

ICS 11. 220

B41

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—2021

基于惰性载体靶向 D 群沙门氏菌感染的 间接凝集检测方法

Inert Carrier Based Indirect Agglutination Test Detection Method for Group D
Salmonella

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 试剂与材料.....	2
5 仪器设备.....	3
6 样品.....	3
7 试验步骤.....	3
8 试验数据处理.....	4
附录 A（规范性）凝集试验结果及判定.....	5

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。

本文件涉及专利

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：扬州大学，中国动物疫病预防控制中心，江苏省动物疫病预防控制中心，安徽荣达生物技术有限公司，和盛食品集团有限公司

本文件起草人：朱国强、杨斌、刘家奇、王传彬、牛琼、羊扬、段强德、孟霞、夏芑芑、戴鹏、侯千禧、顾宣强、顾小雪、董永毅、刘家荣、董世建、卞传忠、吴继军、司邵宏、李青霞、卢永胜、袁运伟

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到标准正文3.1与惰性载体系统相关的专利（专利号：ZL201910424369.8，ZL201910424381.9）的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：朱国强；杨斌；羊扬；孟霞；夏芑芑；段强德；朱晓芳

地址：225009 江苏省扬州市大学南路88号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

基于惰性载体靶向 D 群沙门氏菌感染的间接凝集检测方法

1 范围

本标准规定了D群沙门氏菌惰性载体间接凝集检测方法用于检测D群沙门氏菌感染的操作步骤和判定方法。

本标准适用于鸡源D群沙门氏菌的早期检测、诊断、监测和流行病学调查。

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。

世界动物卫生组织（OIE）陆生动物诊断试验和疫苗标准手册（第七版•2012）

GB/T 1962.1-2015 注射器、注射针头及其他医疗器械第1部分：通用要求

GB 15810-2019 一次性使用无菌注射器

GB/T 17999.1-2008 SPF鸡微生物学监测第1部分：SPF鸡微生物监测总则

GB/T 17999.4-2008 SPF鸡微生物学监测第4部分：SPF鸡血清平板凝集试验

GB/T 18635-2002动物防疫基本术语

3 术语和定义

GB/T 18635-2002界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出了GB/T 18635-2002中的某些术语和定义。

3.1

惰性载体 inert carrier

惰性载体是可应用于简便快速检测抗原或感染抗体的间接凝集试验检测方法而开发的专利载体系统（专利号：ZL201910424369.8，ZL201910424381.9），能在较高的工作浓度下与不同遗传背景的多种鸡源血清、全血不发生任何肉眼可见的凝集颗粒反应，即与鸡源血清、全血不产生非特异性凝集反应。

3.2

靶向 D 群沙门氏菌的惰性载体检测系统 inert carrier detection system for Group D *Salmonella*

靶向D群沙门氏菌的惰性载体检测系统是一种可用于检测、监测和诊断D群沙门氏菌感染的新型专利检测系统。惰性载体检测系统的建立基于惰性载体S9携带特定抗原因子，且表面展呈表达该单一抗原因子，特异性靶向D群沙门氏菌感染产生的全血（血清）抗体，与D群沙门氏菌感染鸡血清在工作浓度条件下产生肉眼可见的阳性凝集颗粒反应，而非D群沙门氏菌感染的不同背景鸡源血清、全血均不出现非特异性交叉凝集反应。靶向D群沙门氏菌惰性载体检测系统在玻板凝集反应操作平台上，在圈栏边鸡舍内鸡群中采集鸡一滴血，约10 μL全血样品检测，操作简便，反应灵敏快速，凝集反应颗粒肉眼可见，结果清晰

易判，在两分钟内观察和完成结果判定，如在两分钟短时间内出现凝集反应颗粒，为阳性凝集反应。

3.3

凝集试验 agglutination test

颗粒性抗原与相应抗体结合后，在有电解质存在和适宜反应温度条件时，互相凝集成肉眼可见的凝集颗粒和团块，称凝集试验（agglutination）。参与反应的抗原称为凝集原（agglutigen），抗体称为凝集素（agglutinin）。根据凝集反应中抗原的性质不同，反应的方式又分为直接凝集反应（direct agglutination）和间接凝集反应（indirect agglutination）。

