、*aac(6')* II 和 *aadA13*)、 β -内酰胺类抗生素抗性基因 (*blaCARB8* 和 *oxa10*) 和氯霉素外排泵基因 (*cmlA8*), 耐药表型相关性分析表明整合子与氨基糖苷类抗生素抗性密切相关。【结论】在多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株中发现了 3 种不同 I 型整合子结构, 这 3 种结构中均含有氨基糖苷类抗生素耐药基因, 其中 *aadB-aac(6')* II -*blaCARB8* 结构最为流行。

关键词: 铜绿假单胞菌, 多重耐药, 整合子, 基因盒

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 09-0927-06

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是重要的院内感染条件致病菌, 占世界范围内院内感染细菌的 10% - 15%^[1]。近年来, 由于大量广谱抗生素的广泛和不合理利用, 使得铜绿假单胞菌对各种抗生素的耐药性日趋严重, 多重耐药 (MDR)、泛耐药 (XDR) 以至全耐药 (PDR) 铜绿假单胞菌不断涌现, 给临床治疗带来严重困扰。铜绿假单胞菌主要有 4 种耐药途径: 产生抗生素灭活酶或抗生素修饰酶, 抗菌药物作用靶位点的改变, 细菌的主动外排机制以及形成生物被膜。其中, 该菌所携带的多种

抗生素灭活酶或抗生素修饰酶的基因是由细菌整合子携带^[2]。细菌整合子是抗生素抗性基因水平转移的重要组成部分, 能够通过其位点特异的整合系统不断整合并表达各种抗性基因, 是多重耐药铜绿假单胞菌不断涌现的重要原因之一^[3-4]。本研究旨在寻找多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株中 I 型整合子的新结构, 并探讨整合子与多重耐药铜绿假单胞菌耐药表型之间的相关性, 以期深入了解整合子在介导多重耐药铜绿假单胞菌耐药中的作用。

基金项目: 国家自然科学基金 (31270168)

* 通信作者。胡永飞, Tel/Fax: +86-10-64807438, E-mail: huyf@im.ac.cn; 朱宝利, Tel/Fax: +86-10-64807362, E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

作者简介: 朱玉莹 (1991 -), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事临床抗生素耐药研究。E-mail: ying.yu.zhu@163.com

收稿日期: 2013-03-12; 修回日期: 2013-04-10

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:106株铜绿假单胞菌是于2012年9月-11月间分离自中国人民解放军第306医院临床检验科的非重复临床标本,临床标本包含痰液、拭子、血液及各类导管等。所有菌株均用细菌分析仪进行菌种鉴定和抗生素敏感性分析,以CLSI M100-S21为标准进行结果判读^[5]。多重耐药铜绿假单胞菌的选择按照文献所述标准方法^[6]。

1.1.2 主要仪器和试剂:2720型PCR仪购于美国Applied Biosystems公司;Powerpac™基础型电泳仪购于美国BIO-RAD公司;AlphaImager EP通用型凝胶成像系统购于美国Alpha Innotech公司;Z216 MK型离心机购于德国HERMLE公司,HPX-9272 MBX型恒温培养箱购于上海博迅公司等。DNA聚合酶Premix LA Taq和限制性内切酶Sau 3A I购于TaKaRa公司;1k DNA Ladder购自BioLabs公司。

1.2 I型整合子可变区扩增及酶切分析

PCR方法用于扩增I型整合子可变区,参照文献设计引物^[7]。I型整合子可变区上游引物为5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3',下游引物为5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR模板用铜绿假单胞菌菌落,PCR反应体系为50 μL,PCR条件:94℃ 5 min;98℃ 1 min,55℃ 30 s,72℃ 5 min,反应30个循环;72℃ 10 min。

对整合子可变区扩增产物大小相同者进行PCR产物纯化,并用Sau 3A I进行酶切分析,以区分不同的整合子基因盒类型。酶切反应体系为Sau 3A I 0.5 μL,10 × H buffer 2 μL,PCR产物10 μL,超纯水7.5 μL,37℃孵育1 h,用1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 整合子可变区测序分析

