ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 91—2022

基于惰性载体靶向D群沙门氏菌感染抗体的间接凝集检测方法

Inert carrier based indirect agglutination test of antibodies against Group D Salmonella infection

中国兽医协会 CVMA

2022－03－07 发布　　2022－03－07 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.....2
6 样品.....2
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
附 录 B （规范性） D群沙门氏菌阴性、阳性血清的背景及来源.....7
附 录 C （规范性） 基于惰性载体靶向D群沙门氏菌感染抗体的间接凝集检测试剂的制备方法.....8

中国兽医协会 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、夏芃芃、戴鹏、李雅倩、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。

中国兽医协会 CVMA

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，ZL202010427735.8，ZL202010428277.X，ZL202010400163.4）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；夏芃芃；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。

涉及专利如下：

一种惰性载体沙门氏菌及其潜在应用［发明］ZL201910424369.8 申请日：2019.05.21 授权公告日：2020.04.03　安徽荣达生物技术有限公司| 登记生效日：2020.05.15

一种惰性载体大肠杆菌及其潜在应用［发明］ZL201910424381.9 22019.05.21 授权公告日：2020.03.24

一种泛性型惰性载体沙门氏菌及其潜在应用［发明］ZL202010427735.8 申请日：2020.05.19　授权公告日：2020.12.25

一种泛性型惰性载体大肠杆菌及其潜在应用［发明］ZL202010428277.X 申请日：2020.05.19 授权公告日：2021.01.05

惰性载体间接凝集试验检测系统及其应用［发明］ZL202010400163.4 申请日：2020.05.12　授权公告日：2021.01.05

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

本文件规定了检测D群沙门氏菌感染抗体的惰性载体间接凝集检测方法的试剂与材料、仪器设备、样品、试验步骤和试验数据处理。

本文件适用于鸡群D群沙门氏菌的检测。

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 1962.1 注射器、注射针头及其他医疗器械第1部分：通用要求

GB 15810 一次性使用无菌注射器

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

GB/T 18635 动物防疫基本术语

3 术语和定义

GB/T 18635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中的某些术语和定义。

3.1

惰性载体 inert carrier

是为实现简便快速检测抗原或感染抗体的间接凝集试验检测而开发的专利载体系统（专利号：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，即与多种鸡源血清、全血不产生非特异性凝集反应。

3.2

靶向D群沙门氏菌感染抗体的惰性载体检测系统 inert carrier detection system for infectious antibody of Group D Salmonella

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。

注：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，而与非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，在鸡舍内鸡群中采集一滴鸡血，约10 μL全血，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，在两分钟内观察和判定结果，如在两分钟短时间内出现凝集反应颗粒，则为阳性凝集反应。

3.3

凝集试验 agglutination test

颗粒性抗原与相应抗体结合后，在有电解质存在且适宜反应温度条件时，两者互相结合，凝集成肉眼可见的凝集颗粒和团块，称凝集试验（agglutination test）。参与反应的抗原称为凝集原（agglutinogen），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 reaction）和间接凝集反应（indirect agglutination reaction）。

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，当特异性抗原表达展呈于惰性载体表面形成致敏颗粒，再与相应抗体反应，则出现凝集称间接凝集反应。

3.5

D群沙门氏菌 Group D Salmonella

是指O抗原为9，12或1，9，12的一类沙门氏菌。

注：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，无国际国内（尤其是国内）流行的鸡主要传染病原的鸡群。

注：SPF鸡需符合GB/T17999.1中规定的微生物学监测要求。

4 试剂与材料

4.1 试剂

4.1.1 诊断试剂：D群沙门氏菌感染抗体检测用惰性载体检测系统。

4.1.2 血清样品：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，见附录A。

4.1.3 生理盐水：0.9%的氯化钠溶液。

4.2 材料

促凝管。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 μL～100 μL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，GB/T 1962.1的相关要求。

