

# READ KUBE 弯曲菌 (CAM)

仅适用于实验室

## 应用范围

READ KUBE 弯曲菌 (CAM) 分析, 采用 Vitek 免疫诊断分析系统 (READ KUBE) 做为自动定性酶联荧光免疫分析 (ELFA) 方法, 增菌后对食品中的弯曲菌进行特异性检测

## 前言

弯曲菌为微需氧、弯曲样的革兰氏阴性菌, 公认是肠道疾病的主要病原。虽然空肠弯曲菌占美国所报道弯曲菌 99% 以上, 但大肠弯曲菌和其它种以及许多变种也在近 5 年被频繁报道<sup>(1)</sup>。

每年 70% 的弯曲菌相关疾病是由食用未经处理的水、生的和未消毒的奶和奶制品、未做熟的肉、禽<sup>(2)</sup>, 海鲜或加工及制作过程受污染的食品所致, 一周后出现症状包括水便样, 常常伴有血性腹泻、腹痛及发热, 一周后消失。空肠及大肠弯曲菌正常情况下不引起侵袭性感染。但在其它病原菌如沙门氏菌和志贺氏菌存在或是免疫系统受损的患者易引发感染<sup>(4, 5)</sup>。为此可引起败血症、腹膜炎、脑膜炎、流产、活动性关节炎或急性神经肌肉病, 称之为 Guillain-Barre 综合症<sup>(6)</sup>。

由于需要微需氧环境, 因此传统微生物方法<sup>(5)</sup>对弯曲菌的培养较为困难。

READ KUBE CAM 试验就是一种对弯曲菌快速过筛方法。可在 2 天内检出致病性的大肠弯曲菌、空肠弯曲菌和 Iari 弯曲菌。

## 检测原理

READ KUBE 弯曲菌分析是一种用自动化 READ KUBE 仪器进行的酶联荧光免疫分析 (ELFA)。

固相容器 (SPR) 是一个类似于加样头的一次性装置, 起固相及加样器的作用。SPR 用抗弯曲菌抗体包被。READ KUBE 弯曲菌分析系统的结构可防止与 SPR 的非特异性反应。实验所需试剂均封闭在试剂条里。

READ KUBE 系统自动完成全部实验程序。

将煮沸过的增菌肉汤加于试剂条上, 在特定时间内样本在 SPR 内、外反复循环, 样本中的弯曲菌抗原与 SPR 内面包被弯曲菌抗体结合, 未结合的样本则被洗去。标记有碱性磷酸酶抗体也在 SPR 内外循环, 并与固定于 SPR 内面的弯曲菌抗原结合, 最后洗去未结合抗体标记物。

在 SPR 中加入荧光底物, 磷酸 4-甲基伞型物。在 SPR 内面的酶催化下底物分解为荧光产物 4-甲基伞形酮。通过 READ KUBE 的光扫描仪测定荧光强度。

实验完成时, 计算机自动分析结果, 得出检测值并打印出每份样品的结果报告。

## READ KUBE 弯曲菌试剂盒组成 (30 人份/每盒):

30 个 CAM 试剂条	CAM 试剂条 (参考下表) 是一个有 10 个孔的聚丙烯条。分别以箔封和纸签覆盖。第一孔加入样品, 最后一孔是荧光测定用的比色杯, 中间 8 孔含有实验用各种试剂。
60 个 CAM SPR	CAM SPR 的内面制造时已用抗弯曲菌抗体包被。
1 瓶标准液 (1×6ml)	纯化, 灭活的弯曲菌抗原, 含 1g/1 叠氮钠和蛋白稳定剂。
一瓶阳性对照 (6ml)	纯化, 灭活的弯曲菌抗原, 含 1g/1 叠氮钠和蛋白稳定剂, 瓶签上有对照范围。
一瓶阴性对照 (6ml)	TRIS 缓冲液 (TBS) - Tween, pH7.6, 含 1g/1 叠氮钠。

## 弯曲菌试剂条说明

孔	试剂
1	样本孔：此孔加 0.5ml 煮沸过的增菌肉汤。
2	前洗涤液 (0.4ml) :含 1g/l 叠氮钠的 TBS-吐温, PH7.6
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	洗涤液 (0.6ml) :含 1g/l 叠氮钠的 TBS-吐温, pH7.6
6	酶标记物 (0.4ml) :用碱性磷酸酶标记 IgG, 含 1g/l 叠氮钠。
10	含底物 (0.3ml) 的比色杯: 0.6mmol/l 磷酸 4-甲基伞形物, 含有 1g/l 叠氮钠。

实验名称、批号、失效期均在 CAM 试剂条的条形码上。

### 未提供但应具备的设备

- 最小加样量为 0.5ml 的加样器。
- 水浴箱 (100℃) 或相当装置。

### 注意事项

1. 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。
2. 试剂中含 1g/l 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。
3. 常规清洁和消毒 READ KUBE 仪器, 参阅 READ KUBE 操作手册有关步骤。

### 保存

- READ KUBE CAM 试剂盒存于 2-8℃。
- 切勿冷冻试剂。
- 未用的试剂放回 2-8℃。
- 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。从贮存盒内取出 SPR 后余下的应再封好, 这样可使试剂保持稳定。
- 如果保存得好, 所有试剂在有效期内稳定性不变。勿用超过有效期的试剂。

