

## 铜绿假单胞菌金属酶及整合酶的检测\*

多丽波<sup>1</sup>, 李桂玲<sup>1</sup>, 陈淑娟<sup>1</sup>, 栾英<sup>1</sup>, 王兴力<sup>2</sup> (1. 哈尔滨医科大学附属第二医院检验科, 哈尔滨 150086; 2. 黑河市第一人民医院检验科, 黑龙江黑河 164000)

**摘要:**目的 了解哈尔滨医科大学附属第二医院铜绿假单胞菌(Pa)株中金属 $\beta$ -内酰胺酶及整合酶携带情况。方法 采用改良 Hodge 法、双纸片协同法、组合纸片法进行金属酶表型检测, PCR 法检测金属酶基因型以及整合酶 I、整合酶 II 和整合酶 III。将 IMP 金属酶全基因 PCR 产物进行纯化, 测序再进行 Blast 比对分析。结果 62 株 Pa 经金属 $\beta$ -内酰胺酶改良 Hodge 法检出 3 株、双纸片协同法检出 4 株、组合纸片法检出 4 株, PCR 法检测出 4 株(6.45%, 4/62)金属酶阳性菌株, 经全基因测序结果为 IMP-1 型, 且全部为亚胺培南耐药菌株 10%(4/40); 未检测出 VIM, SPM 和 GIM 型金属酶; PCR 检测整合酶 I 在亚胺培南耐药菌株中阳性率为 40%(16/40), 在亚胺培南敏感菌株中检出率为 22.73%(5/22); 所有菌株均未检出整合酶 II、III。结论 哈尔滨医科大学附属第二医院存在 IMP-1 型金属酶阳性的 Pa, 这些菌株多为多重耐药细菌, 且携带 I 类整合子, 该院应做好防范工作, 防止金属酶和整合子的传播。

**关键词:**铜绿假单胞菌; 金属酶; 整合酶

中图分类号: R378.991; Q781 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)01-034-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.010

## Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamases and Integrases in from *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates

DUO Li-bo<sup>1</sup>, LI Gui-ling<sup>1</sup>, CHEN Shu-Juan<sup>1</sup>, LUAN Ying<sup>1</sup>, WANG Xing-li<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Heihe City, Heilongjiang Heihe 164000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the situation of *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying metallo- $\beta$ -lactamases and integrases in the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University. **Methods** The phenotype of metallo- $\beta$ -lactamases were detected by modified Hodge test, double-disc synergy and combination paper method, respectively. PCR method was used to detect metallo- $\beta$ -lactamases genotypes and the integration I, II and III. The PCR products of the whole length bla-IMP gene were purified, sequenced and analyzed by Blast. **Results** Among 62 *Pseudomonas aeruginosa* strains, metallo- $\beta$ -lactamases phenotype of 3 by modified hodge test, 4 by double-disc synergy test, 4 by combination paper method and were all positive 4 of IMP-1 type metallo- $\beta$ -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* strains (10%, 4/40) were positives by PCR. Integrase I of 16(40%, 16/40) strains were positives by PCR method in IMP-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and integrase I of 22.73%(5/22) were positives in IMP-sensitive *Pseudomonas aeruginosa*. No other metallo- $\beta$ -lactamases, integrase II and III were detected in this study. **Conclusion** IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase existed in IMP-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University. Most strains carried integrase I, and other resistance mechanisms may be associated with multi-drug resistance, so it is important to prevent the *Pseudomonas aeruginosa* strains which carried metallo- $\beta$ -lactamases and integrons widely spread in the hospital.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; metallo- $\beta$ -lactamase; integrase

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)为常见院内感染的条件致病菌, 易引起慢性呼吸道感染, 该菌存在多重耐药性使部分患者的感染反复迁延。铜绿假单胞菌的耐药机制较复杂, 几乎所有细菌耐药机制都能在铜绿假单胞菌上发现, 其中产生金属 $\beta$ -内酰胺酶(Metallo- $\beta$ -lactamases, MBL)的是其对碳青霉烯类抗生素耐药的主要机制之一, 现对我院 2011 年 3 月~2012 年 5 月间分离的铜

绿假单胞菌进行金属酶及整合酶检测, 为防止院内感染、耐药基因传播及临床合理用药提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株和分离鉴定: 收集我院 2011 年 3 月~2012 年 5 月连续、不重复的临床送检的痰液、尿液、伤口分泌物、全血等标本分离的铜绿假单胞

\* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531830)。

作者简介: 多丽波(1966-), 女, 博士, 硕导, 主任医师, 研究方向: 细菌耐药性研究及耐药机制研究, Tel: 13654678383, E-mail: duolibob@163.com。

菌。标本按《全国临床检验操作规程》第三版要求进行分离,菌株采用法国梅里埃 20NE 生化鉴定系统和 Walkaway96 SI 全自动微生物鉴定系统鉴定。

1.1.2 金属酶阳性对照菌株:鲍曼不动杆菌 AB8017(VIM 阳性,整合酶 I 阳性)和鲍曼不动杆菌 AB8020(IMP, VIM 阳性)作为金属酶阳性对照菌株,为本实验室保存菌株。

## 1.2 方法

### 1.2.1 金属酶表型检测方法

1.2.1.1 改良 Hodge 实验:参照 2010 年 CLSI<sup>[1]</sup>和 Franco 等<sup>[2]</sup>的实验方法进行,将 0.5 麦氏 *E. coli* ATCC25922 稀释 10 倍,涂布 MH,待干后在平板中间贴上亚胺培南(IMP, 10  $\mu$ g/片)或美罗培南(MEM, 10  $\mu$ g/片)药敏纸片,从药敏纸片边缘到平板边缘划上铜绿假单胞菌实验菌株。如果 IMP 或 MEM 药敏纸片抑菌圈区域细菌有矢状生长说明改良 Hodge 实验阳性,即碳青霉烯酶阳性<sup>[3]</sup>。

1.2.1.2 双纸片协同法:根据 Lee 等<sup>[4]</sup>的实验,将

待测菌配制成 0.5 麦氏浓度,均匀涂布于 MH 琼脂,平板中央贴一空白纸片,并滴加 10  $\mu$ l 的 0.1 mol/L EDTA 液,距空白纸片两侧 1.5 cm 和 2.5 cm 处分别贴亚胺培南 IPM(10  $\mu$ g/片)和头孢他啶 CAZ(30  $\mu$ g/片)药敏纸片,37℃ 培养过夜,如果靠近 EDTA 侧的 CAZ 和/或 IPM 纸片产生的抑菌圈有扩大的待测菌(出现协同现象),为碳青霉烯酶(金属酶)阳性。

1.2.1.3 组合纸片法:根据 Qu 等<sup>[5]</sup>实验,将待测菌配制成 0.5 麦氏浓度,均匀涂布于 MH 平板,在 MH 板中间贴两张 IMP(10  $\mu$ g/片)药敏纸片,相距 >4 cm,在其中一张 IMP 纸片上滴加 4  $\mu$ l 0.1 mmol/L 的 EDTA 液,37℃ 培养过夜,IMP+EDTA 组合纸片比单独 IMP 纸片抑菌圈扩大  $\geq$  6 mm,为产碳青霉烯酶(金属酶)菌株。

### 1.2.2 金属酶基因型 PCR 初筛检测

1.2.2.1 金属酶引物设计:通过 Genbank 号寻找各型金属酶基因,应用 Primer5.0 分别设计金属酶初筛引物和全基因引物(P1~P5),引物见表 1。

1.2.2.2 金属酶模板制备:用欧米伽试剂盒提取

表 1 各型金属酶及整合酶引物

基因型	引物 5'→3'	长度(bp)	Genbank 号	位置
IMP 短(P1)	F:GTTTATGTTTCATACTTCGTT R:CCAAACCACTACGTTATCT	396	AB104852	1140-1535
VIM 短(P2)	F:CAGTCTCCACGCACTTTCA R:GCACAACCACCGTATAGCAC	268	Y18050	3553-3820
SPM(P3)	F:CCTACAATCTAACGGCGACC R:TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	649	AJ492820	514-1162
GIM(P4)	F:AGAACCTTGACCGAACGCAG R:ACTCATGACTCCTCACGAGG	748	AJ620678	837-1584
IMP 长(P5)	F:GTCGCCTAAACAAAGT R:GAAGCAAACCACAAAAGC	848	AB104852	1008-1855
Int I (P6)	F:GCATCCTCGGTTTCTGG R:GGTGTGGCGGGCTTCGTG	457	EF138817	4054-4510
Int II (P7)	F:CACGGATATGCGGCAAAAAGG R:GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	789	DQ533991	276-1064
Int III (P8)	F:ATCTGCCAAACCTGACTG R:CGAATGCCCAACAACCTC	922	AF416297	792-1713

