

# 美国呼吸道病毒抗原检测产品介绍

虫洞（北京）卫生科技有限公司

2014 年 5 月 5 日

# 呼吸道病毒抗原筛查试剂盒（免疫荧光法）

## 说明书

（供体外诊断使用）

### 用途

DHI 直接荧光检测呼吸道病毒试剂盒是通过直接样本或细胞培养来定性鉴定常见的呼吸道病毒，流感病毒 A，流感病毒 B，副流感病毒 1，2，3，以及呼吸道合胞病毒，腺病毒等。

### 概述和说明

为了更加快速和灵敏检测呼吸道病毒，合理区别使用各种抗生素，以及治疗流感的新抗病毒药物的使用，早期检测和辨别感染病毒变得非常重要。为了排除因细菌引起的呼吸道感染，病毒分离变得越来越重要。目前通过细胞培养和使用荧光单克隆抗体来进行病毒确认还是标准的鉴定方法。

以下是 7 种常见的呼吸道病毒的特征：

#### 流感病毒 A 和 B

流感病毒（正粘病毒科）包含由八个分节的核糖核蛋白节段组成的一个单链 RNA 基因组。这种基因组分节在病毒中是很少见的，而且如果两种不同的病毒感染同一个细胞，可能会通过基因节段相互改变发展成新的病毒株。主要有三种流感病毒，分别是流感病毒 A，B，C。流感病毒 A 主要宿主是鸟类，猪以及人类，然而 B 和 C 现在知道的主要是感染人。由于 1918 年流感病毒 A 引起的全世界大规模的流行病的爆发，导致 2,500—3,500 万人死亡，所以 CDC 和 WHO 一直都监控着流感病毒并预期通过合适的病毒株来生产疫苗。在美国，欧洲和日本，大约每年有 1 亿两千万人被流感病毒感染，而且据估计，每年在美国因流感病毒引起的肺炎导致 75,000 人死亡。病毒性肺炎或者细菌性肺炎是导致病毒感染死亡的主要原因。流感病毒 A 每 10 年到 30 年会大爆发一次，而且每年都会发生流感病毒 A 或 B 流行病。感染是季节性的，特别在北半球是从 11 月到 4 月容易爆发。小孩和老年人以及长期患有心血管肺炎的病人易于被感染。通过吸入空气中飞沫或者传染物仅经过 1—3 天潜伏期就会散播出去。主要症状表现为发热，肌痛，头疼和咽炎。以及被其他病毒双重感染，比如腺病毒。

流感病毒 A 和 B 大多数是用 A549 / Mv1Lu 混合物（R-Mix），Rhesus MK，MDCK，MRC-5 和 A549 细胞分离。

#### 腺病毒

腺病毒（腺病毒科）是双链 DNA 无包膜病毒。总共有 49 种血清型，进一步被分成 6 组，从 A 到 F，和绝大部分呼吸以及眼感染相关。一般上，成年人除了免疫系统受到损伤外，

感染腺病毒的死亡率较低，但是会导致非典型肺炎。病毒一般是通过空气中飞沫和传染物传播，感染眼睛粘膜，呼吸道和肠道。

腺病毒可以通过 A549/Mv1Lu mixtures (R-Mix)，HEp2，HEK，A549 and MRC cells 分离。

#### 副流感病毒 1，2 和 3

副流感病毒（副粘病毒科）是单链的负链 RNA 包膜病毒。有 4 种类型，1 到 4，会引起 5 岁以下儿童喉炎和病毒性肺炎。成年人感染会引起上呼吸道疾病。副流感病毒是引起儿童下呼吸道疾病的第二大主因（第一是 RSV）。由上呼吸道感染引起的 IgA 抗体的形成比血清 IgG 更具有保护性。因为 IgA 抗体不能通过胎盘，所以婴儿不能从母体中得到抗体，因此可能会在出生后第一或第二年被感染。副流感病毒感染爆发主要发生在隔年秋季或者一整年，春季会变得活跃。

副流感病毒可以通过 A549/Mv1Lu mixtures (R-Mix)，Rhesus MK，MRC and LLC-MK2 细胞分离。培养液中的胰酶有助于恢复 1 型和 2 型，但对 3 型没有帮助。