### 标本制备

推荐使用下面的方法:

#### 欧洲:

1. 所有种类食品: 用无菌方法向 225ml 不含琼脂的 PRESTON 肉汤中加入 25 克 (25ml) 样本。用带滤器的消化袋消化或混匀, 并在微需氧环境中 42℃ 孵育 48±2 小时。
- ⇒ 之后, 取 1-2ml 增菌肉汤加入试管中, 在 100℃ 水

浴中加热 15 分钟。待试管冷至室温, 小心旋转以破碎块状物。取 0.5ml 加入试剂条样本孔。剩余增菌肉汤存于 4℃, 以备对 READ KUBE 弯曲菌阳性检测结果进行重复。

确认可疑阳性应用 ISO 10272 标准方法, 采用选择性培养基。

**注:** 我们推荐方法中的误差应在应用前确认。

#### 美国:

1. 肉洗液: 用 100ml BOLTON 肉汤洗鲜肉 1 分钟。37℃ 培养肉洗液 4 小时, 然后再 42℃ 培养 20 小时。
2. 其他类型食品: 用无菌方法向 225ml BOLTON 肉汤中加入 25 克 (25ml) 样本, 并放在一个有过滤袋的消化器内。按 BAM 说明消化或混匀。37℃ 培养 6 小时, 然后再 42℃ 培养 42 小时。

⇒ 之后, 取 1-2ml 增菌肉汤加入试管中, 在 100℃ 水浴中加热 15 分钟。待试管冷至室温, 取 0.5ml 加入 CAM 试剂条样本孔, 剩余增菌肉汤存于 4℃, 以便对 READ KUBE 弯曲菌阳性检测结果重复用。

**注:** 我们推荐方法中的误差应在应用前确认。

## 检测方法

**注意：**每批试剂均需做标准。该结果存于计算机并自动用于检测分析，标准也可以与每次 CAM Work List 一起做。或用替代方法，即用计算机内贮存的标准结果，最多可用两周。详见 Read kube 操作手册。

1. 冰箱中取出 READ KUBE 大肠杆菌 0157 试剂盒并使其恢复到室温（约 30 分钟）。
2. 从试剂盒中取出所需试剂，并将为用的试剂放回 2-8℃ 贮存。
3. 在 CAM 试剂条所给的空白处，标上样本号。
4. 输入所需的信息以便建立 work list. 键入“CAM”至检测编号，再输入将要检测的实验号。如标准也将测定，则键入“S”（对于 mini 型 Read kube, 先输入“S”然后输“1”）。标准可在 work list 的任何位置运行。
5. 准确吸取 0.5 毫升标准液，对照液或样本加入 CAM 试剂条样品孔中央。
6. 根据 work list 所示，将 CAM 试剂条和 CAM SPR 放入 READ KUBE 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 READ KUBE 操作手册开始分析步骤。检测约需 70 分钟。  
注：此检测方法与 LMO 相同，但与其它检测方法（LIS、SLM、ECO、SET）不同。因此 LMO2 不能与这些检测试剂在同一区域检测。
8. 所有用过的 SPRs 和试条丢弃与适当的容器。

## 质量控制

试剂盒附有阳性和阴性对照以保证结果的有效性。每批新的试剂盒均应用阴性和阳性对照进行检测，以证明运输和贮存过程未影响其性能。根据自己实验室的常规程序检测对照品。提供的对照品可直接使用，但用前需充分混合再直接加入试剂条的样品孔。

阳性对照数值应在瓶签所示范围之内。如所测数值超过此范围，样本结果不能报告。

**注意：**如果标准超过范围，检测值可根据另一个标准重新计算。详见 READ KUBE 操作手册。

## 结果

每份样品有两个荧光读数，第一个数值表示 SPR 未加入底物时，容器和底物的本底。第二个数值则表示 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）。检测值则是由每份样本的 RVF 与标准对照相比得出的。

从样本和对照得出的检测值再与计算机存储的阈值比较。

下表所示为阈值及对应结果。

### 阈值和结果解释

实验结果阈值	解释
< 0.10	阴性
≥ 0.10	阳性

打印报告内容包括试验类型、样本号、日期和时间、试剂盒批号及有效期、每个样品的 RFV、检测值和相应结果。检测值低于阈值下限表明不能检出样本中含有弯曲菌抗原。若大于（或等于）阈值上限则为阳性结果。阳性结果必须用标准培养方法对存于 4℃ 的增菌肉汤分离鉴定确认。

本底数值超过预测的分界值（提示有底物污染）时，结果无效。对此可用原标本重新检测。

如果检测样本的试剂条没有标准，结果亦为无效。对此，可用相同批号的 CAM 试剂条座双份标准，结果可根据新存储的标准重新计算。详见 READ KUBE 操作手册。

## 注意事项

1. 勿将不同批号的试剂或一次性装置混用。
2. 用前应将标准液、对照液及样品充分混合，准确吸取 0.5ml 标准，以保证可重复性。
3. 样本处理或保存不当可导致错误结果。  
注意：加样前增菌必须在 100℃ 水浴中加热 15 分钟。
4. 根据各个实验室的经验，样品增菌方法可以改变。

## 特性

可检测空肠弯曲菌、大肠弯曲菌和 lari 弯曲菌。