对Sau 3A I酶切图谱相同者,挑取两株进行PCR产物测序分析。PCR产物委托北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序,片段较长者用步移法测通。测序结果用DNASTar软件包中的SeqMan软件进行拼接,测序拼接结果用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)工具在NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中进行序列比

对,确定整合子可变区所含基因盒的种类及排列顺序,并分析整合子基因盒在其他菌株中的分布情况。

1.4 统计学处理

采用SPSS19.0软件,对I型整合子阴、阳性菌株耐药率进行 χ^2 检验分析。

2 结果和分析

2.1 菌株分离及耐药性

从临床样本中分离得到106株铜绿假单胞菌单克隆菌株,根据菌株的耐药谱对其进行分类,分类参照标准方法^[6],即菌株对不少于3种抗生素类别中的至少1种抗生素不敏感定义为多重耐药(MDR),对除不多于2种之外的所有抗生素类别中的至少1种抗生素不敏感称为泛耐药(XDR),对所有抗生素类别均不敏感则为全耐药(PDR)。按上述标准,共筛选到多重耐药铜绿假单胞菌55株。这55株多重耐药铜绿假单胞菌对各类常见抗生素的耐药率均在30%以上,其中对哌拉西林-他唑巴坦和氨基糖苷的耐药率较高,均为94.5%。

2.2 整合子检出情况及基因盒结构分析

2.2.1 检出情况:55株多重耐药铜绿假单胞菌中,有14株检出I型整合子耐药基因盒,检出率为27.3%。PCR产物显示3种大小相似的带型,分别为1500 bp、2300 bp和4000 bp,各类带型的PCR产物Sau 3A I酶切图谱也相同,说明为相同的整合子基因盒类型。其中2300 bp的整合子类型最为流行,占64.3%(9/14),4000 bp和1500 bp的整合子类型分别占21.4%(3/14)和14.3%(2/14)。

2.2.2 耐药基因盒结构分析:测序分析结果表明(图1),3种类型的整合子基因盒排列形式分别为、和。其中、aadB、aac(6') II和基因为氨基糖苷类抗生素抗性基因,blaCARB8和oxa10基因为β-内酰胺类抗生素抗性基因,cmlA8基因为氯霉素外排泵基因。

2.3 整合子BLAST分析

将测序得到的整合子序列在NCBI数据库中进行BLAST分析,结果表明本研究中的整合子基因盒排列形式不仅存在于铜绿假单胞菌中,在其他细菌中也有发现(表1)。aadB-aac(6') II -blaCARB8基

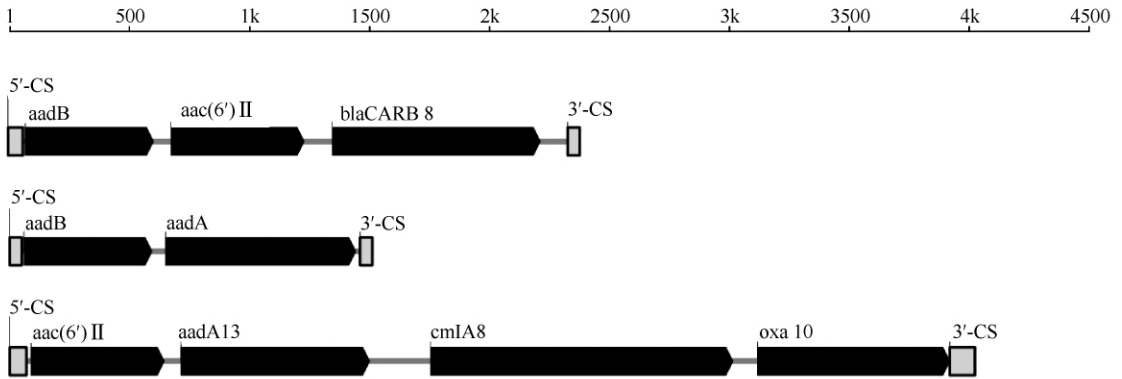


图 1. 多耐药铜绿假单胞菌中 I 型整合子结构图

Figure 1. Schematic structures of class 1 integrons in multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates.

