

## Read kube 大肠杆菌 O157 (ECO)

仅供实验室用

Read kube 大肠杆菌 O157 (ECO)试剂盒是在免疫分析系统 (Read kube) 上应用自动定性酶联荧光免疫分析(ELFA)原理来检测食品中的大肠杆菌血清型 O157。

### 概述

大肠杆菌 O157 是公认的出血性肠炎的病原菌,在美国、加拿大、英国、日本以及比利时造成数起爆发感染<sup>(1,2)</sup>。除牛奶、苹果汁及肉产品可引起感染外,最常见的感染源是牛肉。肠痉挛和血性腹泻是 O157: H7 感染后的典型症状。约 10%的病人发展成急性肾衰(溶血性尿毒综合征)。易感人群多为 5 岁以下小孩及老人<sup>(3)</sup>。Read kube ECO 分析为一种对大肠杆菌 O157 快速筛选方法,能够保证对有动力和无动力的菌株进行检测。最新研究表明致病性大肠杆菌 O157 血清型可能有无动力菌株<sup>(4)</sup>。

### 原理

Read kube 大肠杆菌 O157 (ECO)分析,是一种在自动 Read kube 仪器上进行的酶联荧光免疫分析 (ELFA) 的方法。(参见操作手册)

固相容器 (SPR) 是一个类似于加样头的一次性使用装置,在检测中起固相及加样器之用。SPR 用抗大肠杆菌 O157 抗体包被。各种试剂均封闭在试剂条内。

所有检测步骤均自动由 Read kube 仪器完成。煮沸过的增菌肉汤加入试条孔后,在特定时间内,样本在 SPR 内、外反复循环。样本中的 O157 抗原与包被在 SPR 内部的 O157 抗体结合,未结合的其他成分通过洗涤步骤清除。标记有碱性磷酸酶的抗体也在 SPR 内、外循环并与固定在 SPR 壁上的大肠杆菌 O157 抗原结合,最后洗去未结合的抗体标记物。SPR 中所用荧光底物为磷酸 4-甲基伞型物。仍结合在 SPR 壁上的酶将催化底物转变成具有荧光的产物: 4-甲基伞形酮。在 Read kube 中由光扫描器在 450nm 处检测该荧光强度,试验完成后由计算机自动分析结果,得出检测值,并打印出每份样本的实验报告。

### Read kube 大肠杆菌 O157 试剂盒组成 (30 个人份/每盒)

30 个 ECO 试剂条	成品试剂,参考下表
30 个 ECO SPR	ECO SPR 的内面制造时已用抗大肠杆菌 O157 多克隆抗体包被。
1 瓶标准液 (6ml) S <sub>1</sub>	纯化,灭活的大肠杆菌 O157 抗原+含防腐剂+蛋白稳定剂。 MLE 卡上“标准 S1 RFV 值范围”栏下表示可信区间范围
一瓶阳性对照 (6ml) C <sub>1</sub>	纯化,灭活的大肠杆菌 O157 抗原+含防腐剂+蛋白稳定剂。 MLE 卡上“质控 C1 值范围”栏下表示可信区间范围
一瓶阴性对照 (6ml) C <sub>2</sub>	TRIS-NaCl-Tween(150mmol/l)+含防腐剂。 MLE 卡上“质控 C2 值范围”栏下表示最大可接受值
1 张 MLE 卡	包含校正测试所需的工厂校正数据。

### 说明

#### SPR

SRP 在生产时以抗大肠杆菌 O157 多克隆抗体包被。每一 SPR 上均标有“ECO”。仅从包装袋中取出所需数量的 SPR 并及时封闭包装袋。

### 试剂条

包含 10 个以箔封的孔,并覆以标签,标签上有条形码,显示测试种类,试剂盒批号、有效期等。第一孔加入样本,最后一孔是荧光测定用比色杯。中间各孔含有实验用各种试剂。

## 大肠杆菌 O157 试剂条说明

孔	试剂
1	样本孔：此孔加 500ul 煮沸过的增菌肉汤。
2	前洗涤液（400ul）：TRIS-NaCl-Tween (150mmol/l) + 防腐剂。
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	洗涤液（600ul）：TRIS-NaCl-Tween (150mmol/l) + 防腐剂。
6	酶标记物（400ul）：用碱性磷酸酶标记多克隆抗大肠杆菌 O157 抗体+防腐剂。
10	含底物(300ul)的比色杯：磷酸 4-甲基伞形物(0.6mmol/l)+ 二乙醇胺(DEA)(0.62mol/l 或 6.6%,pH9.2)+防腐剂。

实验名称、批号和校正参数均在 MLE 卡上标明并做成仪器可读的条形码。

### \*刺激性试剂

- **R36**: 对眼睛有刺激
- **S26**: 一旦入眼，立即以大量清水冲洗并就医

### 未提供但应具备的设备

- 加样器：最小加样量为 500  $\mu$ l。
- 水浴箱（100 $^{\circ}$ C）或相当装置。
- 消化袋
- 改良 TS 肉汤（m-TSB）
- 吡啶黄
- 新生霉素
- 麦康凯肉汤
- 头孢克肟-亚碲酸钾 CT 混合物
- SMAC 琼脂
- O 157:H7 鉴定培养基
- 胰蛋白胍盐
- Read kube ICE 试剂盒
- SMAC-CT 琼脂

