

# Read kube<sup>®</sup> 李斯特属 (LSX)

仅供实验室用

Read kube 李斯特属 (LSX) 试剂盒是用免疫系统 (Read kube) 对食品中的李斯特菌属进行自动定性酶联荧光分析 (ELFA)。

## 概述

李斯特菌现分为6个种。该菌的特点为不形成芽孢，短小、有动力的革兰阳性杆菌。触酶阳性，氧化酶阴性，水解七叶苷，发酵葡萄糖不产气。李斯特氏菌可在较宽的温度和PH范围内生长并耐受高浓度氯化钠<sup>[1, 2]</sup>。

李斯特氏菌广泛存在于自然界，可以致病或不致病。目前已从未加工或加工食品（包括乳制品、肉类、蔬菜、水产品）及环境中尤其是食品加工过程中分离出李斯特菌。在人类李斯特氏菌可能引起流产、脑膜炎、败血症和脑炎。高危人群包括孕妇、新生儿、免疫低下者及老年人。

传统分析方法包括各种增菌方法，为获得最后结果，必须经过一些烦琐、费力操作及长时间培养。

## 实验原理

Read kube<sup>®</sup> 李斯特氏菌分析是用自动化 Read kube 设备进行的酶联免疫荧光分析 (ELFA)。

Read kube LSX 试剂盒组成(60人份/盒)：

60 LSX 试剂条	成品试剂，参见下表
60 LSX SPRs	LSX SPR 的内壁已包被鼠抗李斯特单克隆鞭毛抗体。
LSX 标准液 (1×6 ml)	纯化，灭活的李斯特菌抗原，含防腐剂和蛋白稳定剂。 MLE 卡上以“标准(S1)RFV 值范围”表示可信区间范围。
LSX 阳性对照 (1×6 ml)	纯化，灭活的李斯特菌抗原，含防腐剂和蛋白稳定剂 指示=MLE 卡上“质控 C1 值范围”栏下表示荧光值的可信区间范围
LSX 阴性对照 (1×6 ml)	TRIS 缓冲液 - NaCl (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 +防腐剂。 MLE 卡上“质控 C2 值范围”栏下指出最大可接受值。
1 张 MLE 卡片	包含校正测试所需的工厂校正数据。

## 说明

### SPR

SPR 在生产时以抗李斯特菌鞭毛抗体包被。每一 SPR 上均标有“LSX”。从包装袋中取出 SPR 后要及时封闭包装袋。

固相容器 (SPR) 是类似于加样头的一次性装置，用作固相及加样之用。SPR 用抗李斯特氏菌抗体包被。实验所需试剂均封闭在试剂条里。

Read kube 系统自动完成全部的实验程序。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，样品中的李斯特氏菌抗原与包被在 SPR 管内侧的李斯特氏菌单克隆抗体结合，未结合的样本则被洗去。抗体-碱性磷酸酶复合物也在 SPR 内、外循环并与 SPR 壁上的李斯特菌抗原结合，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）。

### 试剂条

包含 10 个以铝箔封的孔，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，最后一孔是荧光测度用比色杯。中间孔含各种试剂。

**LSX 试剂条说明:**

孔	试剂
1	样本孔: 该孔加 500 $\mu$ l 煮沸过的增菌肉汤、标准或对照。
2	前洗涤液(400 $\mu$ l): 缓冲盐 - Tween pH 7.6 + 防腐剂。
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	洗涤液(600 $\mu$ l): 缓冲盐 - Tween pH 7.6 + 防腐剂。
6	酶结合物(400 $\mu$ l): 碱性磷酸酶标记多克隆抗李斯特菌抗体+防腐剂。
10	含底物的比色杯(300 $\mu$ l): 4-甲基-伞形磷酸盐+ 二乙醇氨 (DEA) (0.62 mol/l or 6.6%, pH 9.2) + 防腐剂。

实验名称、批号和有效期印在试剂条的条形码上。

**\*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

**试剂盒未提供但应具备的设备**

- 最小加样量为 500  $\mu$ l 的加样器。
- 水浴箱(100°C)或相当设备。
- 带滤器的消化袋。
- LX 肉汤 225 ml
- LX 肉汤 3 公升袋包装
- LX 肉汤 6 ml
- PALCAM 平板
- Oxford 平板

- 试剂盒打开之后检查 SPR 是否包装完整及无破损, 如若不是勿用。
- 从包装袋内取出 SPR 后应再封好包装袋放回 2-8°C, 这可使试剂保持稳定。
- 如果保存得好, 所有试剂在有效期内稳定性不变。勿用超过失效期的试剂。

**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 试剂盒存于 2-8°C。
- 切勿冷冻试剂。
- 没用的试剂放回 2-8°C。

**标本制备**

将前增菌肉汤放置室温 (18-25°C), 同时在 30 $\pm$ 1°C 条件下预热增菌肉汤。

**使用说明书**

详细的说明书参加 Read kube 操作手册。

**输入 MLE 卡信息**

每一个新试剂盒使用之前, 首先要使用试剂盒中的 MLE 卡向仪器 (Read kube 或 -Read kube) 输入试剂规格 (或出厂的校正曲线数据), 否则仪器将无法运行。每一盒试剂只需输入一次。可选择自动输入或手工输入 MLE 卡信息。

**校正**

每一盒新的试剂盒在输入 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) 值之内, 否则, 需重新校正。

**检测步骤**

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“LSX”试剂条及一个“LSX”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“LSX”至检测编号, 再输入将要检测的实验号。标准必须在 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。

5. **准确吸取 500ul 标准以确保精确的校正。**
6. 吸取 **500 ± 50 µl** 的质控及灭活的样本至 LSX 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°C 煮沸 15±1 分钟，并让其冷却至室温。**
7. 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。
8. 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 70 分钟。
9. 检测完成之后，拿走 SPRs 及试剂条。
10. 所有用过的 SPRs 和试剂条丢弃至适当的容器。

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。

## 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：

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

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
< 0.1	阴性
≥ 0.1	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李斯特氏菌抗原，或所含的量低于最低检测限度。

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，以证明运输和保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。