因盒在木糖氧化无色杆菌 (*A. xylooxidans*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*S. maltophilia*)、恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 和洋葱伯克霍尔德菌 (*S. maltophilia*) 中均有发现。*aadB-aadA* 基因盒在嗜麦芽窄食单胞菌 (*S. maltophilia*) 中也有发现, 而且 *aadB-aadA* 基因盒常

作为一个整体插入到多种细菌的整合子中。*aac(6')II-aadA13-cmlA8-oxa10* 基因盒目前仅在铜绿假单胞菌中检测到, 可能是假单胞菌特有的整合子类型; 其在 *P. aeruginosa* (EU886980.1) 和 *P. aeruginosa* (EU182575.1) 中以质粒作为载体。

表 1. 不同类型整合子基因盒在各种细菌中的分布

Table 1. Distribution of the different types of gene cassette arrays among various bacteria

Gene cassette arrays	GenBank match	Accession number	Max score	Total score	E value	Query cover / %	Max ident / %
<i>aadB-aac(6')II-blaCARB8</i>	<i>P. aeruginosa</i>	DQ288251.1	4300	4472	0.0	100	99
	<i>P. aeruginosa</i>	DQ266447.1	4283	4455	0.0	100	99
	<i>A. xylooxidans</i>	JX448550.1	4300	4472	0.0	100	99
	<i>S. maltophilia</i>	GQ866976.1	4294	4461	0.0	100	99
	<i>P. putida</i>	HQ880255.1	4283	4455	0.0	100	99
	<i>B. cepacia</i>	HQ880250.1	4283	4455	0.0	100	99
<i>aadB-aadA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	HQ880250.1	2789	2961	0.0	99	100
	<i>S. maltophilia</i>	HQ914241.1	2761	2933	0.0	100	99
<i>aac(6')II-aadA13-cmlA8-oxa10</i>	<i>P. aeruginosa</i>	HM175875.1	7372	7372	0.0	100	99
	<i>P. aeruginosa</i>	EU886980.1	7372	7372	0.0	100	99
	<i>P. aeruginosa</i>	EU182575.1	7263	7263	0.0	98	99

2.4 整合子耐药相关性分析

表 2 中 χ^2 检验分析表明, 所分析的十种抗生素中, 只有庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星和头孢他啶四种抗生素的耐药性与整合子间具有极显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。其中 I 型整合子阳性菌株对头孢他啶的耐药率明显高于阴性菌株, 因此可以认为铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药性与整合子的存在与否无关。庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星均属氨基糖苷类抗生素, 即本研究中铜绿假单胞菌的氨基糖苷类抗生素抗性与整合子的存在密切相关。

基糖苷类抗生素, 即本研究中铜绿假单胞菌的氨基糖苷类抗生素抗性与整合子的存在密切相关。

3 讨论

目前, 根据整合酶基因序列的相似程度, 可将细菌整合子划分为 5 种类型^[8]。这 5 种类型的整合子均和抗生素抗性相关, 其中 I - III 型整合子广泛存

