

## Read kube<sup>UP</sup>沙门氏菌 (SPT)

仅供实验室用

Read kube<sup>UP</sup>沙门氏菌 (SPT) 测试，在免疫分析系统 Read kube 仪器上，利用特异噬菌体捕获技术，对人与动物食品、环境样本中沙门氏菌进行自动定性检测。

### 概述

沙门氏菌是引起食物中毒的主要病原菌之一。用于食品中沙门氏菌检测的标准培养方法耗时较长，阴性结果的确认需要五天的时间 (1)。酶免疫分析筛选技术可使该实验简化并缩短时间。

沙门氏菌抗原复杂，通过对菌体 (O) 脂多糖和鞭毛 (H) 蛋白抗原的鉴别可区分为 2400 个血清型 (2)。

Read kube SPT 试剂是一种基于重组噬菌体尾丝蛋白的方法，检测人与动物食品及环境样品中沙门氏菌。包括有动力或无动力的沙门氏菌。

### 实验原理

Read kube SPT 测试是在 Read kube 仪器上应用 ELFA 技术，自动检测沙门氏菌的酶联荧光免疫分析方法 (ELFA) (参见 Read kube 操作手册)。

固相容器 (SPR) 是类似于加样头的一次性装置，用作固相及加样器之用。SPR 用抗沙门氏菌抗体包被。实验所需试剂均封闭在试剂条内。

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，样品将在 SPR 内定时循环，样品中的沙门氏菌抗原与包被在 SPR 内壁的沙门氏菌单克隆抗体结合，未结合的样本则被洗去。抗体-碱性磷酸酶复合物在 SPR 内外循环并与 SPR 内壁捕获的沙门氏菌抗原结合，最后洗去未结合复合物。

SPR 中加入荧光底物，4-甲基-香豆素-磷酸酯，SPR 壁上存留的酶将催化底物分解为荧光产物 4-甲基-伞形酮。

Read kube 的光扫描仪在 450nm 处自动测定荧光强度。实验结束时，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。检测值与阈值相比较并给出解释 (阳性，阴性)

## Read kube 沙门氏菌试剂盒的组成 (60 人份)

60 个 SPT 试剂条	STR	成品试剂
60 个 SPT SPR*s	SPR	成品试剂 成品试剂 内壁包被重组噬菌体尾丝蛋白的 SPR管
SPT 标准品 (1×6ml) S1	S1	成品试剂 纯化并灭活的膜提取物+防腐剂+蛋白稳定剂 MLE卡上: 标准S1RFV值范围表示可信区间范围
SPT 阳性质控 (1×6ml) C1	C1	成品试剂 纯化并灭活的膜提取物+防腐剂+蛋白稳定剂
阴性质控 (1× 6ml) C2	C2	成品试剂 TRIS缓冲盐(TBS) (150mmol/l)-TwenpH7.6防腐剂 MLE卡上: 质控 C2值范围表示最大可接受值
1 张 MLE (Master Lot Entry)		包含校正测试所需的工厂校正数据。

## SPR

SPR®在生产时以重组噬菌体尾丝蛋白包被。每一个 SPR®上均标有：“SPT”。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

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 用于加入样本。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。

## 沙门氏菌试剂条说明

孔	试剂
1	样本孔: 该孔加 0.5ml 增菌肉汤、标准或对照。
2	前洗涤液(400 μl): pH7.8 缓冲液 + 防腐剂
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	洗涤液(600 μl): TRIS (/) NaCl (150mol/l) (/) TwenpH7.6+防腐剂。
6	酶标记物(400 μl): 碱性磷酸酶标记的沙门氏菌抗体+防腐剂。
10	含底物的比色杯(300μl): 磷酸 4-甲基-伞形物(0.6mol/l)+ 二乙醇氨 (DEA) (0.62 mol/l 或 6.6%, pH 9.2) + 防腐剂。

## \*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。
- 如果需要更多信息，请参照 MSDA

## 试剂盒未提供但应具备的设备

- Read kube 仪器
- 移液管或任意体积的微量移液管。
- 均质仪
- 带滤过装置的均质袋

## 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。
- 遵从好的实验室的操作规范。
- 试剂盒包含动物来源的相关产品，未被证明不含致病性传播因素，因此所有的东西都因被视为具有潜在的传染性，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SPRs。
- 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（第 10 孔）含有刺激性试剂（6.6% 的二乙醇氨）。
- 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

