ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X28—2019

基于惰性载体检测系统诊断鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染平板凝集试验

Plate Agglutination Test Detection System Based on Inert Carrier for *Salmonella* Pullorum and Gallinarum Infections

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　发布

中国兽医协会 CVMA

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 4

2 规范性引用文件 4

3 术语和定义 4

4 试剂与材料 6

5 仪器设备 6

6 样品 6

7 试验步骤 7

8 试验数据处理 8

附录 A （规范性） 凝集试验结果及判定 10

附录 B （资料性） 惰性载体检测系统敏感性和特异性研究 11

附录 C （资料性） 惰性载体检测系统与鸡白痢/鸡伤寒多价染色平板凝集抗原的比较研究 13

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、中国动物疾病预防控制中心。

本文件起草人：朱国强、杨斌、王传彬、翟新验、戴鹏、杨溢、羊扬、孟霞、段强德、夏芃芃、顾小雪、刘玉良、徐琦。

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：201910424369.8，201910424381.9）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。

中国兽医协会
CVMA

基于惰性载体检测系统诊断鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染平板凝集试验

1 范围

本文件规定了鸡群中基于惰性载体检测系统诊断鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染平板凝集试验技术和其操作技术规范。

本文件适用于养禽业中有鸡白痢和鸡伤寒现场快速检测需求的鸡群。

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 1962.1-2015 注射器、注射针头及其他医疗器械6%（鲁尔）圆锥接头 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

NY/T 536-2017鸡伤寒和鸡白痢诊断技术

NY/T 2838-2015禽沙门氏菌病诊断技术

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：201910424369.8，201910424381.9），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

惰性载体检测系统 inert carrier detection system

惰性载体检测系统是一种可用于检测、监测和诊断鸡群中鸡白痢和伤寒沙门氏菌感染的新型专利检测系统（见附录A），惰性载体检测系统建立基于惰性载体S9携带特定抗原因子，且表面展呈表达该单一抗原因子，特异性靶向鸡群中鸡白痢/伤寒沙门氏菌感染产生的全血（血清）抗体，适用于鸡群中鸡白痢/伤寒沙门氏菌感染的检测、监测和诊断。该惰性载体检测系统携带成分单一的P抗原因子，特异性靶向结合鸡群中鸡白痢/伤寒沙门氏菌感染抗体，与鸡白痢/伤寒沙门氏菌感染鸡的血清在一定浓度条件下产生肉眼可见的阳性凝集颗粒反应，而与非鸡白痢/伤寒沙门氏菌感染的不同背景鸡源血清、全血不出现非特异性交叉凝集反应。该惰性载体检测系统基于玻板凝集反应操作平台，在圈栏边鸡舍内鸡群中采集鸡一滴血（10 μL~20 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，在两分钟内完成结果判定，该惰性载体检测系统适用于鸡群中鸡白痢/伤寒沙门氏菌感染的快速靶向特异性检测，如在两分钟短时间内出现血清凝集反应颗粒,为阳性凝集反应。

3.3

鸡白痢 Pullorum disease in chickens、**鸡伤寒** Gallinarum disease in chickens

鸡群中鸡白痢、鸡伤寒疫病分别由鸡白痢沙门氏菌（*Salmonella* pullorum）和鸡伤寒沙门氏菌（*Salmonella* gallinarum）引起鸡和火鸡等的传染病，是危害我国养鸡业的重要疾病。鸡白痢沙门氏菌病是世界动物卫生组织（OIE）规定的必须通报的动物疫病之一，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。

3.4

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。

3.5

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。参与反应的抗原称为凝集原，抗体称为凝集素。

4 试剂与材料

4.1 试剂

4.1.1 诊断试剂：鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染诊断和监测用惰性载体检测系统 S9-P。

4.1.2 血清样品盘：商品化的鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌阳性血清、商品化的鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌阴性血清、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 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 15810-2019，GB/T 1962.1-2015 标准要求。