### • 注意事项

- 仅作为专业用途
- 请将 Read kube 系统放置在微生物检测的专用房间。
- 试剂盒的东西都是来源于动物，未被证明不含致病性传播因素，因此所有的东西都因被看作是具强传染性的而需做好常规的安全预防措施。（禁止吞入或吸入）。
- 不要使用包装袋已破的 SPR 管。
- 不要使用明显可见包装破损的 SPRs(铝箔或塑料损坏)。
- 不要使用超出有效期的试剂。
- 不同批号试剂请勿混合使用。
- 试剂中含叠氮钠，该物质可与铅或铜管道反应形成爆炸性金属叠氮物。如果含叠氮钠的液体在这样的管道系统中处理，要用大量的水冲洗以避免形成金属叠氮物。
- 加有底物的比色杯含有刺激性试剂（乙醇氨），参照以上的标记“R”和“S”。
- 试剂盒的所有试剂均为潜在生物危险材料。因此，通过可接受的方法来处理所有使用过的试剂和其它污染材料。

- 常规清洁和清洗 Read kube 仪器，参阅 Read kube 操作手册有关步骤。

### 保存

- Read kube ECO 试剂盒存于 2-8 $^{\circ}$ C。
- 勿冷冻试剂。
- 使用后余下的试剂放回 2-8 $^{\circ}$ C。
- 打开试剂盒后，SPR 包装袋应密封完好，无破损，否则请不要使用 SPR。
- 取出密封袋内所需 SPR，其余 SPR 应封好包装，并放回 2-8 $^{\circ}$ C，有利于试剂的稳定。
- 如果按照推荐的方法保存，所有试剂在有效期内保持稳定。

### 标本制备

大肠埃希菌 O157:H7 是 3T(\*)细菌的一种。处理标本时需依照规定做好预防措施。

我们推荐下面的方法：

将增菌肉汤放置室温 18-25 $^{\circ}$ C，并预温至 41 $^{\circ}$ C。

### 使用说明

详细的说明参见 Read kube 操作手册

### 输入 MLE 卡信息

每一个新试剂盒在使用之前，首先按照要使用试剂盒中的 MLE 卡向仪器输入试剂规格（或出厂的校正曲线数据），否则方法将无法运行。每一盒试剂只需输入一次。可用 MLE 卡自动输入或手动输入信息。

### 校正

每一个新试剂盒在输入 MLE 卡信息之后，需使用试剂盒内的校正液进行校正，以后每 14 天进行一次校正。此项操作可以提供仪器特定的校正曲线，对于在保存期限内可能出现的小的分析信号偏移可以进行补偿。

校正液 S1 在同一次测试中必须做**双份**（详见 Read kube 操作手册）。校正值必须在设定的 RFV(相对荧光值)值之

## 操作步骤

1. 将所需试剂取出,使其恢复至室温(至少 30 分钟)。
2. 每个样本使用一条“ECO”试剂条及一个“ECO”SPR 管,先必须做好质控和校正。**确保取出试剂后,将剩余的 SPRs 的袋子重新密封好。**
3. 输入所需的信息以便建立 work list,键入“ECO”至检测编号,再输入将要检测的实验号。标准 S1 必须在 work list 的首位并做**双份**,随后是 C1 和 C2。**注:**测定标准时,键入“S”。更多说明参见操作手册。
4. **使用之前彻底混匀标准、质控及灭活的样本。准确吸取 500ul 以确保测试的正确性。**
5. 吸取  $500 \pm 50 \mu\text{l}$  的质控及灭活的样本至 ECO 试剂条样本孔的中央。**有必要在上仪器之前先将增菌肉汤  $95-100^{\circ}\text{C}$  煮沸  $15 \pm 1$  分钟,并让其冷却至室温。**
6. 依屏幕所示、将 SPR 和试剂条放入仪器的相应位置。核对位置以确保 SPR 上 3 个字母编码的颜色标记与试剂条相符。
7. 根据操作手册开始检测步骤。所有分析过程都由仪器自动完成。整个过程约需 45 分钟。
8. 检测完成之后,拿走 SPRs 及试剂条。
9. 所有用过的 SPRs 和试剂条丢弃至适当的容器。

## 结果及解释

检测完成之后,结果由计算机自动分析。每份样本有 2 个荧光读数。第一个数值表示 SPR 未加入底物时,容器和底物的本底,第二个读数表示 SPR 内面的酶复合物与底物反应后的结果,该数值减去本底后则为相对荧光值(RFV)。计算过程列于结果报告中。

每一样本的 RFV 值由 Read kube 按以下公式计算:

$$\text{检测值} = \text{样品 RFV} / \text{标准 RFV}$$

下表为阈值及结果解释:

### 阈值和结果解释

实验结果阈值	解释
< 0.10	阴性
$\geq 0.10$	阳性

打印的报告内容包括实验类型,标本号、日期和时间,批号和有效期,每个样品的 RFV 值、实验数据和结果解释。

实验数值低于下限提示不能检出样品含有 O157H7 抗原抗原,或所含的量低于最低检测限度。

内,否则,需重新校正。

实验数值大于或等于上限则为阳性样本。阳性结果必须做确认,参见“阳性结果确认部分”。

本底数值超过预期的分界值(提示有少量底物污染)时,结果不能采用,可用原标本重复试验或重做 S1,C1,C2。若某批试剂条未做校正则也会出现无效结果。对此,可用相同批号的试剂条做双份标准,结果可根据新储存的标准重新计算。详见 Read kube 操作手册。

## 质量控制

每盒试剂盒中都有阳性和阴性质控。每批新的试剂盒均应使用阳性和阴性对照进行检测,以证明运输和储存过程未影响其性能。

每次校正时必须测定对照。对阳性和阴性对照分别标以 C1 和 C2,仪器会自动识别。提供的对准品可直接使用,但用前需充分混合再加入试剂条的样本孔。

阳性对照数值范围在 MLE 卡上。如果质控值偏离期望值则结果则无效。

**注:**如果标准品数值超过范围,检测值可根据另一个标准重新计算。详见 Read kube 操作手册。

**注:**对用户来说都有责任依据当地认同的规定进行质量控制。