#### 呼吸合胞病毒（RSV）

RSV（副粘病毒科）是单链的负链 RNA 包膜病毒。婴儿感染 RSV 会导致支气管炎，成年人感染会导致普通感冒。RSV 通常是季节性的，易于在冬天和早春感染并引起多达 5 个月的流行期。死亡发生最高的是 3—4 个月大的婴儿。主要有两个亚型，A 和 B。B 亚型主要特征是无症状和大多数数人都会经历该感染。亚型 A 会导致更严重的临床疾病，在流行病爆发中占主导地位。RSV 是导致婴儿和儿童下呼吸道感染的主要病毒。会发生再次感染但主要是限制在上呼吸道感染。

RSV 一般可以用免疫荧光试剂直接染色鼻咽上皮分泌物来直接进行检测，当然也可以通过 A549/Mv1Lu mixtures (R-Mix)，HEp2，Vero，LLC-MK2 and MRC-5 细胞培养来检测。

### 检测原理

DFA 呼吸道病毒筛查和检测试剂盒用荧光直接标志的病毒抗原特异性的单克隆鼠抗体，快速筛查 7 种常见的呼吸道病毒。

试剂盒包含 7 种病毒所有单克隆抗体混合装的筛查试剂。试剂盒可以用来直接样本检测或者细胞培养检测。

### 提供材料

#### 呼吸道病毒 DFA 筛查试剂盒：

10 mL 直接检测所有 7 种呼吸道病毒的单克隆荧光标记鼠抗体混合物。

稳定的含有 Evans 蓝和 0.1% 叠氮化钠水溶解缓冲复

染剂

### 洗涤浓缩液

2.5 mL 含有 Tween 20 和 0.1% 叠氮化钠 40x 磷酸盐缓冲生理盐水浓缩液

### 封闭液

1.5 mL 含有 0.1% 叠氮化钠和稳定水溶解缓冲甘油

### 自备材料:

PBS: 灭菌磷酸盐缓冲生理盐水用来冲洗和悬浮细胞

丙酮: 用来固定染色前的单层细胞, 须使用 99% 纯度

蒸馏水或软化水 (demineralized water): 用来稀释浓缩液, 和当在聚苯乙烯多孔板中培养细胞时, 用来稀释 99% 丙酮到 80%。

离心机: 能产生 700xg 速度

移液管

抽吸装备

镊子

玻片

盖玻片

盖玻片吸纸

冲洗废液容器

固定容器

荧光显微镜

注意事项:

仅用来体外诊断

注意:

1. 标本必须按照 1999 年第 4 版的 CDC 生物医学和微生物的实验室生物安全规范操作手册推荐的任何潜在的感染人血清或血液样本必须在生物安全等级 II 的规定进行处理。
2. 假设所有的标本都是感染源, 那么任何样本都可能含有致病源, 必须小心不要和皮肤或者粘膜接触。在使用拭子, 运送媒介物, 细胞培养平板, 试管, Shell vial 等等过程中要小心, 在进行处理前要消毒。
3. 在染色和储存过程中, 避免试剂暴露于亮光下。
4. 不能使用过期的试剂和细胞来接种。
5. 使用其他试剂来替代那些试剂盒中特定的试剂, 可能会产生错误的结果
6. 丙酮是不稳定, 易燃溶剂。在通风区域使用, 远离火源。
7. 试剂中含有 0.1% 叠氮化钠。使用大量的水冲洗到排污系统中, 这样有助于阻止于金属管产生叠氮化金属物, 当在高浓度时会可能引起爆炸。
8. 抗体试剂中含有的 Evans 蓝是潜在的致癌物质。避免皮肤接触, 如果接触需用大量的水冲洗。

### 储存说明

不同成分的试剂储存条件不同

抗体溶液, 对照玻片和封闭液要储存在 2-8°C

洗涤浓缩液储存在 2-30°C

### 试剂制备

洗涤液 (使用时用 1x): 把 25mL 的 40x 洗涤浓缩液加入到 1000mL 的容器中, 用 975ml 的蒸馏水或软化水混匀。在容器上标记成分和稀释时间, 并在室温下保存。当溶液变得浑浊或者出现沉淀不要使用。

