

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA ×××××—××××

# 动物源奇异变形杆菌新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla*<sub>NDM</sub> PCR 检测技术规程

New Delhi Metallo-beta-lactamase genes *bla*<sub>NDM</sub> PCR detection technology protocol of animal origin

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

×××× - ×× - ××发布

×××× - ×× - ××实施

中国兽医协会 发布

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学

本文件主要起草人：郝智慧、刘志海、赵莉、王莘莘、朱晓林、刘旭东、任海燕、郝红侠、SIDDHARTHA THAKUR



# 动物源奇异变形杆菌新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla*<sub>NDM</sub>

## PCR 检测技术规程

### 1 范围

本文件规定了动物源奇异变形杆菌新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla*<sub>NDM</sub> PCR 检测技术的术语和定义、检测原理、检测条件、检测方法和结果判定等。

本文件适用于动物源奇异变形杆菌新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla*<sub>NDM</sub> 的检测。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

### 3 术语和定义、缩略语

#### 3.1 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

##### 3.1.1 新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶（NDM）

新德里金属- $\beta$ -内酰胺酶（NDM）是一种金属- $\beta$ -内酰胺酶（MBL），能水解大多数 $\beta$ -内酰胺类抗生素（包括碳青霉烯类），但不包括单环内酰胺类（例如氨曲南）。碳青霉烯类抗生素是治疗由大部分革兰氏阴性菌引起的严重感染的主要抗菌药物，临床上可用的 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂（包括阿维巴坦、克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦）不能抑制 NDM 水解活性。NDM-1 在 2008 年首次从一名在印度新德里住院的瑞典患者身上分离出的肺炎克雷伯菌中被发现。目前已在肠杆菌科、不动杆菌和假单胞菌等多个物种中发现了 NDM-1，并已鉴定出 31 种 NDM 变体。

##### 3.1.2 聚合酶链式反应（PCR）

聚合酶链式反应（PCR）是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术，可看作是生物体外的特殊 DNA 复制，其最大特点是能将微量 DNA 大幅增加。PCR 技术能够检测和鉴别同菌种不同基因型的菌株，跟踪耐药基因的转移和传播，是分子流行病学调查研究的基础方法。

#### 3.2 缩略语

以下缩略语适用于本文件。

SS: SS 琼脂 (Salmonella Shigella Agar)

BHI: 脑心浸出液肉汤 (Brain Heart Infusion Broth)

Tris-HCl: 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

TBE: Tris-硼酸-EDTA 缓冲液

TE: Tris-EDTA 缓冲液

#### 4 原理

通过对 *bla<sub>NDM</sub>* 基因的序列分析, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计并合成了 1 对特异性引物, 建立了动物源奇异变形杆菌新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶基因 *bla<sub>NDM</sub>* PCR 检测技术规程。通过反复试验确定引物的最佳退火温度为 55°C, 该引物具有良好的特异性、稳定性和重复性。用所建立的方法对 40 株山东地区鸡源奇异变形杆菌中碳青霉烯类耐药基因 *bla<sub>NDM</sub>* 进行检测分析。

#### 5 试剂与耗材

5.1 美罗培南 (MEM)

5.2 SS 琼脂 (按照附录 A.1 配制)

5.3 BHI 肉汤 (按照附录 A.2 配制)

5.4 1 mol/L Tris-HCl, pH8.0 (按照附录 A.3 配制)

5.5 0.5 mol/L EDTA, pH8.0 (按照附录 A.4 配制)

5.6 TE 缓冲液 (按照附录 A.5 配制)

5.7 10×TBE 电泳缓冲液 (按照附录 A.6 配制)

5.8 琼脂糖凝胶 (按照附录 A.7 配制)

5.9 2 × Taq Master Mix (Dye Plus)

5.10 DL 2000 Plus DNA Marker

5.11 阳性对照

5.12 阴性对照

5.13 Gold View 核酸染料

5.14 NDM 特异性引物

5.15 八连管

5.16 离心管 (0.2 mL、1.5 mL)

#### 6 仪器与设备

6.1 立式高压蒸汽灭菌器

6.2 生化恒温培养箱

6.3 立式空气恒温振荡培养箱

#### 6.4 PCR 仪

#### 6.5 琼脂糖凝胶电泳仪

#### 6.6 凝胶成像系统

#### 6.7 微波炉

#### 6.8 微量移液器（2.5 $\mu$ L、10 $\mu$ L、100 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L）

#### 6.9 冷冻离心机：离心力 $\geq$ 12,000 g

#### 6.10 水浴锅

#### 6.11 电子天平：精度 0.1 g、0.01 g、0.001 g

### 7 检测方法

#### 7.1 样品准备

将奇异变形杆菌直接划线于 SS 琼脂平板（含有 1  $\mu$ g/mL 亚胺培南），37 $^{\circ}$ C 孵育 16-18 h，选择挑取单个黑色中心菌落接种至含 1 mL BHI 肉汤的 1.5 mL 离心管中。