铜绿假单胞菌基因组的 DNA,进行金属酶检测。

1.2.2.3 金属酶初筛 PCR 反应:用 P1-P4 引物初筛金属酶的反应条件:94℃ 5 min 预变性;94℃ 30s 变性;58℃ 45s 退火;72℃ 30s 延伸,循环 30 次;72℃ 7 min 终延伸。反应体系:TaQ Mix 复合酶 25  $\mu$ l,正向引物(F)2  $\mu$ l,反向引物(R)2  $\mu$ l,模板 DNA 1  $\mu$ l,去离子水 20  $\mu$ l,PCR 产物用 2 mg/L 琼脂糖进行电泳,条件为 120 V,50 mA,20 min。用 ChampGel15500 全自动凝胶成像分析仪记录成像,将初筛金属酶阳性菌株筛出做下一步检测。

1.2.3 IMP 型金属酶全基因检测:对金属酶 PCR 初筛出现 400bp 左右的片段可疑为 IMP 阳性的菌株进行全基因检测,采用表 1 中的引物 P5 进行 PCR 扩增,反应条件和反应体系同上,预计片段 848 bp。

1.2.4 测序:IMP 金属酶全基因 PCR 产物用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,送至上海生工用 ABI3730 进行双脱氧测序。测序后全基因碱基结果在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上进行 Blast 比对。

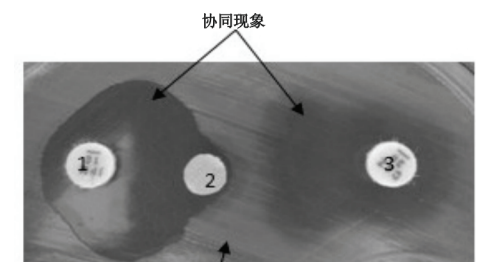
### 1.2.5 整合酶基因检测

1.2.5.1 整合酶模板制备:煮沸法提取模板DNA。

1.2.5.2 整合酶 PCR 反应:参照参考文献[6]设计引物,见表1(P6~P8)。整合酶 I, II, III PCR 反应条件:94℃ 5 min 预变性;94℃ 30 s 变性,50℃ 45 s 退火,72℃ 30 s 延伸,循环35次;72℃ 10 min 终延伸。反应体系:Taq Mix 复合酶 25  $\mu$ l,正向引物(F)2  $\mu$ l,反向引物(R)2  $\mu$ l,模板DNA 1  $\mu$ l,去离子水 20  $\mu$ l。PCR 产物在 2 mg/L 琼脂糖上进行电泳,电泳结果用 ChampGel15500 全自动凝胶成像分析仪记录成像。

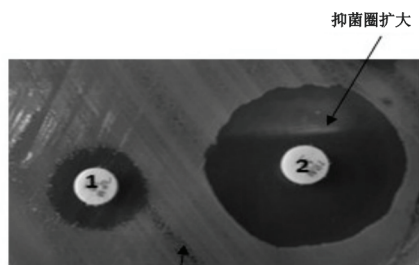
## 2 结果

2.1 金属酶表型检测结果 金属酶表型检测,改良 Hodge 实验 3 株阳性;双纸片协同实验 EDTA 与 IMP 协同 4 株阳性、EDTA 与 CAZ 协同仅 1 株阳性;组合纸片法 4 株阳性,见图1,2。上述阳性菌株都为 IMPR-Pa,IMPS-Pa 中未检测到金属酶表型阳性菌株,见表2。



注:1:IMP;2:EDTA;3:CAZ;1与2,3与2均产生协同现象

图1 双纸片协同法检测 Pa 的 MBL



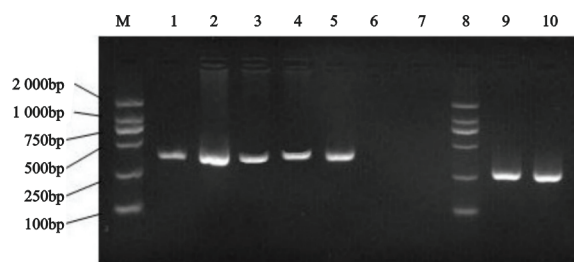
注:1:IMP;2:IMP+EDTA;EDTA+IMP 抑菌圈直径比 IMP>6 mm