### 标本收集, 运送和储存

因鼻咽上皮含有大量的上皮细胞, 所有从鼻咽上皮抽吸物和洗涤分泌物是最佳的样本直接检测标本。

用带有无菌, 柔软的聚乙烯 8 号三通管抽吸收集器连接到吸引器上, 来收集样本。

当病人仰卧时, 通过慢慢灌注和抽吸, 把 1-2ml 的生理盐水灌入到病人的鼻孔中来收集洗涤物。抽吸也通过抽吸收集器连接到吸引器的方式进行。

抽吸物和洗涤物必须用相同体积的, 装在含有几个无菌玻璃珠子的离心管中的运送液来稀释。

用拭子从鼻子, 喉咙和鼻咽部提取分泌物经常不含有足够的上皮细胞, 所以无法直接进行标本检测。

标本必须在冰上运送到实验室, 尽可能快速进行检测。

避免对样本进行冻融, 因为这样一来会使一些病毒丧失活性, 导致检测灵敏性降低。

检测前, 样本储存在 2-8°C 不要超过 48 小时。如果需要储存更长的时间, 样本需要储存在 -70°C 或者更低的温度。

### 注意事项

1. 按照下面步骤推荐的体积和时间进行实验, 以确保获得准确的结果。
2. 当用荧光试剂染色和用荧光显微镜检测细胞时, 同时检测阳性和阴性对照是非常重要的, 因为这样可以监测试剂性能和操作过程是否正确。建议检测每批病人样本时都进行对照检测。

### 操作步骤:

#### 样本直接检测: 固定样本步骤

1. 在漩涡混匀器上轻微混匀 3 下, 见浑浊后去掉植绒拭子。
2. 2000 转离心 10 分钟,
3. 弃去上清液 (用于病毒分离鉴定),
4. 留约 100-150μL 上清液, 吸管上下吹打混匀, 形成混浊细胞悬浮液
5. 在玻璃片上点样, 每个点加 15ul 细胞悬液。
6. 电吹风冷风下风干 10-15 min 至干燥

7. 浸沫在冷丙酮溶液固定 10 min
8. 取出玻片，风干。

#### DFA 染色步骤

1. 在标本片和对照玻片的每个细胞点加上 1 滴相应的荧光抗体（约 25ul）。
2. 在 37℃湿盒孵育 15-30 分钟。
3. PBS 冲洗一遍，后浸入入 PBS 中洗两遍（PBS 不能重复使用）。
4. 除去多余的洗液，每个细胞点加上 1 滴封闭液。最后覆上盖玻片。
5. 在荧光显微镜下观察结果。
6. 若不立即观察，4℃避光保存。

#### 免疫荧光显微镜检测法

在检测样本前最好先检查阳性和阴性对照。如果其中有一个没有得到预期的结果，审查操作步骤和条件从而确认发生原因。不要进行样本检测直至得到正确的对照结果。

荧光显微镜有三个方面原因会影响得到最亮的荧光：

1. 光源随着使用时间会降低耐久性，发出光降低会导致 DFA 产生较低的荧光强度。
2. 光源是通过许多透镜和反射镜聚集。为了获得最强荧光，这些透镜和反射镜必须排列正确。
3. 在光路中，必须使用正确的滤镜，本检测荧光是 FITC。

在检测细胞单层的荧光过程中，会有一些荧光假象存在：

1. 细胞碎片等会非特异性的吸收 DFA's,导致高强度的荧光产生。这些现象可以通过形态上进行区别，也就是说，它们不会出现完整的一个细胞，特别不会出现像其他细胞那样的单层。
2. 低强度的黄绿荧光有时可能也会被看到，特别是当细胞重叠区域或者靠近单层细胞孔洞中。在这两种情况下，在洗涤过程中俘获的 DFA's 发散光被阻碍，导致产生非特异性的荧光。
3. 因孵育时间过长或者湿度没有控制好，会导致在玻片四周出现密集荧光。
4. 去除粘层不充分，会导致非特异性的 DFA's 吸收。
5. 洗涤不充分，会导致产生低度荧光因残留的 DFA's 还是保留在单层细胞上。
6. 直接进行样本检测，要意识到白细胞和单核细胞会俘获荧光。同样，标本中的 RBC（红细胞）也会产生朦胧的绿色。

