

ICS 11.220

点击此处添加中国标准文献分类号

# 团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—2021

## 实时荧光定量 PCR 检测多重耐药肠杆菌 基因型技术规范

Technical Regulations of Real-time Fluorescence Quantitative PCR for the  
Detection of Multidrug-resistant Enterobacter Genotypes

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

2021 - 04 - 21 发布

2021 - 05 - 07 实施

中国兽医协会 发布

## 目 次

前 言.....	II
实时荧光定量 PCR 检测多重耐药肠杆菌基因型技术规范.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 设备和材料.....	2
5 耐药菌污染评价.....	2
6 耐药性检测.....	2
7 耐药基因与耐药相关性分析.....	4
8 生物安全.....	4
附录 A（规范性）抗菌药物药敏纸片的制备.....	1
附录 B（规范性）肠杆菌耐药性检测的质量控制.....	2

中国兽医药学  
CVMA

## 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、青岛农业大学。

本文件主要起草人：赵莉、刘志海、王莘莘、郝智慧、王帅玉、刘旭东、朱晓琳、任海燕、郝红侠

中国兽医协会  
CVMA

# 实时荧光定量 PCR 检测多重耐药肠杆菌基因型技术规范

## 1 范围

本文规定了肠杆菌耐药菌的耐药基因检测的设备材料、试剂、药敏试验、耐药基因监测和生物安全的相关要求。

适用于畜禽源大肠埃希菌、沙门氏菌和其他肠杆菌细菌的耐药基因检测技术。

## 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 4789.1 食品安全国家标准食品微生物学检验总则

GB 19489 实验室生物安全通用要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**最低抑菌浓度 Minimal inhibitory concentration, MIC**

在琼脂或肉汤稀释法药物敏感性检测试验中能抑制肉眼可见的微生物生长的最低抗菌药物浓度。

### 3.2

**纸片扩散法 Disk diffusion method**

将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种待测菌的琼脂平板上，在纸片周围抑菌范围内待测菌的生长被抑制，从而产生透明的抑菌圈，抑菌圈的大小反映了待测菌对抗菌药物的敏感程度，即抑菌圈越大，MIC 值越小。

### 3.3

**敏感 Susceptible**

使用推荐剂量的抗菌药物时，菌株可被达到抗菌活性浓度水平所抑制。

### 3.4

**中介 Intermediate**

分离菌株的 MIC 接近抗菌药物在血液和组织中的水平，对药物治疗的反应低于敏感菌株。

### 3.5

**耐药 Resistant**

指按常规剂量表，在抗微生物药通常可达到的浓度时，菌株不能被抑制；或/和表明抑菌圈直径缩小到菌株可能产生了微生物耐药机制的范围内。

### 3.6

**微量肉汤稀释法 Broth microdilution method**

定量检测某一抗菌药物对动物源性细菌的体外抑菌活性的一种标准方法。在药敏测试板上设有一系列倍比稀释浓度的抗菌药物，通过加入待检细菌的菌悬液，经一定时间的孵育后对药敏板条进行读数，经数据分析得到 MIC 值。

## 4 设备和材料

### 4.1 设备

- 4.1.1 超净工作台
- 4.1.2 恒温培养箱
- 4.1.3 立式压力蒸汽灭菌器
- 4.1.4 电热恒温调速振荡器
- 4.1.5 实时荧光定量 PCR
- 4.1.6 超微量紫外分光光度计
- 4.1.7 酶标仪
- 4.1.8 pH 计
- 4.1.9 漩涡混合器
- 4.1.10 超低温冷冻存储箱
- 4.1.11 电子分析天平
- 4.1.12 电热恒温鼓风干燥箱
- 4.1.13 台式高速冷冻离心机
- 4.1.14 实验室超纯水机

### 4.2 培养基

- 4.2.1 Mueller-Hinton 琼脂
- 4.2.2 Mueller-Hinton 肉汤
- 4.2.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA)

### 4.3 试剂

- 4.3.1 Tris-EDTA buffer solution
- 4.3.2 50×TAE Buffer
- 4.3.3 荧光定量 RT-PCR 试剂盒
- 4.3.4 Taq DNA 聚合酶及引物

### 4.4 标准质控菌株

- 4.4.1 大肠埃希菌 ATCC™25922

### 4.5 对照基因

- 4.5.1 16S rRNA

## 5 耐药菌污染评价

### 5.1 菌株分离

将已知的样品稀释液与 VRBGA 培养基混合，于 35℃~37℃培养 18 h~24 h，肠杆菌细菌形成粉红色至红色，带有或不带有沉淀环的菌落，使用生化实验对选择有代表性的菌株进行确认和计数。