3.4

基于惰性载体的间接凝集试验 indirect agglutination test based on inert carrier

惰性载体与相应抗体/抗原直接反应不出现凝集现象，当特异性抗原/抗原展呈携带于惰性载体表面形成致敏颗粒，再与相应抗体/抗原反应，则出现凝集称间接凝集反应。

3.5

D 群沙门氏菌 Group D *Salmonella*

沙门氏菌具有复杂的抗原结构，有菌体（O）抗原、鞭毛（H）抗原和表面荚膜（Vi）抗原，其中O抗原是每个菌株均有的成分。O抗原（菌体抗原）为脂多糖，多糖部分决定其特异性，是沙门氏菌分群的重要依据。每个沙门氏菌血清型可具有一种或数种O抗原，如D群沙门氏菌均有O₉抗原，部分D群沙门氏菌还有O₁、O₁₂等抗原。鸡群中常见流行的D群沙门氏菌有鸡白痢沙门氏菌（*Salmonella Pullorum*）、鸡伤寒沙门氏菌（*Salmonella Gallinarum*）、肠炎沙门氏菌（*Salmonella Enteritidis*）等，严重危害我国养鸡业的发展，目前我国已将种鸡场沙门氏菌净化工作列入《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020年)》中。

3.6

无特定病原鸡，SPF 鸡 specific pathogen free chicken

在符合规定的屏障环境或者隔离环境的饲养条件下，符合GB/T17999.1-2008中规定的微生物学监测要求的鸡。

4 试剂与材料

4.1 试剂

4.1.1 诊断试剂：D 群沙门氏菌感染诊断和监测用惰性载体检测系统。

4.1.2 血清样品盘：商品化的 D 群沙门氏菌阳性血清、商品化的 D 群沙门氏菌阴性血清、SPF 鸡血清。

4.1.3 生理盐水：0.9%的氯化钠水溶液。

4.2 材料

4.2.1 抗凝管。

4.2.2 无菌塑料吸头。

5 仪器设备

5.1 透明玻璃板或玻片。

5.2 白色匀光发光板。

5.3 10 μ L~100 μ L 微量移液器。

5.4 10 mL 一次性使用无菌注射器（带针头），符合 GB 15810-2019，GB/T 1962.1-2015 标准要求。

6 样品

6.1 全血样品

采用鸡翼下静脉无菌采血，直接现场检测或用全血抗凝管收集，置于4℃保存，6 h内完成检测。

6.2 血清样品

无菌采集全血2 mL，室温或37℃静置60 min，之后于4℃放置1 h至过夜后，6000 r/min离心5 min，收集上清，4℃保存待检，样品采集应记录翅号、采样时间等信息。

7 试验步骤

7.1 检测操作台的设置

将透明洁净的玻板或玻片放置在白色匀光发光板上，接通电源后，调节发光板亮度至适中水平，玻板表面应洁净，无影响凝集反应结果判定的灰尘颗粒等杂物。

7.2 预试验（检验标准）

每次检测前20 min从4℃冰箱中取出D群沙门氏菌阳性血清、D群沙门氏菌阴性血清、SPF鸡血清和无菌生理盐水，使其回升至室温左右温度，应为14℃~28℃。用微量移液器吸取充分混匀的D群沙门氏菌感染诊断和监测用惰性载体对照系统和检测系统各一滴，约为10 μ L，垂直滴加在检测操作台的洁净玻璃板或洁净玻片上，然后迅速滴加同量的阳性血清对照和阴性血清对照、SPF鸡血清阴性对照和无菌生理盐水阴性对照，用吸头混合均匀，涂布成直径为1 cm~2 cm的片状，期间不断摇动玻璃板或玻片，必须在2 min内判定结果。设定阴性、阳性对照，D群阳性血清与惰性载体对照系统不反应，而与惰性载体检测系统出现明显的阳性凝集颗粒反应；阴性对照血清不会与惰性载体对照系统和检测系统出现肉眼可见凝集颗粒反应。