#### 诊断原则与判断标准：

诊断原则：FITC标记的某病毒特异性单克隆抗体与细胞中相

应的病毒抗原结合后，形成抗原抗体复合物，荧光显微镜下细胞内显示苹果绿荧光。而未发生抗原抗体特异性反应的细胞，被Evans蓝染成红色。

#### 1. 阳性结果判断：

显示苹果绿荧光的细胞，为阳性细胞。

当放大倍数为200倍时，在视野中找到≥2个阳性细胞，判为标本阳性。

#### 2. 不同种类的病毒感染的细胞在染色上略有差异，具体情况如下，

流感病毒A型/流感病毒B型：胞浆颗粒型；细胞核均质型。

呼吸道合胞病毒：胞浆颗粒型，合胞体中亦可见小块包涵物染荧光。

腺病毒：胞浆颗粒型；细胞核均质型。

副流感病毒1/2/3型：胞浆颗粒型。

#### 注意事项

1. 在染色的整个过程中，勿使标本涂片干掉，以免造成严重的非特异性染色。
2. 荧光试剂需 4℃避光保存，保质期内有效。
3. 标本点样及加抗体时，注意孔与孔之间勿要相互接触，避免交叉污染

#### 【生产企业】

企业名称： DIAGNOSTIC HYBRIDS, INC.

地址： 1055 East State St., Suite 100, Athens, Ohio, USA

邮政编码： 45701

电话： 001-740-5893382

传真： 001-740-5929820

# 七项呼吸道病毒检测试剂（免疫荧光法）

## 说明书

（供体外诊断使用）

### 用途

DHI 七项呼吸道病毒检测试剂（免疫荧光法）是通过直接样本或细胞培养样本来定性和鉴定常见的呼吸道病毒，流感病毒 A，流感病毒 B，副流感病毒 1，2，3，以及呼吸道合胞病毒，腺病毒等。

### 概述和说明

为了更加快速和灵敏检测呼吸道病毒，合理区别使用各种抗生素，以及治疗流感的新抗病毒药物的使用，早期检测和辨别感染病毒变得非常重要。为了排除因细菌引起的呼吸道感染，病毒分离变得越来越重要。目前通过细胞培养和使用荧光单克隆抗体来进行病毒分离还是标准的鉴定方法。

以下是 7 种常见的呼吸道病毒的特征：

#### 流感病毒 A 和 B

流感病毒（正粘病毒科）包含由八个分节的核糖核蛋白节段组成的一个单链 RNA 基因组。这种基因组分节在病毒中是很少见的，而且如果两种不同的病毒感染同一个细胞，可能会通过基因节段相互改变发展成新的病毒株。主要有三种流感病毒，分别是流感病毒 A，B，C。流感病毒 A 主要宿主是鸟类，猪以及人类，然而 B 和 C 现在知道的主要是感染人。由于 1918 年流感病毒 A 引起的全世界大规模的流行病的爆发，导致 2,500—3,500 万人死亡，所以 CDC 和 WHO 一直都监控着流感病毒并预期通过合适的病毒株来生产疫苗。在美国，欧洲和日本，大约每年有 1 亿两千万人被流感病毒感染，而且据估计，每年在美国因流感病毒引起的肺炎导致 75,000 人死亡。病毒性肺炎或者细菌性肺炎是导致病毒感染死亡的主要原因。流感病毒 A 每 10 年到 30 年会大爆发一次，而且每年都会发生流感病毒 A 或 B 流行病。感染是季节性的，特别在北半球是从 11 月到 4 月容易爆发。小孩和老年人以及长期患有心血管肺炎的病人易于被感染。通过吸入空气中飞沫或者传染物仅经过 1—3 天潜伏期就会散播出去。主要症状表现为发热，肌痛，头疼和咽炎。以及被其他病毒双重感染，比如腺病毒。

