

Read kube®快速单核细胞增生李斯特菌 (LMX)

仅供实验室用

Read kube 快速单核细胞增多李斯特菌 (LMX) 分析是在 Read kube 上采用酶联荧光免疫分析(ELFA)方法, 对人类食品和环境样本的单核细胞增多李斯特菌进行特异性检测。

概述

李斯特氏菌属现分为 6 个种, 包括单核细胞增生李斯特菌、英诺克李斯特菌、绵羊李斯特、西尔李斯特、威尔斯李斯特菌及格氏李斯特 (1)。

单核细胞增生李斯特菌是唯一对人致病的菌。人类李斯特氏菌病包括脑炎、脑膜炎、败血症和流产。高危人群包括孕妇、新生儿、免疫损伤患者及老年人 (2, 3)。单核细胞增多李斯特菌在环境中分布广泛, 对未加工原料、部分加工食品及发酵食品具有潜在危害。

Read kube 快速单核细胞增生李斯特菌 (LMX) 试验是一种快速筛选试验, 将取代费时的传统方法, 可直接筛选人类食品 (如肉类、乳制品、海产品和蔬菜) 或环境样本中的单核细胞增生李斯特菌。

原理

Read kube 快速单核细胞增生李斯特菌是一种采用自动化 Read kube 系统 (参见用户手册) 作为酶联荧光免疫分析 (ELFA) 方法, 对李斯特菌抗原进行检测的酶联免疫方法。

固相容器 (SPR®) 是一个类似于加样头的一次性装置, 起加样器的作用。SPR®内壁用单核细胞增生李斯特菌单克隆抗体包被。各种测试试剂为即用型, 均预先放置在密封的试剂条内。

Read kube 系统自动完成全部实验程序。反应底物在 SPR®内外循环数次。

将部分增菌肉汤加于试剂条上, 样本中的单增李斯特菌抗原与 SPR®内面包被的抗单增李斯特菌抗体结合, 未结合的样本则被洗去。与酶结合的的抗体也在 SPR®内外循环, 并与固定于 SPR 内壁的单增李斯特菌抗原结合。

测生物素的存在。酶复合物由孵育的碱性磷酸酶标记的二抗检测。

最后洗去未结合的酶复合物。

最后在 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)。

在 450nm 处测定荧光强度。试验完成, 仪器自动分析结果并生成每个样本的测试值, 将测试值与标准进行比较 (阈值) 并解释结果 (阳性或阴性)。

包装(60 人份/盒)

60 LMX 试剂条	STR	成品试剂
60 LMX SPR®s	SPR	成品试剂。 SPR®s 内部包被抗单增李斯特菌特异性抗原包被。
LMX 标准 (1 x 6 ml)	S1	成品试剂 纯化并已灭活的单增李斯特菌抗原+ 防腐剂 + 蛋白稳定剂 MLE 卡上“S1 值范围”栏下表示荧光值的可信区间范围
LMX 阳性质控 (1 x 3 ml)	C1	成品试剂 纯化并已灭活的单增李斯特菌抗原+ 防腐剂 + 蛋白稳定剂 MLE 卡上“质控 C1(+)值范围”栏下表示荧光值的可信区间
阴性质控 (1 x 6 ml)	C2	成品试剂 TRIS 缓冲盐水 (TBS) (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。
1 份说明书		

SPR®

SPR®内壁包被抗单增李斯特菌特异抗原的抗体。
每一个 SPR®上均标有“LMX”。从包装袋中取出所需数量的 SPR®后要及时封闭包装袋。

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。第一层孔上的铝箔需穿孔，每个试剂条的最后一孔是荧光测度用比色杯。中间孔含测试用的各种试剂。

LMX 试剂条说明

孔	试剂
1	样本孔：此孔加入 250ul 增菌肉汤、标准品或质控
2	前洗涤液(600 µl)：TRIS 缓冲盐水(TBS)(150 mmol/l) – Triton×100 pH 7.6 + 防腐剂
3 - 4 - 7 - 8 - 9	洗涤液(600 µl)：TRIS 缓冲盐水(150 mmol/l) – 吐温 pH 7.6 +防腐剂
5	酶结合物(400 µl)：酶标记抗单增李斯特菌抗体+防腐剂
6	碱性磷酸酶标记的二抗(400ul)
10	含底物的比色杯(300 µl)：4-甲基-伞形磷酸盐(0.6 mmol/l)+ 二乙醇氨*(DEA) (0.62 mol/l or 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。