### 保存

- Read kube SPT 试剂盒存于 2-8℃。
- 勿冷冻试剂。
- 储存所有未使用的试剂在 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。
- 从密封袋内取出所需 SPR，其余 SPR 应封好包装，并放回 2-8℃，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。

### 样本制备

推荐以下流程。

使用前，增菌肉汤恢复至室温（18-25℃）。

对所有人、动物食品（除了生奶酪）和环境样本的标准流程

- 带过滤装置的均质袋：

- 无菌操作取 ×g(×ml) 样本

- 加入 9×ml 缓冲蛋白胨水。

注 1：对于可可和包含可可的产品不要添加亮绿

注 2：对于酸性产品，不推荐加入颜色指示剂

注 3：对于环境样本，收集器应该首先要湿润（例如用缓冲蛋白胨水）含适当的中和剂（如软磷脂硫代硫酸钠中和剂）。收集后，放在一个有缓冲蛋白胨水的适当体积的容器中。（例如，棉拭子放在 10ml 中，样本垫放在 90ml 中）

注 4：实验样本不要超过 2.5 克

- 用均质仪混合器均质。
- 加入 Y ml 的沙门氏菌添加剂
- 按下列计算

$$Y (ml) = \frac{\text{缓冲蛋白胨水} (ml)}{25 (ml)}$$

25 (ml)

举例：

- 25ml 缓冲蛋白胨水中加入 1 ml

- 90ml 缓冲蛋白胨水中加入 40ul

注 1：每次使用之前，使用涡旋震荡器将添加剂混均

注 2 如果在缓冲蛋白胨水中 1/10 稀释液应该使用微生物指示剂，推荐遵照 IS07218 (3)，从中取一部样本进行称重，而后加入添加剂

注 3：如果同一实验的样本没有使用细菌指示剂，添加剂可以直接加入缓冲蛋白胨水中

- 用手混匀均质袋内的混和物。
- 41.5±1℃ 培养 18-24 小时。
- 均质袋内混合物孵育之后

如果使用 Read kube® Head and Go

吸取 0.5ml 增菌肉汤至样本孔。加热 5 分钟（参见 Read kube® 用户手册）。取下试条并冷却 10 分钟。

注：对于蛋类和禽类样本，不能使用 Read kube® 如果使用水浴箱，吸取 1-2ml 的增菌肉汤至试管，封口，95-100℃ 加热 5 分钟。冷却试管，混匀肉汤，吸取

0.5ml 至样本孔

- Read kube® 进行测试。
- 确认阳性样本

奶制品样本流程（包括生奶酪）

- 在带过滤装置的均质袋，无菌操作

- 取 ×g (或 ×ml) 样本

- 9×ml 缓冲蛋白胨水（增菌肉汤）

对于某些材料，推荐下列特殊准备程序，技术描述见 ENISO687-5 (8)，并添加沙门氏菌提阿加剂到增菌肉汤中

注 1：酸性样品，不建议添加颜色指示剂

注 2：检测样本不要超过 25g。

- 用均质器进行混合。
- 加入 Y ml 沙门氏菌添加剂
- 根据下列计算：

$$Y (ml) = \frac{\text{缓冲蛋白胨水} (ml)}{25 (ml)}$$

举例：

- 25ml 缓冲蛋白胨水中加入 1 ml

注 1：每次使用之前，使用涡旋震荡器将添加剂混均 注 2：如果缓冲蛋白胨水中 1/10 稀释液，应该使用微生物指示剂，推荐遵照 IS07218 (3)，从中取一部样本进行称重，而后加入添加剂

注 3：如果同一实验的样本没有使用细菌指示剂，添加剂可以直接加入缓冲蛋白胨水中

用手混匀均质袋内的混和物。

41.5±1℃ 孵育 18-24 小时。

孵育后，混匀吸取 1ml 增菌肉汤至已在 41.5±1℃ 预热的 S×2 肉汤中（增菌肉汤）

41.5±1℃ 孵育 6-8 小时。

- 孵育后，将增菌肉汤混匀。

#### 阳性结果的确认

所有 Read kube® SPT的阳性结果都必须确认。阳性结果的确认应该用未加热的增菌肉汤进

- 在一个选择性琼脂上分离
- 按下列产品说明书介绍的琼脂上孵育
- 按照传统实验挑选 1-5个典型菌落进行确认。确认方法应该依照 CEN或 ISO标准方法 中的描述（包括纯化步骤）（4）