6 样品

6.1 全血样品

采用鸡翼下静脉无菌采血，直接进行现场检测。

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，样品采集时应记录翅号、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(14 ℃~28 ℃)。用微量移液器吸取充分混匀的D群沙门氏菌感染抗体检测用惰性载体对照系统和检测系统各一滴(约为10 μL)垂直滴加在检测操作台的洁净玻璃板或洁净玻片上，然后迅速滴加等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，之后不断摇动玻璃板或玻片，应在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并熟练掌握采样技巧，遵循严格的无菌操作原则，遵守鸡场的消毒防疫等相关规定并进行个人防护。

7.3.2 采血场所应有充足的光线以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 ℃～28 ℃，冬季则在14 ℃～20 ℃。

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。助手左手抓鸡的两脚，右手抓鸡的两翅，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。翼下静脉采血前须用酒精棉球消毒翅静脉窝区后方可进针，在距离静脉窝约0.3 cm处，使针管与近心端血管的夹角为45°左右，进针时针头的切口面向上，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。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，用洁净干棉球压迫采血部位以便止血。

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，加等量惰性载体对照系统和检测系统，充分混匀，期间轻轻不断晃动玻璃板或玻片，应在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 B，图 B.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 B，图 B.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 B，图 B.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 B，图 B.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。

中国兽医协会 CVMA

附 录 A
（规范性）
D 群沙门氏菌阴性、阳性血清的背景及来源

本文件应用的D群沙门氏菌阴性、阳性血清的背景及来源见表A.1。

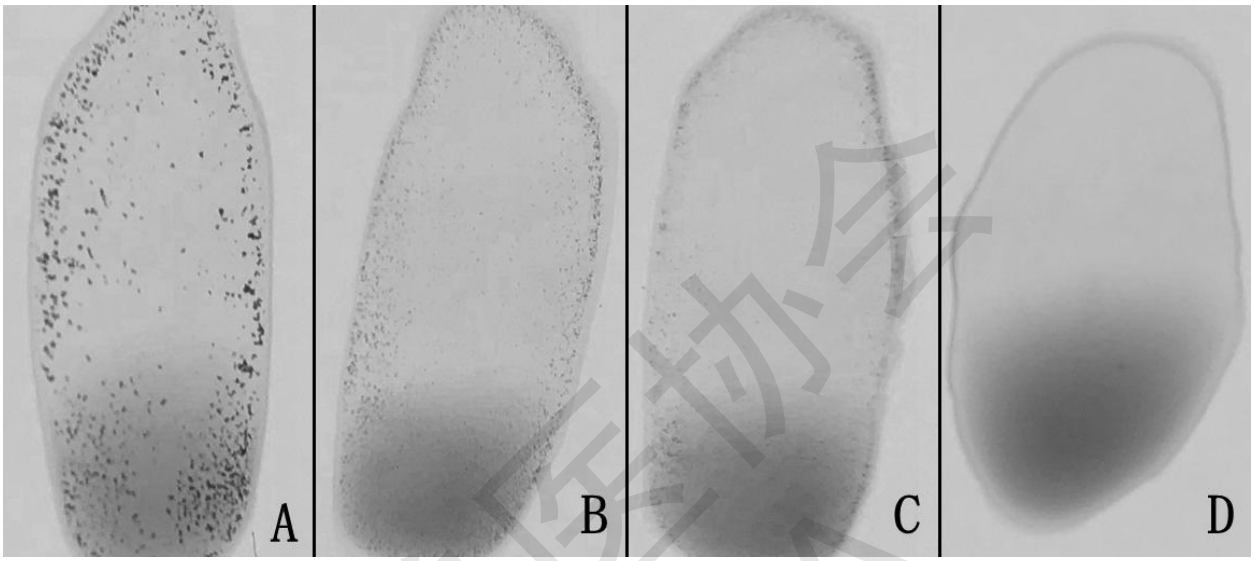
表A.1 D群沙门氏菌阴性、阳性血清的背景及来源

血清类型	背景	来源
D 群沙门氏菌阴性血清	SPF 鸡血清	SPF 鸡为实验动物公司采购
鸡白痢沙门氏菌阳性血清	SPF 鸡感染鸡白痢沙门氏菌标准株 CVCC526 血清	实验室感染
鸡伤寒沙门氏菌阳性血清	SPF 鸡感染鸡伤寒沙门氏菌疫苗株 SG9R 血清	实验室感染