更多信息，请索取材料数据表（MSDS）。

未提供但需具备的试剂和材料

- 0.25ml 和 500 µl 加样枪
- 无粉一次性手套
- 均质搅拌器
- 带过滤装置的均质袋
- LMX 肉汤添加剂(LMX SUPP)
- LMX 肉汤
- LX 肉汤 10 ml 管装

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。
- 试剂盒内的产品来源于动物。源于动物及/或卫生情况的证明不能完全证明其中不含有传播性病原体，因此建议将所有产品视作具有潜在传染性并需做好常规的安全预防措施（禁止吞入或吸入）。
- 不要使用包装袋破损的 **SPR®**。
- 不要使用包装明显破损的 **STRs**(铝箔或塑料损坏)。
- 不要使用超出标签上有效期的试剂。
- 不同批号试剂请勿混合使用。
- 请使用无粉手套，据报道粉末可引起某些酶免疫检测结果不正确。
- 试剂中含有叠氮钠，该物质可与铅或铜管道反应形成爆炸性金属叠氮物。如果在管路系统中处理含叠氮钠的液体，要用大量的水冲洗以避免形成金属叠氮物。
- 孔中的培养基含有刺激性试剂(6.6%二乙醇氨)，参照以上的标记 **R** 和 **S**。
- 处理后的溢出物需用液体清洁剂和至少含 0.5% 次氯酸钠家用漂白液彻底清洗。参见使用手册中清洁仪器上或仪器中的溢出物一节。不要使用含有漂白剂成份的高压灭菌溶液。
- 定期清洁和消毒 **Read kube**(参阅 **Read kube** 使用手册)。
- 孕妇及年老体弱者要特别注意单核细胞增生李斯特菌。建议这些敏感人群不要接触单增李斯特菌。要特别注意，处置污染的材料前必须先高压灭菌。

保存

- 2-8℃下保存 **Read kube LMX** 试剂盒。
- 切勿冷冻试剂。
- 所有未使用过的试剂保存在 2-8℃。
- 试剂盒打开之后检查 **SPR®**包装是否完整且无破损，若不完整或有破损，请勿使用。**SPR®s** 的稳定性，使用后放入干燥剂再重新密封，保存温度保持 2-8℃。
- 如果按照推荐的方法保存试剂，所有试剂在标签所示有效期内稳定性不变。

样本准备

推荐以下方案。

增菌肉汤在使用之前需在 37±1℃ 预热。

人类食品（生奶酪制品除外）和环境标本的一般处理方案

- 采用无菌操作使用前将 500ul LMX 肉汤添加剂加入至在 37±1℃ 预热 225ml 的 LMX 肉汤瓶中。
 - 注 1:**每次使用前用涡旋振荡仪将添加剂均质。
 - 注 2:**按上述比例将 LMX 肉汤添加剂加入 LMX 肉汤中后可直接放置于均质袋中保存。
- 无菌操作将 9Xml 的 LMX 肉汤（已加入 LMX 肉汤添加剂）加到 X g(或 X ml)样品中。
 - 注 1:**收集环境标本的装置应先用含 10%中和剂（如卵磷脂-聚山梨醇酯-L 组氨酸-硫代硫酸钠混合物）的无菌稀释液（如缓冲蛋白胍水）湿润。采集完后，将该装置放入含添加剂的适量 LMX 肉汤中（如，将拭子放入 10ml 肉汤，药棉块放入 100ml 肉汤）。
 - 注 2:**待检测样本量不能超出 25g。
- 在带过滤装置的均质袋中混合样品。
- 在 37±1℃ 下孵育 27±1 小时。
- 孵育后将增菌肉汤混匀。若使用 **Read kube** 干式加热器，取 0.25ml 增菌肉汤至试剂条的样本孔内。加热 5±1 分钟（参照 **Read kube** 热地快使用指南），然后将试剂条取出冷却 10 分钟。如果使用水浴，取 1-2ml 增菌肉汤至试管内，密封试管。95-100℃ 加热 5±1 分钟后冷却试管。将煮沸的肉汤混匀，然后取 0.25ml 肉汤至 **Read kube** 试剂条的样本孔内。
- **Read kube** 试剂条上机检测。
 - 将未加热的增菌肉汤置于 2-8℃ 保存，以备确认实验之需。

注: 未加热的增菌肉汤在 **Read kube** 上机检测前可在 2-8℃ 保存 72 小时。上机检测前确认实验无论如何也得在孵育结束的 72 小时之内进行。