表 2. 多耐药铜绿假单胞菌 I 型整合子与耐药表型间的关系

Table 2. Association between class I integrons and the the antimicrobial resistant phenotypes

among multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates

Antibiotic	PA (n = 55)		Class I integron-negative isolates (n = 41)		Class I integron-positive isolates (n = 14)		P value
	Isolates	%	Isolates	%	Isolates	%	
CN	23	41.8	11	27.5	12	80.0	<i>P</i> < 0.01
TOB	22	40.0	10	25	12	80.0	<i>P</i> < 0.01
AK	20	36.4	7	17.5	10	66.7	<i>P</i> < 0.01
IPM	20	36.4	14	35.0	6	40.0	<i>P</i> > 0.01
CAZ	38	69.1	33	80.5	5	35.7	<i>P</i> < 0.01
FEP	45	81.8	36	87.8	9	64.3	<i>P</i> > 0.01
CIP	32	58.2	21	51.2	11	78.6	<i>P</i> > 0.01
LEV	33	60.0	21	51.2	12	86.7	<i>P</i> > 0.01
TZP	52	94.5	39	95.1	13	92.8	<i>P</i> > 0.01
ATM	52	94.5	39	95.1	13	92.8	<i>P</i> > 0.01

CN, gentamicin; TOB, tobramycin; AK, amikacin; IPM, imipenem; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; LEV, lavo-ofloxacin; TZP, piperacillin-tazobactam; ATM, aztreonam.

在于各种多重耐药细菌中,而Ⅳ、Ⅴ型整合子仅发现于弧菌属中^[9]。Ⅰ型整合子是临床上最重要的整合子类型,在22%–59%的革兰氏阴性临床分离株中均能检测到Ⅰ型整合酶基因 *intI1*,Ⅱ型整合子通常在整合酶基因 *intI2* 的179位密码子处包含一个无义突变而限制了其整合耐药基因的功能,Ⅲ型整合子的检出率比Ⅱ型整合子更低^[8]。因此监测Ⅰ型整合子的流行情况对于理解铜绿假单胞菌的多重耐药性具有重要意义。国内相关研究表明,不同地区铜绿假单胞菌中Ⅰ型整合子的检出情况不同,Ⅰ型整合子的检出率为22%–77%^[10–16]。本研究对北京地区多重耐药铜绿假单胞菌中的Ⅰ型整合子分析表明,Ⅰ型整合子检出率为27.3%。整合子的不同检出率可能与不同地区铜绿假单胞菌所面临的抗生素选择压力不同有关^[17]。

基因盒是一个独立的可移动元件,通常包含一个无启动子的开放阅读框和一个能够被整合酶识别的重组位点—*attC*^[18]。基因盒在游离状态时以环状形式存在,在整合酶的作用下 *attC* 位点和 *attI* 位点间发生同源重组,从而整合到整合子中^[4]。基因盒的来源尚不明确。基因盒中不含有启动子和非编码序列的特点表明,基因盒可能由 mRNA 反转录形成^[19]。数据分析表明,基因盒有高度的遗传和功能多样性,约有80%的基因盒含有编码未知功能蛋白的开放阅读框,可能在细菌的进化过程中起重要作用^[4]。基因盒的这种多样性可能为细菌适应不同的环境提供了一定的遗传基础。Elsaied 等人在深海热泉环境中发现了与共生代谢相关的基因盒^[20],

霍乱弧菌中存在毒力相关的基因盒^[4]。而在临床相关的环境中,细菌所含的基因盒多为耐药相关的基因盒。本研究从铜绿假单胞菌临床分离株中检测整合子,并分析其基因盒构成,结果表明整合子中所含的基因盒均为耐药相关的基因盒。