6 样品

6.1 全血样品

中国兽医协会 CVMA

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

无菌采集全血不少于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℃冰箱中取出鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌阳性血清、鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌阴性血清、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惰性载体检测系统一滴，约为10 μL~20 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，鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌阳性血清出现明显的阳性凝集颗粒反应，阴性对照不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℃~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。

中国兽医协会 CVMA

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等量惰性载体检测系统中，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内鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌阳性血清出现明显的阳性凝集颗粒反应，阴性对照血清不会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1D）。

7.4.4　若出现轻微可见的细小凝集颗粒，晃动时有轻微滑动颗粒，背景浑浊，判为“可疑”。

7.4.5　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1C）。

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

7.4.7　出现大的蓝色凝集块，背景很清朗，判为“+++”（强阳性，见附录B，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鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染。凝集反应可疑的样本，隔两周后再次检测，若凝集反应结果为阳性或仍为可疑则判为阳性，否则诊断为鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染阴性。

8.2　鸡白痢和鸡伤寒阳性率可由诊断为鸡白痢和鸡伤寒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）

凝集试验结果及判定

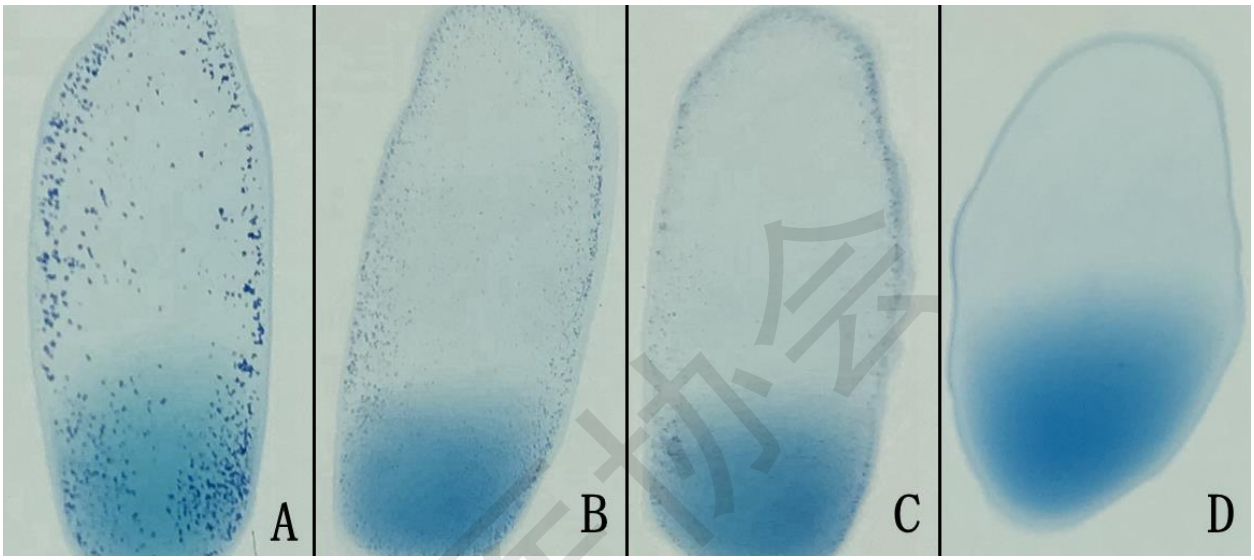

图 1 惰性载体检测系统与鸡源血清样本凝集反应结果示意图

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

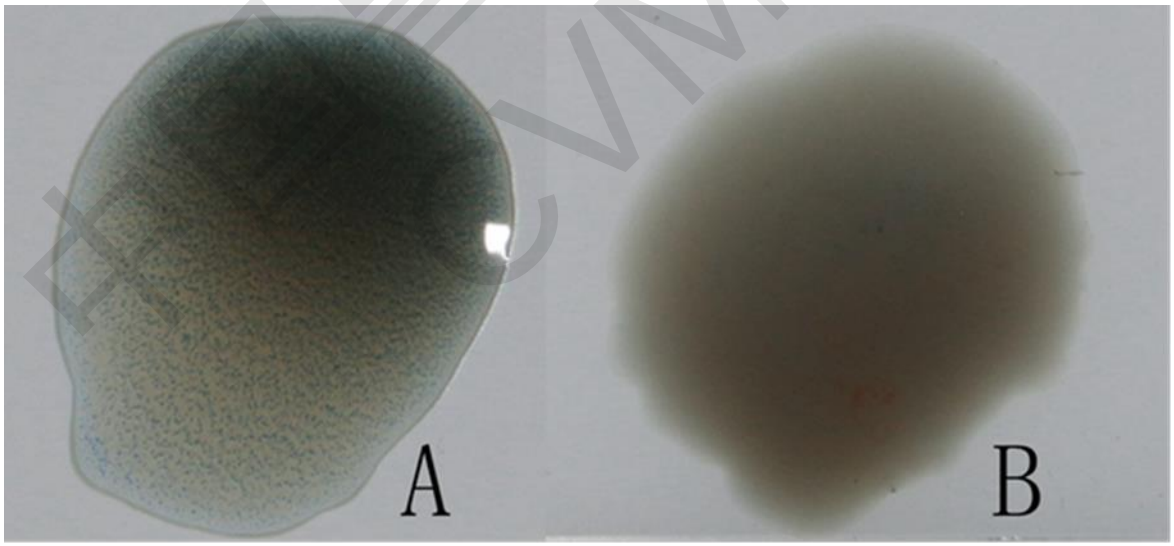

图 2 惰性载体检测系统 P 与鸡源全血样本凝集反应结果图

A：阳性反应；B：阴性反应

附录 B

（资料性）

惰性载体检测系统敏感性和特异性研究

B1. 将倍比稀释鸡白痢/鸡伤寒阳性血清与惰性载体检测系统进行凝集试验，比较惰性载体检测系统与倍比稀释的阳性血清的凝集表现和检测限，敏感性研究显示当阳性血清1:32稀释时，惰性载体检测系统仍能检出。

B2. 将惰性载体检测系统分别与不同背景的多种非鸡白痢/鸡伤寒沙门菌鸡源血清：SPF鸡血清、鸡细菌性感染阳性血清（非鸡白痢/鸡伤寒沙门菌感染）、鸡寄生虫感染阳性血清、鸡病毒性感染阳性血清，不同来源的鸡白痢/鸡伤寒沙门菌感染阳性血清和免疫血清进行凝集反应。结果显示，惰性载体检测系统与PBS电解质溶液不出现自凝现象，与不同背景的多种非鸡白痢/鸡伤寒沙门菌鸡源血清/全血：SPF鸡血清/全血、鸡细菌性感染阳性血清/全血（非鸡白痢/鸡伤寒沙门菌感染）、鸡寄生虫感染阳性血清/全血、鸡病毒性感染阳性血清/全血，其检测的凝集反应结果都为阴性，与不同来源的鸡白痢/鸡伤寒沙门菌感染阳性血清/全血和免疫血清/全血反应结果都为阳性（表B-1）。

表B-1惰性载体检测系统特异性测试

血清背景详情	惰性载体检测系统
SPF鸡血清/全血（山东农业大学提供）	-
SPF鸡血清/全血（哈尔滨医科大学提供）	-
禽大肠杆菌临床检测阳性鸡血清/全血	-
禽大肠杆菌临床检测阴性鸡血清/全血	-
O_1型大肠杆菌感染SPF鸡血清/全血	-
O_2型大肠杆菌感染SPF鸡血清/全血	-
O_{78}型大肠杆菌感染SPF鸡血清/全血	-
肠炎沙门菌感染SPF鸡血清/全血	-
禽巴氏杆菌病阳性血清/全血	-
鸡葡萄球菌病阳性血清/全血	-
鸡球虫病阳性血清/全血	-
鸡绦虫病阳性血清/全血	-