流感病毒 A 和 B 大多数是用 A549 / Mv1Lu 混合物（R-Mix），Rhesus MK，MDCK，MRC-5 和 A549 细胞分离。

#### 腺病毒

腺病毒（腺病毒科）是双链 DNA 无包膜病毒。总共有 49 种血清型，进一步被分成 6 组，从 A 到 F，和绝大部分呼吸以及眼感染相关。一般上，成年人除了免疫系统受到损伤外，感染腺病毒的死亡率较低，但是会导致非典型肺炎。病毒一

般是通过空气中飞沫和传染物传播，感染眼睛粘膜，呼吸道和肠道。

腺病毒可以通过 A549/Mv1Lu mixtures (R-Mix)，HEp2，HEK，A549 and MRC cells 分离。

#### 副流感病毒 1，2 和 3

副流感病毒（副粘病毒科）是单链的负链 RNA 包膜病毒。有 4 种类型，1 到 4，会引起 5 岁以下儿童喉炎和病毒性肺炎。成年人感染会引起上呼吸道疾病。副流感病毒是引起儿童下呼吸道疾病的第二大主因（第一是 RSV）。由上呼吸道感染引起的 IgA 抗体的形成比血清 IgG 更具有保护性。因为 IgA 抗体不能通过胎盘，所以婴儿不能从母体中得到抗体，因此可能会在出生后第一或第二年被感染。副流感病毒感染爆发主要发生在隔年秋季或者一整年，春季会变得活跃。

副流感病毒可以通过 A549/Mv1Lu mixtures (R-Mix)，Rhesus MK, MRC and LLC-MK2 细胞分离。培养液中的胰酶有助于恢复 1 型和 2 型，但对 3 型没有帮助。

#### 呼吸合胞病毒（RSV）

RSV（副粘病毒科）是单链的负链 RNA 包膜病毒。婴儿感染 RSV 会导致支气管炎，成年人感染会导致普通感冒。RSV 通常是季节性的，易于在冬天和早春感染并引起多达 5 个月的流行期。死亡发生最高的是 3—4 个月大的婴儿。主要有两个亚型，A 和 B。B 亚型主要特征是无症状和大多数数人都会经历该感染。亚型 A 会导致更严重的临床疾病，在流行病爆发中占主导地位。RSV 是导致婴儿和儿童下呼吸道感染的主要病毒。会发生再次感染但主要是限制在上呼吸道感染。

RSV 一般可以用免疫荧光试剂直接染色鼻咽上皮分泌物来直接进行检测，当然也可以通过 A549/Mv1Lu mixtures (R-Mix ‘\*’)，HEp2，Vero，LLC-MK2 and MRC-5 细胞培养来检测。

#### 检测原理

DFA 呼吸道病毒筛查和检测试剂盒用荧光直接标志的病毒抗原特异性的单克隆鼠抗体，快速检测和鉴定 7 种常见的呼吸道病毒。

试剂盒包含 7 套分开的 DFA 试剂，由独立的单克隆抗体组成，用来分别鉴定 7 种病毒被检测的细胞，不管是来自临床标本或者细胞培养物，都用丙酮固定。在 35°C 到 37°C 孵育 15 分钟，用冲洗液来洗涤被染色细胞。加入一滴封闭液并盖上盖玻片。随后用荧光显微镜观察。被感染细胞会出现亮的苹果绿，而没被感染细胞不出现荧光，但用 Evans 染色出现红色。如果标本中含有荧光细胞，用 7 种独立 DFA 试剂检测重新制备的细胞来鉴定感染的病毒。

新准备好的细胞用丙酮固定。加入独立的 D F A 试剂。在 3 5 °C 到 3 7 °C 孵育 1 5 分钟，用冲洗液来洗涤被染色细胞。加入一滴封闭液并盖上盖玻片。随后用荧光显微镜观察。被感染细胞会出现亮的苹果绿，从而确定被感染病毒类型。如果检测直接染色的标本，没有发现荧光染色细胞，而且所有的细胞用 E v a n s 染色出现红色，那标本应该培养并用筛查试剂染色。如果出现荧光染色细胞，那么用上面提到的方法来确定属于何种病毒感染。

### 提供材料

#### 流感病毒 A D F A 试剂

一管含有 2 mL 直接检测流感病毒 A 感染细胞产生抗原的荧光标记的单克隆抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### 流感病毒 B D F A 试剂