如果结果有差异（Read kube 阳性，而参考方法不能确认），则实验室必须采取必须的步骤保证实验的正确性。

我们推荐以下方法，另外的流程

- 移取 0.1ml 增菌肉汤至 10ml S×2 肉汤中
- 41.5±1℃孵育 16-24 小时之后，接种选择性培养基进行分离
- 按照传统实验挑选 1-5个典型菌落进行确认。确认方法应该依照 CEN或 ISO标准方法 中的描述

#### 使用说明

完整的说明书，请参见使用手册

#### Read kube®PTC方案数据输入

第一次使用本试验时，在读取 MLE卡之前，用 Read kube®或Read kube®条形码阅读器扫描编码（说明书的底部的条形码），以进行 Read kube®仪器软件更新。这些数据只在第一次使用本试验时进行读取。

#### 输入 MLE卡信息

注：第一次使用本试验时，必须在读取 MLE卡之前输入 Read kube® PTC方案数据（说明书底部的条形码）。如果在 Read kube® PTC方案数据之前已经读取了 MLE卡，需要重新输入 MLE卡信息。

每次使用新一批的试剂前，都必须使用每个试剂盒中的批号录入（MLE）卡（规格表）将规格（或厂家主要校正曲线数据）输入仪器。如果在开始测试前，没有进行这一操作，则仪器无法打印结果。每一批次只需输入一次批号数据。

可以使用 MLE卡自动输入数据或手动输入。

#### 校正

每次打开新一批的试剂都必须在输入批号数据后使用试剂盒中提供的标准进行校正。此后，应该每 14天进行一次校正。这一操作提供仪器特有的校正曲线，并对在保存期限内可能出现的微小的分析信号偏移可以进行补偿。

校正液 S1在同一测试中只需做双份（详见 Read kube®操作手册）。校正值必须在设定的 RFV(相对荧光值)值之内，否则，需重新校正。

#### 检测步骤

1. 所需试剂取出，使其恢复至室温（至少30分钟）。
2. 每个测试样本、对照或标准使用一个，在取出所需的 SPR®后，重新密封保存袋。
3. 在仪器上键入或选择。
4. 将增菌肉汤混匀。

如果使用 Read kube®，吸 0.5ml增菌肉汤至试剂条上的样本孔中。加热。移开试剂条，使其冷却 10分钟。

如果使用水浴锅，将增菌肉汤在 95-10℃加热。使试管冷却。将加热的肉汤混匀或不混匀，吸取 0.5ml至 Read kube®试剂条上的样本孔中。

5. 如果必要，使用涡旋振荡器混匀标准液和质控液，然后分装 50 u1至样本孔中。

注：勿加热标准品和质控

6. 将 SPR®和试剂条放入仪器的相应位置。核对以确保 SPR®上项目代码的颜色标记与试剂条相符。
7. 按操作手册中的说明开始测试。所有的检测步骤都由仪器自动完成。约在 50分钟内获得结果。
8. 在完成测试后，将 SPR®和试剂条从仪器内取出。
9. 根据相应的当地法规，将 SPR®和试剂条丢弃在恰当的生物危害品容器内。

#### 结果和解释

一旦测试结束，仪器将自动进行结果分析。

对于每个测试样本，试剂条读数比色杯内的荧光信号都被测量两次。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：检测值=样品 RFV/标准 RFV

#### 阈值和结果解释

测试值阈值	解释
<0.25	阴性
0.25	阳性

打印出的报告包括：

- 测试类型，
- 样本编号，
- 日期与时间，
- 试剂盒批号与有效期，
- 每个样本的 RFV，测试值和判定结果。

测试值低于阈值的结果表示样本中不含沙门氏菌抗原或所含的沙门氏菌抗原浓度低于检测限。

测试值大于或等于阈值的结果表示样本被沙门氏菌污染。 在这种情况下，参考：：阳性结果的确认部分。

#### 无效结果：

- 背景读数高于预设的临界值（说明底物污染）。在这种情况下，用加热的肉汤或有关试剂重复测试。
- 如果该样本条上所示批号没有标准。

在这种情况下，使用与无效样本测试相同批号的试剂条中的标准液进行重复测定。 然后用新保存的标准重新计算样本测定结果。 更多信息参见 Read kube®用户手册。

#### 质量控制

每盒 Read kube®SPT试剂盒中都含有一个阳性质控和一个阴性质控。

质控必须在打开新的试剂盒后立即进行测定，以确保试剂性能未改变。

每次校正都应使用这些质控进行检查。 只有当质控被设置为 C1和 C2时，仪器才能检查质控值。

如果对照值偏离预期值，结果将无法通过验证。