目前,有超过百种不同的基因盒携带各种抗生素抗性基因,其中包含针对β-内酰胺类、氨基糖苷类、甲氧苄氨嘧啶、氯霉素类等抗生素的抗性基因^[9]。在多重耐药铜绿假单胞菌中,整合子所携带的抗性基因多为β-内酰胺酶基因和氨基糖苷修饰酶(AMEs)基因^[1, 21]。与整合子密切相关的β-内酰胺酶基因包含A类、B类和D类^[1],本研究中的 *blaCARB8* 基因编码A类β-内酰胺酶, *oxa10* 编码D类β-内酰胺酶。铜绿假单胞菌中存在各种氨基糖苷类抗生素抗性机制,包括不渗透性、多药外排系统以及对氨基糖苷中氨基和羟基的酶修饰作用,AMEs的产生为其中的一种机制,并且多存在于整合子中^[21],本研究中的 *aadA*、*aadB*、*aac(6')* II 和 *aadA13* 基因便是 AMEs 类基因。徐宏涛等2005年对北京医院铜绿假单胞菌中整合子的流行情况调查也表明,铜绿假单胞菌中整合子主要携带β-内酰胺酶基因和氨基糖苷类抗性基因^[16],而不同的是本研究中整合子所包含的基因盒数量更多,说明整合子在多重耐药铜绿假单胞菌耐药中所起的作用日益显著。

由于整合子中的基因盒均不携带启动子结构,因此需要依赖整合子本身所携带的启动子(P_c)启动转录过程^[4]。 P_c 位于基因盒上游的 *attI* 位点附近,距离 P_c 较近的基因获得表达的几率更大^[9]。本

研究中检测到的整合子中含有氨基糖苷类抗生素抗性基因、 β -内酰胺类抗生素抗性基因和氯霉素外排泵基因,而统计学分析表明只有氨基糖苷类抗生素的抗性表型与整合子间具有极显著的统计学意义。这可能是因为氨基糖苷类抗生素抗性基因距离 P_c 较近,表达水平较高,而 β -内酰胺类抗生素抗性基因和氯霉素外排泵基因处于基因盒末端,距离启动子较远,从而表达水平较弱。

I 型整合子通常与各种质粒和转座子相关联,质粒如各种接合性质粒,转座子有 Tn3 家族的 Tn21 和 Tn1696 等。而这种关联的直接原因是 I 型整合子首先嵌入到 Tn402 起源的转座子中,Tn402 起源的转座子能够识别并插入到质粒和其他转座子中的 *res* 位点^[4, 22]。I 型整合子的这种遗传环境使其能够在各种细菌中传播,从而成为全球耐药性问题的第一大诱因。本研究中检测到的整合子基因盒类型在其他病原菌中也有发现(相似度 $\geq 99\%$),可能是整合子水平转移的结果。为探明本研究中 I 型整合子所处的遗传环境,我们正在进行含有整合子的多重耐药铜绿假单胞菌的全基因组测序工作,以期更加全面了解多重耐药铜绿假单胞菌整合子相关耐药基因的获得及水平转移机制。

参考文献

[1] Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58 (Pt 9): 1133-1148.

[2] 武渊. 部分铜绿假单胞菌临床分离株中整合子的分布、耐药性分析及其分子生物学特征. 南京医科大学硕士学位论文, 2008.

[3] Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 2002, 252 (2): 91-106.

[4] Gogarten MB, Gogarten JP, Olendzenski LC. Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 103-125.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21st informational supplement M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

[6] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international

expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18 (3): 268-281.