图2 组合纸片法检测 Pa 的 MBL

表2 金属酶表型检测结果

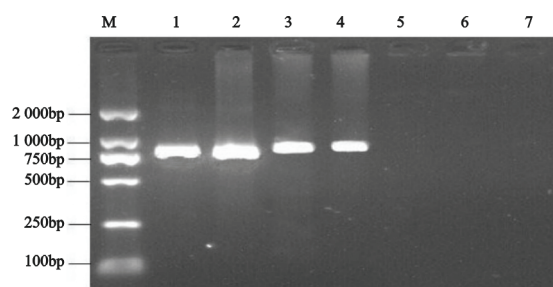
菌株	改良 Hodge 法	双纸片协同实验法		组合 纸片法
		EDTA 与 IMP	EDTA 与 CAZ	
PAR12	+	+	—	+
PAR16	+	+	—	+
PAR32	+	+	+	+
PAR36	—	+	—	+
阳性数	3	4	1	4

2.2 金属酶 PCR 检测结果 用表1中P1~P4引物对实验菌株进行各种金属酶 PCR 初筛,在 IMP 耐药的铜绿假单胞菌中有 4 株检测到约 400 bp 条带,与预计的 IMP 型金属酶(396 bp)相符,未检测出 VIM,SPM 和 GIM 型金属酶,见图3;在 IMP 敏感的铜绿假单胞菌中未检测出任何金属酶。用表1中 P5 引物对初筛 IMP 型金属酶阳性的实验菌株,进行 IMP 型金属酶全长基因 PCR 检测,检测到 848 bp 目的片段,与预计结果相符,见图4。



注:M,8:2 000 bp Maker;1~4:IMP 阳性实验菌株;5:IMP 阳性对照(396 bp AB8020);6:金属酶阴性对照(ATCC27853);7:空白对照;9,10:VIM 阳性对照(268 bp AB8017,AB8020)。

图3 金属酶初筛 PCR 电泳图



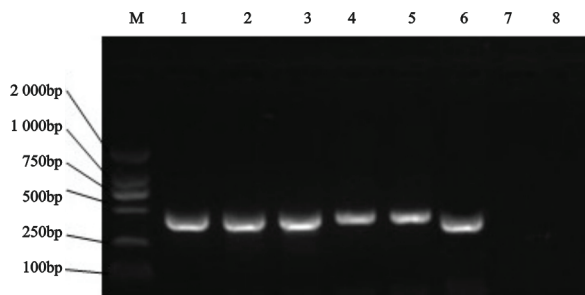
注:M:2 000 bpMaker;1~4:IMP 阳性实验菌株;5:IMP 阳性对照(848 bp AB8020);6:IMP 阴性对照(ATCC27853);7:空白对照(去离子水)。

图4 IMP 型金属酶全长基因 PCR 电泳图

2.3 IMP 型金属酶测序结果 将 4 株 IMP 金属酶全基因 PCR 阳性的实验菌株(PAR12,PAR16,PAR32,PAR36)纯化后进行测序,测序结果在 Blast 上与 AB104582.1 比对,结果与 IMP-1 型金属酶碱基同源性 99%,1229 位 C 变 T,1230 位 C 变 T,1313 位 C 变 T,1354 位 A→G,1536 位 T→C,1742 位 G→A,只有 1354 位碱基改变引起氨基酸改变使谷氨酸 E 变为甘氨酸 G。

2.4 整合酶 PCR 检测结果 用引物 P6~P8 对实验菌株分别进行整合酶 I, II, III 的 PCR 检测,共有 21 株实验菌株检测出 457 bp 长度的 PCR 产物,与整合酶 I 目的基因片段相符,见图5。其中 16 株为 IMP 耐药的铜绿假单胞菌,5 株为 IMP 敏感的铜绿假单胞菌,未检出 II, III 型整合酶。见表

3。



注:M:2 000 bpMaker,1~5:整合酶 I 阳性实验菌株;6:整合酶 I 阳性对照(AB8017 457 bp);7:阴性对照(ATCC27853);8:空白对照(去离子水)。

图5 整合酶 I 的 PCR 电泳图

表3 各型金属酶和整合酶检出率(%)

各型金属酶、整合酶	全部标本	IMPR	IMPS
金属酶初筛			
IMP	6.45	10.00	0
VIM	0	0	0
SPM	0	0	0
GIM	0	0	0
IMP型金属酶全基因	6.45	10.00	0
整合酶 I	33.90	40	22.73
整合酶 II	0	0	0
整合酶 III	0	0	0