7.3 采血技术规范

7.3.1 采血人员需经过专业培训和熟练掌握采样技巧为佳，遵循严格的无菌操作手续，遵守鸡场的消毒防疫等相关规定和个人防护。

7.3.2 采血场所应有充足的光线便于肉眼观察判定现场的凝集颗粒反应,建议夏季室温保持在 25 °C~28 °C,冬季则在 14 °C~20 °C。

7.3.3 采血时用的注射器应保持清洁干燥,要有足够的强度维持操作,使用灵活且方便,外包装未破损,并在有效期内使用。

7.3.4 采血一般采用鸡翼下静脉采血法,下述程序供参考。采血时,助手保定鸡。助手左手抓鸡的两只脚,右手抓鸡的两只翅膀,将鸡侧放于地面,并用大拇指压迫翅膀根部静脉,使静脉充分暴露充血,以方便采血操作。翼下静脉采血前一定要用酒精棉球消毒,酒精有扩张血管作用。采血者用酒精棉球消毒翅静脉窝区后即可进针,在距离静脉窝大约 0.3 cm 处,使针管与近心端血管的夹角为 45° 左右,进针最好是将针头的切口面向上,针头轻挑起表皮,由表皮与肌肉之间的空隙,往血管的远心端方向推针前行至血管上面,再将针管与血管重叠成一条直线刺入血管。进针不宜过深,如刺穿血管,皮下很快血肿,采血失败。稍稍将针头轻插进血管,轻拉活塞,注意观察针筒内有无血液被吸出,当发现有血液开始被吸出时,拔出针头,使血液外流,用微量移液枪快速吸取 10 μL~20 μL 全血与玻璃板或者玻片上的等量惰性载体检测系统混合。采血完毕,要用洁净干棉球压迫采血部位,不要用酒精棉球,因为酒精会引起溶血,造成血液凝固不良,不利于止血。

7.4 凝集试验结果判定

7.4.1 用移液器吸头快速吸取 10 μL~20 μL 待检样品垂直滴加于玻璃板或玻片上的等量惰性载体对照系统和检测系统中,充分混匀,期间轻轻不断晃动玻璃板或玻片,必须在 2 min 内观察和判定结果。

7.4.2 凝集试验成立条件:预试验中,2 min 内 D 群阳性血清与惰性载体对照系统不反应,与惰性载体检测系统出现明显的阳性凝集颗粒反应;阴性对照血清不会与惰性载体对照系统和检测系统出现肉眼可见凝集颗粒反应。

7.4.3 若混合底质均匀一致浑浊,未出现凝集颗粒现象,即不凝集,判为“-”(阴性,见附录 A,图 1D)。

7.4.4 出现可见的蓝色凝集颗粒,随液滴滑动,背景不清朗,判为“+”(弱阳性,见附录 A,图 1C)。

7.4.5 出现明显蓝色凝集块,背景较为清朗,判为“++”(阳性,见附录 A,图 1B)。

7.4.6 出现大的蓝色凝集块,背景很清朗,判为“+++”(强阳性,见附录 A,图 1A)。

8 试验数据处理

8.1 凝集反应结果为弱阳性、阳性和强阳性诊断为 D 群沙门氏菌感染。

8.2 D 群沙门氏菌感染阳性率可由诊断为 D 群沙门氏菌感染的个体所占群体比例计算得到。

附录 A

(规范性)