禽白血病病毒阳性血清/全血	-
鸡新城疫阳性血清/全血	-
禽流感阳性血清/全血	-
鸡马立克氏病阳性血清/全血	-
鸡传染性法氏囊病阳性血清/全血	-
鸡毒支原体阳性血清/全血	-
鸡减蛋下降综合征阳性血清/全血	-
禽脑脊髓炎病毒感染阳性血清/全血	-
鸡传染性支气管炎病毒阳性血清/全血	-
鸡白痢/鸡伤寒沙门菌阳性血清/全血（中监所）	+
鸡白痢/鸡伤寒沙门菌阳性血清/全血（中国动物疫病预防控制中心）	+
鸡白痢/鸡伤寒沙门菌阳性血清/全血（山东农业大学）	+
鸡白痢沙门菌参考株CVCC535人工感染SPF鸡血清/全血（自制）	+
鸡伤寒沙门菌U20株人工感染SPF鸡血清/全血（自制）	+
鸡白痢/鸡伤寒沙门菌临床采集阳性血清/全血（1号种鸡场，ELISA和细菌分离鉴定阳性）	+
鸡白痢/鸡伤寒沙门菌临床采集阳性血清/全血（2号种鸡场，ELISA和细菌分离鉴定阳性细菌分离鉴定阳性）	+
鸡白痢/鸡伤寒沙门菌临床采集阳性血清/全血（3号种鸡场，ELISA和细菌分离鉴定阳性细菌分离鉴定阳性）	+

注：“-”表示阴性；“+”表示阳性。

中国兽医协会 CVMA

附录 C

（资料性）

惰性载体检测系统与鸡白痢/鸡伤寒多价染色平板凝集抗原的比较研究

C1. 以 ELISA 检测试剂盒为假定金标准参考

C1.1. 为了测试惰性载体检测系统检测性能，我们从广西某规模化养鸡场采集了共计 232 份鸡血清，在前期的流行病学调查中发现，该养鸡场流行的沙门菌血清型仅为鸡白痢沙门菌，并无其他 D 群沙门菌流行，考虑到 Bio Chek 公司商品化 D 群沙门菌 ELISA 检测试剂盒较为可靠的检测性能，我们将其作为比较测试的假定金标准参考。使用商品化凝集抗原（鸡白痢/鸡伤寒多价染色平板凝集抗原）和新型惰性载体检测系统平行检测 232 份鸡临床采集血清，分别使用 Kappa 测验和 ROC 曲线比较三组结果的一致性比较。

C1.2. 以 D 群沙门菌 ELISA 试剂盒作为假定金标准参考的平行检测结果显示，不论是现场检测还是实验室检测，商品化凝集抗原（鸡白痢/鸡伤寒多价染色平板凝集抗原）的敏感性、特异性都未能达到较为理想水平，Kappa 系数出现较差（0.05）或中等（0.42）。而惰性载体检测系统的敏感性为 83.9%，特异性为 80.0%，总符合率为 81.5%，Kappa 系数为较强（0.62）。经过 ROC 曲线分析，惰性检测系统惰性载体检测系统的 AUC 值为 0.804（95%置信区间=0743-0.865，且 $p<0.05$），显著优于商品化凝集抗原（鸡白痢/鸡伤寒多价染色平板凝集抗原）。

表 C-1 惰性载体检测系统与商品化凝集抗原检测临床血清

试剂	检测地点	样本量	Kappa Test				ROC Curve		
			SEN[a] (%)	SPE[b] (%)	TCR[c] (%)	Kappa Coefficient	PPV[d] (%)	NPV[e] (%)	AUC Value
商品化凝集抗原	现场	232 份	81.6	24.8	46.1	0.05（较差）	39.4	69.2	0.543±0.087
	实验室	232 份	48.3	91.0	75.0	0.42（中等）	76.4	74.6	0.755±0.075
惰性载体检测系统	实验室	232 份	83.9	80.0	81.5	0.62（较强）	71.6	89.2	0.804±0.061

注：[a] Sensitivity (SEN)，敏感度；[b] Specificity (SPE)，特异度；[c] Total Coincidence Rate (TCR)，总符合率；[d] Positive Predictive Value (PPV)，阳性预测值；[e] Negative Predictive Value (NPV)，阴性预测值。