3 讨论 铜绿假单胞菌的耐药机制较复杂,几乎所有细菌耐药机制都能在铜绿假单胞菌上发现,如金属 $\beta$ -内酰胺酶(metallo- $\beta$ -lactamases, MBL)的产生、外膜蛋白 OprD2 缺失、青霉素结合蛋白 PBP<sub>s</sub> 的结构和功能改变、外膜上存在特异的药物主动外排系统、细菌生物被膜形成等。金属酶介导的耐药主要有以下几点特性:①属于 Ambler 结构分类属 B 类, Bush 功能分类 III 组;②能水解碳青霉烯类抗生素;③对单环类药物敏感;④对螯合物敏感;⑤对锌离子有依赖性。其中,IMP 和 VIM 家族是两类最主要的获得性金属酶,其次还有 GIM 和 SPM 等家族。由于金属酶基因位于整合子上,整合子能被插入质粒中,可以通过各种方式在其他细菌体内得到表达,极易造成广泛传播。因此,由于细菌产金属酶引起的亚胺培南耐药已成为临床抗感染的严峻课题。

目前为止,国内外尚无金属酶检测的统一和标准的实验室方法。本研究主要采用表型试验和分子生物学方法检测我院铜绿假单胞菌中金属酶的流行情况。

MBL 能被重金属盐、EDTA 和硫醇类化合物(如 2-巯基丙酸、巯基乙酸、巯基乙醇)抑制,前两者

是通过与锌离子络合使金属酶失活,而后者是通过巯基与活性位点的半胱氨酸形成二硫键,产生不可逆的抑制作用。利用 MBL 的这些特点用于产 MBL 的菌株筛选、MBL 表型实验检测等。本研究采用三种表型方法检测金属酶:改良 Hodge 法、双纸片协同法和组合纸片,其中改良 Hodge 法是 CLSI 指南中推荐肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的检测方法,在用于检测 MBL 时,还应与双纸片协同法或组合纸片法相结合,才可检出金属酶。但改良 Hodge 法可以发现金属酶外的其他碳青霉烯酶。双纸片协同法是实验室常用的金属酶表型检测方法,从本次实验结果分析,对于检测铜绿假单胞菌中存在 MBL 时,IMP 和 EDTA 的区域易出现协同现象,而 CAZ 与 EDTA 处不易出现协同现象,此法易存在人为判断误差。相对而言组合纸片法判断简单,用 IMP 药敏纸片与加 EDTA 的 IMP 药敏纸片产生抑菌圈直径大小进行判读,比较适于检测金属酶,研究表明,在中国检测铜绿假单胞菌产金属酶最好的方法是 IMP+EDTA 组合纸片法,IMP+EDTA(750  $\mu$ g)组合纸片比单独 IMP 的抑菌圈 $\geq 6$  mm<sup>[8]</sup>,判断为金属酶阳性,该法操作简单,易于判断,是实验室常用的表型检测方法。采用上述方法本实验分别检出 3,4,4 株金属酶阳性的铜绿假单胞菌。

金属酶 PCR 检测法是分子生物学检测方法之一,相对于表型检测方法,此方法更加准确,是检测金属酶的金标法。本研究中实验菌株经 PCR 检测检出 4 株金属酶阳性菌株,占 IMPR-Pa 的 10%(4/40),占全部实验菌株的 6.25%(4/62),经测序后比对为 IMP-1 型金属酶,未检出 VIM,SPM 和 GIM 型金属酶,因此,我院铜绿假单胞菌中只有 IMP-1 型金属酶存在。在国内,广州第一人民医院对 29 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌进行金属酶检测阳性率为 3.4%<sup>[7]</sup>;解放军第 155 中心医院对耐碳青霉烯酶 54 株铜绿假单胞菌进行金属酶检测阳性率为 24.1%<sup>[8]</sup>。广州医学院第一附属医院和中山大学第二附属医院研究 67 株耐亚胺培南的菌株铜绿假单胞菌中金属酶阳性率为 35.8%<sup>[9]</sup>,说明产 IMP 型金属酶是我国铜绿假单胞菌的主要流行耐药基因型。我院 4 株金属酶阳性的耐 IMP 的铜绿假单胞菌中分布科室为呼吸内科 1 株,ICU 科 1 株,神经外科 2 株,MBL 已经在几个科室内存在,提示及早发现金属酶将有助于防控其院内感染和传播。