阳性结果确认

所有 **Read kube LMX** 阳性结果都必须确认。使用未加热的于 2-8℃ 保存的增菌肉汤进行确认试验，孵育末 72 小时之内必须着手开始确认试验。

- 取 1ml 未加热的 LMX 肉汤至 10ml LX 肉汤中。
- 在 37±1℃ 下孵育 22-26 小时后，转种至选择性琼脂上分离菌落。

使用说明

更多完整的说明请参见 **Read kube 用户手册**

输入 READ KUBE PTC 协议数据信息

当初次使用该试剂盒时，**在读 MLE 卡前**，首先要用 **Read kube** 条形码阅读器扫描代码（位于包装盒内说明书末端）。读码后 **Read kube PTC** 协议数据会传输到 **Read kube** 仪器软件中，以便于升级。只需在初次使用试剂盒时读取数据。

输入 MLE 卡信息

注：第一次检测前，必须在读取 MLE 卡之前输入 Read kube PTC 协议数据（条形码位于说明书末端）。如果在读取 Read kube PTC 协议数据之前就已经读取了 MLE 卡，则需重新输入 MLE 卡信息。使用新一批试剂前，首先将试剂盒中的 MLE 卡（规格表）上的规格输入到仪器中，否则仪器将无法打印结果。每一批试剂只需输入一次 MLE 卡数据。可以使用 MLE 卡自动输入或手动输入。

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 28 天进行一次校正。此项操作可以提供仪器特定的校正曲线，对于在质保期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“LMX”试剂条及一个“LMX”SPR[®]管，必须先做好质控和标准。**确保**取出试剂后，**将剩余的 SPR[®]s 的袋子重新密封好**。
3. 键入或选择仪器上的“LMX”来输入检测编号。标准液标记为“S1”并**做双份**，如果测试的是阳性质控，则标记为 C1。如果需要测试阴性质控，则标记为 C2。
4. 使用涡旋振荡仪将增菌肉汤混匀。
若使用 **Read kube** 干式加热器，将 0.25ml 增菌肉汤移至试剂条的样本孔内。加热 5±1 分钟（参

照 **Read kube** 干式加热器使用指南），然后将试剂条取出冷却 10 分钟。

如果使用水浴，将增菌肉汤于 95-100℃ 加热 5±1 分钟后冷却试管。将煮沸的肉汤混匀，然后取 0.25ml 肉汤至 **Read kube** 试剂条的样本孔内。

5. 必要时将标准液和质控液用漩涡振荡仪混匀后，吸取 250ul 至样本孔内。
注：不能加热标准液和质控液。
6. 将 SPR[®]和试剂条放入仪器。核对位置以确保 SPR[®]上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。约 80 分钟后出结果。
8. 检测完成之后，从仪器上拿走 SPR[®]s 及试剂条。
9. 所有用过的 SPR[®]s 和试剂条需按照当地有关规定丢弃至适当的容器。

结果及解释

检测完成之后，结果由仪器自动分析。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，底物比色管的本底读数，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：

检测值=样品 RFV/标准 RFV

检测值=样品 RFV/标准 RFV

阈值和结果解释

检测阈值	解释
< 0.05	阴性
≥ 0.05	阳性

打印报告内容如下：

- 实验类型
- 标本号
- 日期和时间
- 试剂盒批号及有效期
- RFV 值，每个样本的检测值和解释值

实验数值低于下限提示样本中不含有单增李斯特菌抗原或单增李斯特菌抗原的浓度低于检测限。

样本检测值大于或等于阈值则提示样本含单增李斯特菌。阳性结果必须进行确认，参见“阳性结果确认部分”。

无效结果：

- 本底数值超过预定的临界值（提示有底物污染）时，结果无效。此时，用已加热的肉汤或（S1, C1 或 C2）重新检测。
- 如果检测样本的试剂条没有可用的标准，结果亦为无效。重新用该批号的标准液做双份测试，样本测试结果将用这些新储存的标准值重新计算结果。详见 Read kube 操作手册。

质量控制

每盒 Read kube LMX 试剂盒中都有阳性和阴性质控。

打开每批新的试剂盒后均应进行阳性和阴性质控检测，以确保试剂性能未改变。

必须用这些质控检查每次的校正。对阳性和阴性对照分别标以 C1 和 C2，仪器才会校正质控值。

如果质控值偏离期望值则结果则无效。