- [7] Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39 (1): 185-191.
- [8] Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annual Review of Genetics*, 2010, 44: 141-166.
- [9] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4 (8): 608-620.
- [10] Yang W, Shi L, Yin X, Li X, Xie Y, Cheng X, Zeng W, Yin C, Jia W. Distribution and identification of class I integrons and integrated gene cassettes in clinical Pseudomonas aeruginosa in different geographic regions. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, (1): 15-18. (in Chinese)
杨维青, 石磊, 尹晓琳, 李心晖, 谢轶, 程曦, 曾蔚, 殷长甫, 贾文祥. 不同地区铜绿假单胞菌第一类整合子和整合子相关基因盒的分布. 中国抗生素杂志, 2006, (1): 15-18.
- [11] Xu Z, Li L, Shirtliff ME, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in southern China. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47 (1): 230-234.
- [12] Yan H, Li L, Zong M, Alam MJ, Shinoda S, Shi L. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacterial isolates from patients in south China. *Journal of Health Science*, 2010, 56 (4): 442-450.
- [13] Xu H, Su Z, Wang S, Dai X, Chen J, Kong F, Li Y, Peng S, Shao Q, Lu L, Ezaki T. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China. *Current Microbiology*, 2009, 59 (2): 113-117.
- [14] Zhao Z, Chen H, Wei S, Zhao Z, Ye H. Research on the part of resistant genes and resistance to antibiotics of multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2011, 7: 1159-1162. (in Chinese)
赵祝香, 陈惠玲, 魏树全, 赵子文, 叶惠芬. 多药耐药铜绿假单胞菌耐药性及相关耐药基因分析. 中国实验诊断学, 2011, 7: 1159-1162.
- [15] Guo Y, Wang H, Zhang Z. Integrons and multi-drug resistance among Pseudomonas aeruginosa strains isolated from blood samples. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2010, 1: 6-8. (in Chinese)
郭宇, 王欢, 张正. 铜绿假单胞菌整合子与其多药耐药的相关性分析. 中华医院感染学杂志, 2010, 1: 6-8.
- [16] Xu H, Zhang X. Study on the resistance mechanism of nosocomial isolates of multi-resistant Pseudomonas

aeruginosa. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2005, 3: 141-145. (in Chinese)

许宏涛, 张秀珍. 医院感染铜绿假单胞菌多重耐药机制的研究. *中国抗感染化疗杂志*, 2005, 3: 141-145.

- [17] Diaz-Mejia JJ, Amabile-Cuevas CF, Rosas I, Souza V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiology-Sgm*, 2008, 154: 94-102.
- [18] Jove T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy M-C. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genetics*, 2010, 6 (1): e1000793.
- [19] Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene

cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology*, 1997, 5 (10): 389-394.

- [20] Elsaied H, Stokes HW, Nakamura T, Kitamura K, Fuse H, Maruyama A. Novel and diverse integron integrase genes and integron-like gene cassettes are prevalent in deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (9): 2298-2312.
- [21] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43: S49-S56.
- [22] Betteridge T, Partridge SR, Iredell JR, Stokes HW. Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55 (8): 3939-3943.

Discovery of new structure of class 1 integron in MDR *Pseudomonas aeruginosa* and its association with drug-resistance

Yuying Zhu¹, Yong Yi², Xi Yang¹, Na Lv¹, Jing Li¹, Baoli Zhu^{1*}, Yongfei Hu^{1*}

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²The 306th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To investigate the characteristics of class I integrons among clinical multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates, and to analyze the association between class I integrons and multidrug resistance.

[Methods] *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from clinical samples, and the multidrug-resistant ones were picked out from these isolates. PCR assays were used to detect the variable regions of class I integrons, and the resulting products were then digested with restriction enzyme *Sau* 3A I and sequenced. SPSS19.0 software was used for statistical analysis.

[Results] Class I integrons were detected in 27.3% of the clinical multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Amplification of variable regions of class I integrons revealed three different gene cassette arrays (1500, 2300 and 4000 bp), two of them were also found in other bacteria. These gene cassette arrays encoded aminoglycoside-modifying enzymes (*aadA*, *aadB*, *aac*(6') II and *aadA13*), β -lactamases (*bla*CARB8 and *oxa10*) and chloramphenicol efflux pump (*cmlA8*).

Analysis results suggested closely relationship between class I integrons and aminoglycoside resistance. [Conclusion] We revealed three different gene cassette arrays in the clinical isolates of the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and gene cassette array *aadB*-*aac*(6') II -*bla*CARB8 was the most prevalent.

The three gene cassette arrays all contained the aminoglycoside-resistant genes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistance, integron, gene cassette

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270168)

* Corresponding authors. Yongfei Hu, Tel/Fax: +86-10-64807438, E-mail: huyf@im.ac.cn; Baoli Zhu, Tel/Fax: +86-10-64807362, E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

Received: 12 March 2013/Revised: 10 April 2013