2 mL 直接检测流感病毒 B 感染细胞产生抗原的单克隆荧光标记抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### R S V D F A 试剂

2 mL 直接检测 R S V 感染细胞产生抗原的单克隆荧光标记抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### 腺病毒 D F A 试剂

2 mL 直接检测腺病毒感染细胞产生抗原的单克隆荧光标记抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### 副流感病毒 1 D F A 试剂

2 mL 直接检测副流感病毒 1 感染细胞产生抗原的单克隆荧光标记抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### 副流感病毒 2 D F A 试剂

2 mL 直接检测副流感病毒 2 感染细胞产生抗原的单克隆荧光标记抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### 副流感病毒 3 D F A 试剂

2 mL 直接检测副流感病毒 3 感染细胞产生抗原的单克隆荧光标记抗体

稳定的含有 E v a n s 蓝和 0 . 1 % 叠氮化钠水溶解缓冲复染剂

#### 抗原对照玻片

五个独立包装对照玻片，包含有阳性和阴性对照孔。每个阳性对照孔都经过确认出现出现病毒感染的细胞，例如：流感病毒 A，B，R S V，腺病毒，副流感病毒 1，2，3。阴性对照玻片含有没被感染的细胞

#### 洗涤浓缩液

2 5 mL 含有 T w e e n 2 0 和 0 . 1 % 叠氮化钠 40x 磷酸盐缓冲生理盐水浓缩液

封闭液（货号：0 1 — 0 0 2 0 1 5）

1 5 mL 含有 0 . 1 % 叠氮化钠和稳定水溶解缓冲甘油

#### 自备材料：

P B S：灭菌磷酸盐缓冲生理盐水用来冲洗和悬浮细胞

丙酮：用来固定染色前的单层细胞，须使用 9 9 % 纯度

蒸馏水或软化水（demineralized water）：用来稀释浓缩液

离心机：能产生 7 0 0 xg 速度

移液管

植绒拭子

5 % 次氯酸钠溶液

镊子

玻片

盖玻片

盖玻片吸纸

冲洗废液容器

固定容器

荧光显微镜

#### 注意事项：

仅用来体外诊断

细胞培养分离手段，荧光显微镜法和病毒分离结果分析可以使用该试剂盒

#### 注意：

1. 标本必须按照 1999 年第 4 版的 CDC 生物医学和微生物的实验室生物安全规范操作手册推荐的任何潜在的感染人血清或血液样本必须在生物安全等级 II 的规定进行处理。
2. 假设所有的标本都是感染源，那么任何样本都可能含有致病源，必须小心不要和皮肤或者粘膜接触。在进行处理前要消毒。
3. 在染色和储存过程中，避免试剂暴露于亮光下。
4. 不能使用过期的试剂和细胞来接种。

5. 使用其他试剂来替代那些试剂盒中特定的试剂，可能会产生错误的结果
6. 丙酮是不稳定，易燃溶剂。在通风区域使用，远离火源。
7. 试剂中含有 0.1%叠氮化钠。使用大量的水冲洗到排污系统中，这样有助于阻止于金属管产生叠氮化金属物，当在高浓度时会可能引起爆炸。
8. 抗体试剂中含有的 Evans 蓝是潜在的致癌物质。避免皮肤接触，如果接触需用大量的水冲洗。

### 储存说明

不同成分的试剂储存条件不同

抗体溶液，对照玻片和封闭液要储存在 2-8℃

洗涤浓缩液储存在 2-30℃

### 试剂制备

洗涤液（使用时用 1x）：把 25mL 的 40x 洗涤浓缩液加入到 1000mL 的容器中，用 975ml 的蒸馏水或软化水混匀。在容器上标记成分和稀释时间，并在室温下保存。当溶液变得浑浊或者出现沉淀不要使用。