#### 7.2 样品 DNA 提取

将含 1 mL BHI 肉汤的 1.5 mL 离心管 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心 10 min，弃上清，加入 200 $\mu$ L TE 缓冲液重悬沉淀，放入 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮至少 10 min，取出后立即冰浴 10 min，12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min，取上清液即为样品 DNA。

#### 7.3 PCR 检测

以提取的样品 DNA 为模板进行 PCR 反应，同时设置阳性对照（含 NDM 耐药基因奇异变形杆菌提取的 DNA）、阴性对照（不含 NDM 耐药基因奇异变形杆菌提取的 DNA）及空白对照（不含模板 DNA）。具体 PCR 检测方法见附录 B。

### 8 结果判定

8.1 阳性对照经 PCR 扩增反应后出现 984bp 大小的条带，而阴性对照和空白对照不出现任何条带，试验结果成立，反之不成立。

8.2 在试验结果成立的前提下，样品 DNA 扩增出与阳性对照一致的 984bp 条带，则说明菌株中存在 NDM 耐药基因，否则说明不存在 NDM 耐药基因。

### 9 注意事项

采样及检测过程中应注意个人防护，戴口罩和手套、穿工作服：在无污染环境操作中，及时清理物品，用 75%酒精对操作区域消毒处理，废弃物经高压灭菌后按有关规定处理。

附录 A  
(规范性)  
相关试剂的配制

A.1 SS 琼脂培养基

准确称取牛肉粉 5.0 g, 示月腺 5.0 g, 乳糖 10.0 g, 3 号胆盐 8.5 g, 枸橼酸钠 8.5 g, 硫代硫酸钠 8.5 g, 枸橼酸铁 1.0 g, 中性红 0.025 g, 煌绿 0.00033 g, 琼脂 17.0 g, 加热搅拌溶解于 1000 mL 蒸馏水中, 室温调 pH 值至 6.9-7.1, 加热至煮沸, 不必高压蒸汽灭菌, 冷至 45-50°C 倒成平板。

A.2 脑心浸出液肉汤 (BHI) 培养基

准确称取胰蛋白胨 10.0 g, 牛心浸粉 17.5 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 磷酸氢二钠 (12H<sub>2</sub>O) 2.5 g, 加热搅拌溶解于 1000 mL 蒸馏水中, 室温调 pH 至 7.4±0.2, 121°C 高压灭菌 15 min, 备用。

A.3 1 mol/L Tris-HCl, pH8.0

157.6 g Tris-HCl 溶于 800 mL 超纯水中, 室温调 pH 至 8.0, 加水至终体积 1000 mL, 高压灭菌。

A.4 0.5 mol/L EDTA, pH8.0

37.22 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 溶于 160 mL 超纯水中, 加 10 mL 10 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0, 加水至终体积 200 mL, 分成数份, 高压灭菌。

A.5 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl: 1mM EDTA)

10 mL 1mol/L Tris-HCL, pH8.0, 2 mL 0.5mol/L EDTA, pH8.0, 灭菌超纯水稀释至 1000 mL。

A.6 10×TBE 电泳缓冲液, pH8.3

108 g Tris-base (0.9 mol/L), 55 g 硼酸 (0.9 mol/L), 加入 40 mL 0.5 mol/L pH8.0 EDTA 储存液 (0.02 mol/L), 溶于 1000 mL 灭菌的超纯水中, 高压灭菌。

A.7 琼脂糖凝胶 (15 g/L)

称取 1.5 g 琼脂糖, 加入 10×TBE 电泳缓冲液 100 mL, 微波炉中加热至琼脂糖完成溶解。

附录 B  
(规范性附录)

奇异变形杆菌 NDM 耐药基因 PCR 检测方法

B.1 奇异变形杆菌 NDM 耐药基因特异性引物

NDM-F: 5'-CCAATATTATGCACTCTGTCTGC-3'

NDM-R: 5'-TCAGTGTAGCTTGTCTGCCATGT-3'

B.2 PCR 扩增

按下列组分制备 PCR 反应体系 30  $\mu\text{L}$ ，同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照，具体反应体系见表 B.1。将下列 B.1 PCR 反应体系中各组分加入八连管中，PCR 反应条件为：94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min；94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s，55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s，72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s，共 30 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min，4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

表 B.1 PCR 反应体系

反应组成	体积( $\mu\text{L}$ )
模板 DNA	1
引物 NDM-F	1
引物 NDM-R	1
2 $\times$ Taq Master Mix (Dye Plus)	15
ddH <sub>2</sub> O	12
总计	30

B.3 PCR 结果判定

PCR 反应完成后，配置 15 g/L 质量浓度的琼脂糖凝胶，每 100 mL 琼脂糖凝胶溶液中加入 10  $\mu\text{L}$  GoldView 核酸染料。取 5  $\mu\text{L}$  反应产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳中（150v，30min）进行电泳，Marker 选择为 DL2000，缓冲溶液为 1 $\times$ TBE。PCR 扩增产物电泳后，在凝胶成像系统中观察。