耐药基因可借助于整合子和质粒等细菌间进行传播,整合子根据整合酶(整合子的基本结构)的不同分为 I, II, III 和 IV 类,而耐药基因盒主要存在

于Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ类整合子中。我院实验菌株中Ⅰ类整合子的检出率为33.87%(21/62),未检测到Ⅱ和Ⅲ类整合子,整合酶Ⅰ在IMPR-Pa中阳性率为40%(4/40),在IMPS-Pa中阳性率为22.73%(5/22)。整合子已在我国普遍流行,多为Ⅰ类整合子,例如福建省立医院铜绿假单胞菌中整合酶Ⅰ检出率为20.6%,未发现Ⅱ,Ⅲ类整合子<sup>[10]</sup>;北京大学人民医院对420株铜绿假单胞菌检测,有116株(27.6%)存在整合子Ⅰ,也未检出整合子Ⅱ和整合子Ⅲ<sup>[11]</sup>;昆明第一附属医院研究铜绿假单胞菌中Ⅰ类整合子基因阳性率为69.4%<sup>[12]</sup>。

本次研究我院亚胺培南耐药铜绿假单胞菌金属酶检出率仅10%,不是我院铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因,前期研究中数据表明我院IMPR-Pa的外膜蛋白D2缺失和降低的检出率为66.67%<sup>[13]</sup>,说明我院铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素存在多种耐药机制中,外膜蛋白D2缺失和改变为主要耐药机制,其次为整合子,金属酶并不是我院菌株耐药性产生主要原因。下一步我们将对耐药机制中的外膜蛋白外排泵系统、细菌生物被膜形成等进行院内感染研究。

综上所述,我院应积极做好MBL的预防工作并应严格执行隔离制度,做好危重患者管理及医疗器械灭菌工作,预防其暴发和流行。金属酶和整合子的研究可以为新药研究和临床合理用药提供理论基础,为IMPR-Pa菌株感染提供新的治疗方案。

#### 参考文献:

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twentieth Informational Supplement[S]. Wayne: PA, CLSIM100-S20, 2010.
- [2] Gome Franco MR, Caicaffa-Fiho HH, Burtini MN, et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university hospital[J]. Clinics, 2010, 65(9): 825-829.
- [3] Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species[J]. Clin Microbiol Infect, 2001, 7(2): 88-91.
- [4] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp* [J]. Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4623-4629.
- [5] Qu TT, Zhang JL, Wang J, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1136-1142.
- [6] Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5407-5413.
- [7] 汤凤珍, 陈惠玲, 张伟红. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌相关耐药基因及Ⅰ类整合子的研究[J]. 现代医院, 2010, 10(3): 26-28.  
Tang FZ, Chen HL, Zhang WH, et al. Research on drug-resistant genes and the class I integron of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Modern Hospital, 2010, 10(3): 26-28.
- [8] 崔巍, 陈雷. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌产金属β-内酰胺酶的检测及耐药性分析[J]. 中华感染学杂志, 2011, 21(3): 560-562.  
Cui W, Chen L. Detection of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-β-lactamase and antibiotics resistance[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2011, 21(3): 560-562.
- [9] 吴爱武, 李红玉. 院内感染铜绿假单胞菌金属酶的检测及分析[J]. 广州医学院学报, 2005, 33(3): 14-16.  
Wu AW, Li HY. Metallo-β-lactamase detection and antimicrobial resistance analysis of *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infection[J]. Academic Journal of Guangzhou Medical College, 2005, 33(3): 14-16.
- [10] 吴长生, 伍严安, 余菲菲, 等. 铜绿假单胞菌整合子及其基因盒与耐药性的相关性研究[J]. 福建医科大学学报, 2011, 45(5): 355-359.  
Wu CS, Wu YA, Yu FF, et al. Study on relationship between *Pseudomonas aeruginosa* integrons and antibiotic-resistance[J]. J Fujian Med Univ, 2011, 45(5): 355-359.
- [11] 郭宇, 孙媛媛, 张正. 铜绿假单胞菌整合子基因盒的相关研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(1): 27-30.  
Gao Y, Sun YY, Zhang Z. Study on the integrons and integrated gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Infect Chemother, 2011, 11(1): 27-30.
- [12] 杜艳, 单斌, 陈瑞春, 等. 亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌与Ⅰ类、Ⅲ类整合子的相关研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 75-77.  
Du Y, Shan B, Chen RC, et al. Relative research between imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and class I and II integrons[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(4): 75-77.
- [13] 多丽波, 张联博, 栾英, 等. 哈尔滨地区铜绿假单胞菌外膜蛋白D2与亚胺培南耐药关系研究[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(2): 147-148.  
Duo LB, Zhang LB, Luan Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in Harbin outer membrane protein D2 and imide south study on the relationship between the resistance[J]. Chin J Clin Lab Sci, 2010, 28(2): 147-148.

收稿日期: 2014-04-05

修回日期: 2014-04-23