### 5.2 菌株鉴定

临床送检的各种标本中分离获得的菌株，经生化试验初筛，采用微生物分析仪器或其他等效仪器进行菌种鉴定。

## 6 耐药性检测

### 6.1 纸片扩散法药敏试验

分离纯化后的菌株用 0.85%灭菌生理盐水稀释，划线培养于营养琼脂中，35℃~37℃培养 16 h~18 h，挑取单个菌落，用 0.85%灭菌生理盐水稀释至 0.5 麦氏比浊度（此时菌悬液浓度约为  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL）。用无菌棉签蘸取菌悬液，均匀涂布于 Mueller-Hinton 琼脂表

面，15 min 后贴药敏纸片，每个平板贴 4~5 张负载不同抗生素的药敏纸片，药敏纸片的要求应符合附录 B 操作。纸片边缘至培养皿边缘大于 15 mm，纸片间距离不小于 24 mm。将平板倒置于培养箱中，在 35℃~37℃ 恒温培养 16 h~18 h 后，测定抑菌圈直径。耐药判定以大肠埃希菌 ATCC™25922 为对照。通常细菌对三类或三类以上的抗生素具有耐药性被称为多重耐药细菌（Multidrug-Resistant Organism, MDRO），记录耐药折点和多重耐药率。

## 6.2 微量肉汤稀释法测定耐药性

于无菌 96 微孔板的每个孔中加入 100 μL MH 培养基后，在第一列中每孔加入 100 μL 配制的一定浓度的抗生素溶液，使用微量移液器将抗生素溶液与 MH 培养基混匀，取 100 μL 混合溶液加入微孔板的第二列中，再次混匀后取出 100 μL 混合溶液加入第三列微孔中。依上述方法将抗生素溶液稀释至第十一列，吸取 100 μL 混合溶液弃去，此时微孔板上每孔留有 100 μL 溶液。微孔板上除第一列和第十二列，每列微孔中抗生素浓度为左侧列的 50%。根据不同抗生素对大肠菌群的作用效果和机制不同，设置不同的抗生素浓度梯度。为防止边缘效应，微孔板的第一行和最后一行只加入液体培养基，不加抗生素溶液和菌悬液。可以使用商品化的药敏板。

挑取从同一样品中分离纯化的不同肠杆菌菌株接种于 MH 肉汤，在震荡培养箱中于 35℃~37℃ 培养 10 h~16 h。取适量培养后的悬浊液，用灭菌生理盐水将浊度调节到 0.5 麦氏浊度左右。用 MH 培养基稀释样品 1000 倍，加入到抗生素梯度稀释板，每孔添加量为 100 μL，使微孔板上每孔最终体积为 200 μL。轻微震荡微孔板，使孔内液体均匀混合。将微孔板置于 35℃~37℃ 的培养箱中培养 16 h~20 h 后，使用酶标仪在 630 nm 波长测量光密度（OD）值。第十二列上方三个孔注入 100 μL 的 MH 培养基为阴性对照，下方三个孔注入 100 μL MH 培养基和 100 μL 菌液的悬浊液为阳性对照。每种抗生素设三个平行。以大肠埃希菌 ATCC™25922 为实验对照组，测定了暴露于梯度浓度抗生素的样品中肠杆菌细菌的 OD 值，计算药物对其抑制率。

## 6.3 数据分析

采用数据统计软件对实验结果进行处理、分析与作图。

## 7 耐药基因与耐药性的关系

### 7.1 样品中总细菌 DNA 提取

为了得到浓度和纯度较高的 DNA 样品，使用基因组 DNA 快速提取试剂盒对样品中的 DNA 进行提取。将富集后的滤膜用无菌剪剪碎，细菌 DNA 提取过程与检测步骤按照试剂盒说明书操作。

收集 DNA 样品到灭菌离心管中，置于 -80℃ 保存备用。使用超微量紫外分光光度计对提取的 DNA 浓度和纯度进行检验。记录浓度值和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值。

### 7.2 常见 ARGs 相对丰度检测

针对养殖环节中常用的几类抗生素，选取 13 种环境中常见抗生素耐药基因（Antibiotic resistance genes, ARGs），其中包括内参基因 16S rRNA，使用仪器扩增并纯化目的基因片段，引物序列见表。按说明书在 PCR 板中加入反应体系，贴上封板膜，将 PCR 板置于实时荧光定量 PCR 中进行反应和测定。PCR 反应条件如下表所示。根据标准曲线计算各基因相对拷贝数，用与 16S rRNA 相对拷贝数比值来表示各 ARGs 在样品中的相对丰度。

