

Read kube *Listeria* Duo (LDUO)

仅供实验室用

Read kube *Listeria* Duo 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) 原理来同时检测并区分食品和环境样本中单增李斯特菌和李斯特属。

概述

李斯特氏菌分为 6 个种，李斯特氏菌现分为 6 个种。该菌的特点为不形成芽孢，短小、有动力的革兰氏阳性杆菌。触酶阳性，氧化酶阴性，水解七叶甙，发酵葡萄糖但不产生气体。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^{1,2}。

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环境中分离出李斯特氏菌。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、免疫损伤患者及老年人³。

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^{4, 5}。

原理

Read kube LDUO 是在全自动免疫分析系统 Read kube 上用酶联免疫荧光 (ELFA) 原理同时检测和区分单增李斯特菌和李斯特菌。

固相包被针 (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 用抗单增李斯特菌抗体和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 系统自动完成全部实验程序。反应物在 SPR 内定时循环。用户将样本加入试剂条，然后样本在 SPR 内外循环一段特殊时间。样本存在的抗原和包被在 SPR 内侧的单克隆抗体结合，最后洗去未结合复合物。

单增李斯特菌 检测(DLMO): 洗涤完之后，碱性磷酸酶标记的抗单增李斯特菌单克隆抗体在 SPR 管内、外循环，与已经捕获在 SPR 管上的单增李斯特菌抗原结合。最后洗去未结合复合物。最后，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

李斯特菌属检测 (DLIS): 第一次读数之后，碱性磷酸酶标记的多克隆李斯特菌抗体在 SPR 管内外循环并结合 SPR 壁捕获的李斯特菌抗原。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 2 个结果报告。检测值与阈值相比较并给出解释 (阳性，阴性)。

READ KUBE LDUO 试剂盒的组成 (60 人份)

60 个 LDUO 试剂条	STR	成品试剂，参考下表：
60 个 LDUO SPRs	SPR	SPRs 内壁包被着抗单增李斯特菌单克隆抗体和李斯特菌鞭毛抗原。
LDUO 标准液 (单增李斯特菌) (1 x 6 ml)	S1	纯化，灭活的单增李斯特菌抗原，含防腐剂+蛋白稳定剂。MLE 卡上以标准 S1 RFV 值范围表示可信区间范围。
LDUO 标准液(李斯特菌) (1 x 6 ml)	S2	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 S2 RFV 值范围表示可信区间范围。
LDUO 阳性质控 (单增李斯特) (1 x 6 ml)	C1	纯化，灭活的单增李斯特菌抗原+含防腐剂+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范围。
阴性质控 (1 x 6 ml)	C2	缓冲盐 - Tween +防腐剂。 MLE 卡上“质控 C2 值范围”栏下指出最大可接受值。
LDUO 阳性质控 (李斯特属) (1 x 6 ml)	C3	纯化，灭活的沙门氏菌抗原+含防腐剂+蛋白稳定剂 MLE 卡上“质控 C3 值范围”栏下表示荧光值的可信区间范围
1 张 MLE 卡		包含校正测试所需的工厂校正数据。
1 个密封夹		
1 份产品说明书		

说明**SPR**

SRP 在生产时以抗沙门氏菌单克隆抗体包被。每一 SPR 上均标有“LDUO”。仅从包装袋中取出所需数量的 SPR 并及时封闭包装袋。

未提供但必须具备的试剂和设备

- 500ul 一次性枪头加样器
- 水浴箱 (100°C) 或相当设备
- 带有过滤器的消化袋
- LX 肉汤 225 ml
- LX 肉汤 100 ml
- 3 升装 LX 肉汤
- LX 肉汤 6 ml
- LX 肉汤 10 ml

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。

保存

- Read kube LDUO 试剂盒存于 2-8°C。
- 勿冷冻试剂。
- 使用后余下的试剂放回 2-8°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°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性。

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。

- 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。
- 不要使用有滑石粉的手套，可能会导致错误结果。
- 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。

样本制备

使用之前将所有的增菌肉汤和前增菌肉汤放置室温。

阳性结果的确认

所有 Read kube LDUO 阳性结果都必须确认。可用存放在 2-8°C 的未煮沸 LX 肉汤进行确认试验。

单增李斯特菌的阳性结果确认试验

用显色培养基或 Palcam 或牛津平板分离。挑选 1-5 个菌落用 CEN,ISO 或 AFNOR 标准方法（包括纯化）中描述的传统试验进行鉴定⁽⁶⁾。

李斯特菌(DLIS)阳性结果确认的检测

用显色培养基或 Palcam 或牛津平板分离。挑选 1-5 个菌落用传统试验进行验证⁽⁶⁾。显色培养基的使用也是 AFNOR 批准的方法之一，已获得阳性结果认证的认证。分离到典型李斯特菌的菌落用传统生化或 API 李斯特试剂条进行确认，如果菌落分离充分无需初步纯化。

注：

如果有大量李斯特菌落会干扰单增李斯特菌的检测。如果结果有差异（结果阳性，但传统方法未能确认），则每个实验室都有责任采取必要的步骤保证结果的正确性。

使用说明

详细的说明参见 Read kube 用户手册

Read kube PTC 草案资料输入

第一次进行该测试时扫描条形码（在产品说明书的底部）。该操作能将 Read kube PTC 资料传送到 Read kube 更新的软件中。该资料只需第一次做时输入即可。

输入 MLE 卡信息

每一个新试剂盒在使用之前，首先要使用试剂盒中的 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。

可使用 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 S1 和 S2 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 和 S2 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“LDUO”试剂条及一个“LDUO”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“LDUO”至检测编号，再输入将要检测的实验号。标准 S1、S2 必须在 worklist 的首位并做双份，随后阳性质控是 C1 和 C3，阴性质控 C2。注: 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. 若要做校正，精确吸取 500 μ l 标准液，保证测试精确。
6. 吸取 500 \pm 50 μ l 的质控及灭活的样本至 LIS 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 \pm 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 127 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。

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（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

单增李斯特菌 DLMO 的 RFV 值用 S1 计算，李斯特菌属（DLIS）的 RFV 值用 S2 计算。

下表为阈值及结果解释。

	结果	解释
单增李斯特菌 (DLMO) 检测	< 0.05	阴性
	\geq 0.05	阳性
李斯特菌 (DLIS) 检测	< 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单增李斯特菌抗原或李斯特菌抗原，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”。如果单增李斯特菌阳性，则李斯特菌也认为阳性，打印报告上就不包括李斯特菌的 RFV 值和检测结果。

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 S1,S2,C1,C2,C3。

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 Read kube LDUO 试剂盒包括 2 个阳性质控和一个阴性质控。质控必须在打开一盒新试剂立即进行以确保试剂性能在运输盒储存时没有改变。

每次定完标都必须做质控。

仪器只能对核对检测的 C1、C3 阳性质控和 C2 阴性质控结果。质控样品都是成品，使用之前必须用旋涡振荡器混匀并直接吸入试剂条的样本孔。

阳性值期望范围标志在 MLE 卡上。如果质控值偏离预期值质控不能被确认。

注: 如果标准超出范围，检测值会用另一个标准重新计算。详见 Read kube 操作手册。

注: 对每个用户来说都有责任根据当地的规则进行质控。