凝集试验结果及判定

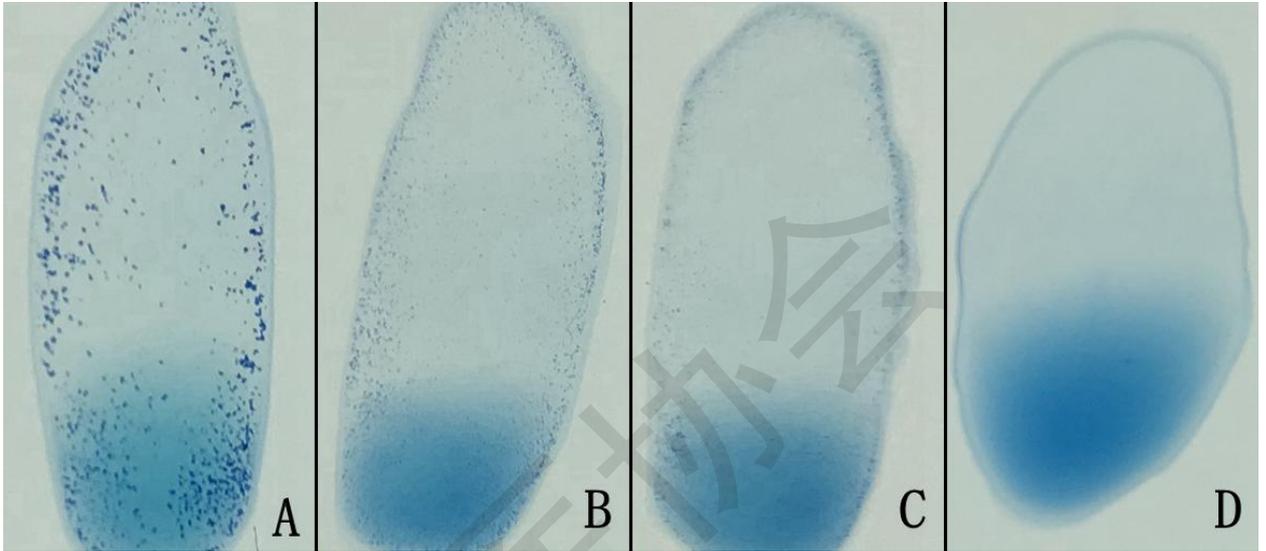


图 1 惰性载体检测系统与鸡源血清样本凝集反应结果示意图

A: 强阳性反应“+++”; B: 阳性反应“++”; C: 弱阳性反应“+”; D: 阴性反应“-”。

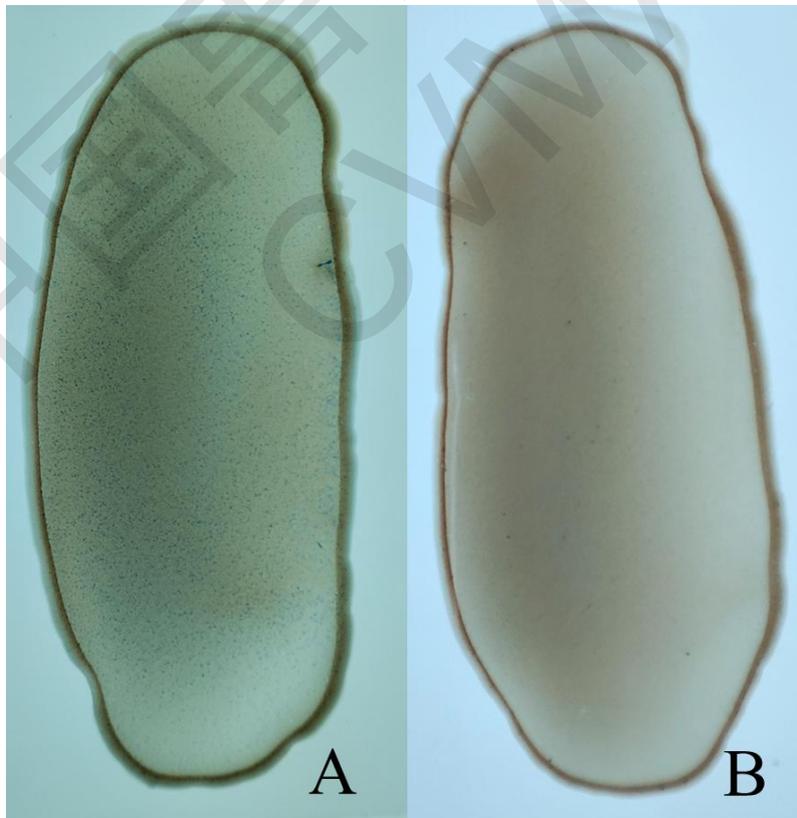


图 2 惰性载体检测系统与鸡源全血样本凝集反应结果图

A: 阳性反应; B: 阴性反应