中国兽医协会 CVMA

附 录 B
（规范性）
凝集试验结果及判定

血清样品检测结果判定见图B.1。全血样品检测结果判定见图B.2。



序号说明：

A——强阳性反应“+++”；

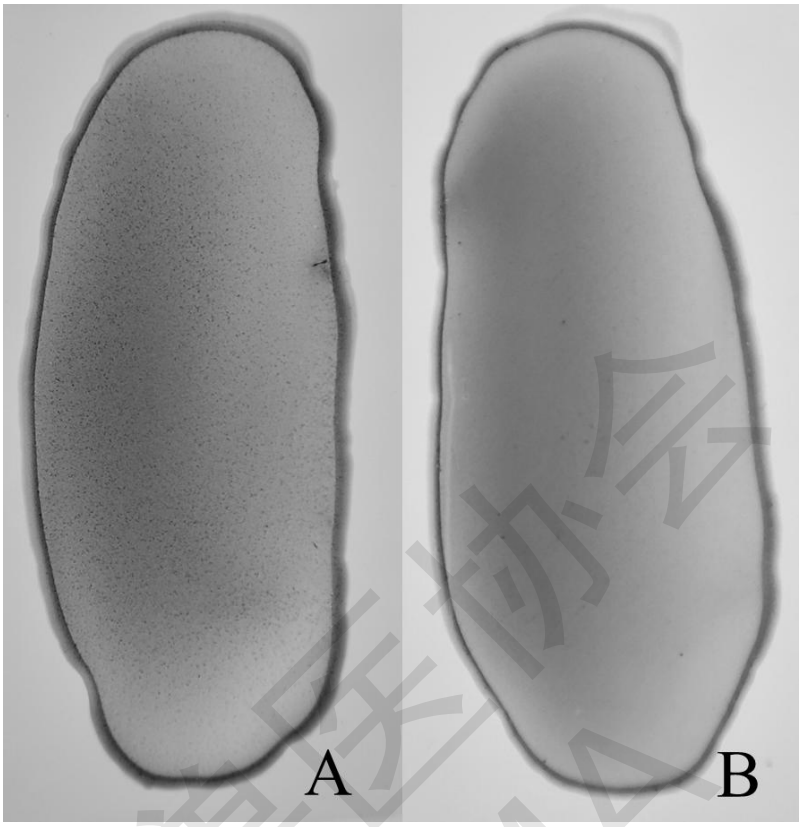
B——阳性反应“++”；

C——弱阳性反应“+”；

D——阴性反应“–”。

图 B.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

中国兽医协会 CVMA



序号说明：

A——阳性反应；

B——阴性反应。

图 B.2　惰性载体检测系统与鸡源全血样本凝集反应结果图

中国兽医协会 CVMA

附 录 C
（规范性）
基于惰性载体靶向 D 群沙门氏菌感染抗体的间接凝集检测试剂的制备方法

C.1 培养

对照系统和检测系统惰性载体菌于37 ℃液体LB中，220 rpm震荡培养16 h；

C.2 收获和灭活

用4 ℃离心机4000 rpm离心5 min，离心后用0.4%甲醛生理盐水重悬并洗涤3次，最后一次重悬后放入4 ℃冰箱灭活24 h；

C.3 染色

调整灭活的菌悬液浓度2×10^{10} CFU/mL，每隔3 h加入10%体积大1%结晶紫染色，充分混匀静置于37 ℃。

C.4 质检

将上述对照系统和检测系统的间接凝集检测抗原利用本文件“7.2　预试验（检验标准）”所述方法进行有效性验证，验证成功方可进一步应用。

中国兽医协会 CVMA