### 标本收集，运送和储存

因鼻咽上皮含有大量的上皮细胞，所有从鼻咽上皮抽吸物和洗涤分泌物是最佳的样本直接检测标本。

用带有无菌，柔软的聚乙烯 8 号三通管抽吸收集器连接到吸引器上，来收集样本。

当病人仰卧时，通过慢慢灌注和抽吸，把 1-2ml 的生理盐水灌入到病人的鼻孔中来收集洗涤物。抽吸也通过抽吸收集器连接到吸引器的方式进行。

抽吸物和洗涤物必须用相同体积的，装在含有几个无菌玻璃珠子的离心管中的运送液来稀释。

标本必须在冰上运送到实验室，尽可能快速进行检测。

避免对样本进行冻融，因为这样一来会使一些病毒丧失活性，导致检测灵敏度降低。

检测前，样本储存在 2-8℃ 不要超过 48 小时。如果需要储存更长的时间，样本需要储存在-70℃ 或者更低的温度。

### 注意事项

1. 按照下面步骤推荐的体积和时间进行实验，以确保获得准确的结果。
2. 当用荧光试剂染色和用荧光显微镜检测细胞时，同时检测阳性和阴性对照是非常重要的，因为这样可以监测试剂性能和操作过程是否正确。建议检测每批病人样本时都进行对照检测。

### 操作步骤

样本直接检测：固定样本步骤

1. 在漩涡混匀器上轻微混匀 3 下，见浑浊后去掉植绒拭子。
2. 2000 转离心 10 分钟，
3. 弃去上清液（用于病毒分离鉴定），
4. 留约 100-150μL 上清液，吸管上下吹打混匀，形成混浊细胞悬浮液
5. 在玻璃片上点样，每个点加 15ul 细胞悬液。
6. 电吹风冷风下风干 10-15 min 至干燥
7. 浸沫在冷丙酮溶液固定 10 min
8. 取出玻片，风干。

### DFA 染色步骤

1. 在标本片和对照玻片的每个细胞点加上 1 滴相应的荧光抗体（约 25ul）。
2. 在 37℃湿盒孵育 15-30 分钟。
3. PBS 冲洗一遍，后浸没入 PBS 中洗两遍（PBS 不能重复使用）。
4. 除去多余的洗液，每个细胞点加上 1 滴封闭液。最后覆上盖玻片。
5. 在荧光显微镜下观察结果。
6. 若不立即观察，4℃避光保存。

### 免疫荧光显微镜检测法

在检测样本前最好先检查阳性和阴性对照。如果其中有一个没有得到预期的结果，审查操作步骤和条件从而确认发生原因。不要进行样本检测直至得到正确的对照结果。

荧光显微镜有三个方面原因会影响得到最亮的荧光：

1. 光源随着使用时间会降低耐久性，发出光降低会导致 DFA 产生较低的荧光强度。
2. 光源是通过许多透镜和反射镜聚集。为了获得最强荧光，这些透镜和反射镜必须排列正确。
3. 在光路中，必须使用正确的滤镜，本检测荧光是 FITC。

在检测细胞单层的荧光过程中，会有一些荧光假象存在：

1. 细胞碎片等会非特异性的吸收 DFA's，导致高强度的荧光产生。这些现象可以通过形态上进行区别，也就是说，它们不会出现完整的一个细胞，特别不会出现像其他细胞那样的单层。
2. 低强度的黄绿荧光有时可能也会被看到，特别是当细胞重叠区域或者靠近单层细胞孔洞中。在这两种情况下，在洗涤过程中俘获的 DFA's 发散光被阻碍，导致产生非特异性的荧光。
3. 因孵育时间过长或者湿度没有控制好，会导致在玻片四周出现密集荧光。
4. 去除粘层不充分，会导致非特异性的 DFA's 吸收。

5. 洗涤不充分，会导致产生低度荧光因残留的DFA's还是保留在单层细胞上。
6. 直接进行样本检测，要意识到白细胞和单核细胞会俘获荧光。同样，标本中的RBC（红细胞）也会产生朦胧的绿光。

### 结果解释

质量控制：

1. 所检测的每批标本必须包含对照玻片；
2. 在观察标本片前应先观察对照玻片以确定荧光染色程序是否有效和试剂性能。如果没有出现预期结果，那么程序无效而且染色必须重新进行。
3. 没有被感染的细胞用Evans蓝复染会出现红色。

### 诊断原则与判断标准：

诊断原则：FITC标记的某病毒特异性单克隆抗体与细胞中相应的病毒抗原结合后，形成抗原抗体复合物，荧光显微镜下细胞内显示苹果绿荧光。而未发生抗原抗体特异性反应的细胞，被Evans蓝染成红色。