引物序列表

基因名称	引物	5' -3' 序列	引用文献 PMID
16S rRNA	F	ATGGYTGTCGTCAGCTCGTG	通用引物
	R	GGGTTGCGCTCGTTGC	
<i>tetA</i>	F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	25901852
	R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
<i>tetG</i>	F	CATCAGCGCCGGTCTTATG	25901852
	R	CCCCATGTAGCCGAACCA	
<i>tetM</i>	F	CATCATAGACACGCCAGGACATAT	25901852
	R	CGCCATCTTTTGCAGAAATCA	
<i>aac(6')-lb-cr</i>	F	TTGGAAGCGGGGACGGAM	24000223
	R	ACACGGCTGGACCATA	
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	F	GGTTGGCGATCTGGTTTTTC	30023315
	R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F	ATGAGTATTCAACATTTTCG	30634056
	R	TTACCAATGCTTAATCAGTG	
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F	ATGCGTTAATTCGCCTGTG	30634056
	R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA	
<i>mcr-1</i>	F	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	29439754
	R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	

PCR 反应条件

反应温度 (°C)	退火时间 (s)	循环次数 (cycle)
95	30	1
95	5	40
60	30	40

### 7.3 数据处理

依据 qPCR 得到的数据绘制标准曲线，计算相关系数，以 16S rRNA 与 ARGs 绝对丰度的比值代表 ARGs 在样品细菌种群总基因中的相对含量。

## 8 生物安全

开展细菌分离鉴定与药敏试验等实验室管理应符合 GB 4789.1、GB 19489 生物安全要求，废弃物处理应严格按照 GB 19489 规定执行。菌株管理按照《动物病原微生物菌(毒)种保藏管理办法》执行。

中国兽医协会  
CVMA

附录 A

(规范性)

培养基

A.1 Mueller-Hinton 肉汤培养基 (Mueller-Hinton Broth, MHB)

A1.1 将牛肉粉 2.0 g、可溶性淀粉 1.5 g、酸水解酪蛋白 17.5 g 放入 1000 mL 一级水中，加热溶解，调节 pH 值  $7.4 \pm 0.2$ ，121℃ 高压灭菌 15 min，备用。

A1.2 可采用市售的商业培养基，使用时严格遵照制造商的使用说明。

A.2 Mueller-Hinton 琼脂培养基 (Mueller-Hinton Agar, MHA)

A2.1 将牛肉粉 2.0 g、可溶性淀粉 1.5 g、酸水解酪蛋白 17.5 g、琼脂 17.0 放入 1000 mL 一级水中，加热溶解，调节 pH 值  $7.4 \pm 0.2$ ，121℃ 高压灭菌 15 min，备用。

A2.2 可采用市售的商业培养基，使用时严格遵照制造商的使用说明。

## 附录 B

(规范性)

## 肠杆菌耐药性检测的质量控制

## B.1 药物纸片的质控

## B1.1 均匀性实验

以标准菌株接种于 MHA 平板，直径 150 mm 平板最多贴 12 张纸片，直径 100 mm 平板最多贴 6 张，纸片中心间距不少于 24 mm。35℃~37℃ 培养 16~18 h，测量记录每个抑菌环直径。每个抑菌圈直径都应该清晰可测量，保持平板在反射光照明的黑色背景上方，肉眼观察无明显生长的区域作为抑菌圈边缘。甲氧苄啶和磺胺类药物抑菌圈内可允许出现菌株轻微生长，在测定直径时可忽略轻微生长（20%或更少），测定较明显抑制的边缘。

## B1.2 准确度判断

计算出均匀性实验中得出的直径的平均值，与标准菌株的直径限度范围（见表 C.1）对照，确定纸片的实际含药量与标准是否一致，以此来判定折点。

## B.2 标准菌株的抑菌环直径限度范围

测试的取决于抗菌药物和细菌种类，选择的范围应该覆盖 MIC 终点，具体见表 A.1。

表 A.1 标准菌株的抑菌环直径允许范围

分类	抗菌药物	纸片含量	抑菌环直径 mm		
			耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
β-内酰胺合剂	阿莫西林-克拉维酸	20/10μg	≤13	14-17	≥18
	头孢他啶	30μg	≤17	18-20	≥21
头孢类	头孢吡肟	30μg	≤18	19-24	≥25
	头孢噻肟	30μg	≤22	23-25	≥26
单环内酰胺类	氨曲南	30μg	≤17	18-20	≥21
碳青霉烯类	亚胺培南	10μg	≤19	20-22	≥23
	美罗培南	10μg	≤19	20-22	≥23
喹诺酮类	环丙沙星	5μg	≤21	22-25	≥26
	氧氟沙星	5μg	≤12	13-15	≥16
四环素类	四环素	30μg	≤11	12-14	≥15
其他类	甲氧苄啶-磺胺甲恶唑	1.25/23.75μg	≤10	11-15	≥16