#### 1. 阳性结果判断：

显示苹果绿荧光的细胞，为阳性细胞。

当放大倍数为200倍时，在视野中找到 $\geq 2$ 个阳性细胞，判为标本阳性。

#### 2. 不同种类的病毒感染的细胞在染色上略有差异，具体情况如下，

流感病毒A型/流感病毒B型：胞浆颗粒型；细胞核均质型。

呼吸道合胞病毒：胞浆颗粒型，合胞体中亦可见小块包涵物染荧光。

腺病毒：胞浆颗粒型；细胞核均质型。

副流感病毒1/2/3型：胞浆颗粒型。

### 注意事项

1. 在染色的整个过程中，勿使标本涂片干掉，以免造成严重的非特异性染色。
2. 荧光试剂需4℃避光保存，保质期内有效。
3. 标本点样及加抗体时，注意孔与孔之间勿要相互接触，避免交叉污染

### 【生产企业】

企业名称：DIAGNOSTIC HYBRIDS, INC.

地址：1055 East State St., Suite 100, Athens, Ohio, USA

邮政编码：45701

电话：001-740-5893382

传真：001-740-5929820



# BM2000 型双目荧光显微镜主要技术参数

1. 放大倍数：40X~400X
2. 铰链式双目观察筒：倾斜 30°，可 360° 旋转，双视度可调±5，  
双目瞳距：48~75 mm
3. 大视场目镜：10X/φ 20
4. 无限远消色差物镜：4X，10X，20，40X（弹簧）
5. 机械筒长：∞
6. 物镜转换器：内倾式四孔转换器
7. 粗微调：共轴粗微调，三角导轨,交叉滚柱导向机构,并有调焦限位装置。粗调范围：22mm，微调刻值 0.002 mm，采用低位置共轴手轮
8. 机械移动式载物台：面积：216X150 mm。
9. 机械载物台：行程为 78(X)mm×54(Y)mm 无凸出,可夹持双切片
10. 聚光镜：阿贝式 NA=1.25(带孔径光栏)，聚光镜垂直移动范围为 25mm,聚光镜中心可调
11. 光源：3W LED 灯,亮度可调
12. 荧光装置
  - 1) B 波段：460-495/500/520
  - 2) 100W 超高压汞灯照明
  - 3) 防紫外挡板
  - 4) NFP-1 型电源箱，220V/110V 交流输入，数字显示带计时器
13. 产品通过 CE 认证
14. 产品具有医疗器械注册证
15. 生产厂家具有 ISO9001 质量体系认证

16. 生产厂家具有 ISO14001 环保体系认证

17. 生产厂家具有 ISO13485 医疗器械质量体系认证

---



BM2000 型荧光显微镜(内置数码)

## BM2000 型双目荧光显微镜配置清单

序号	名 称	数 量
1	主 体	1 只
2	双目观察筒	1 只
3	大视场目镜 10X/ $\phi$ 20mm	1 对
4	无限远平场消色差物镜 4X	1 只
5	无限远平场消色差物镜 10X	1 只
6	无限远平场消色差物镜 20X	1 只
7	无限远平场消色差物镜 40X（弹簧）	1 只
8	阿贝式聚光镜 NA=1.25	1 只
9	LED 光源 3W	1 只
10	集光镜	1 只
11	落射荧光装置（B 波段、汞灯）	1 套
12	合格证	1 份
13	说明书	1 本
14	防尘罩	1 个

中国推广服务机构联系方式：

虫洞（北京）卫生科技有限公司 戴天岩经理

手机:13683292569、13051069337

Tel:010-85365699,FAX:010-85365698

E-mail: davad311@126.com qq:104974415

办公地址：北京市朝阳区三间房乡金卫路2号楼204室；邮编：100024

[公司官网]虫洞网<http://www.wormholer.com>

[公司博客]虫洞医学与生命科学博客<http://blog.sina.com.cn/cnyr>

虫洞公司财务信息：

公司税号：11010569767627X

开户名称：虫洞（北京）卫生科技有限公司；

开户银行：上海浦东发展银行北京东三环支行；

帐号：9115 0154 8000 0574 5