

结核病实验室技术手册

主 编 陈明亭 万康林



科学出版社

结核病实验室技术手册

主 编 陈明亭 万康林

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书共七章,内容包括结核病实验室标准化操作技术和国内外结核病防治工作中普遍使用的结核病实验室技术、规程和要求,主要涉及结核病实验室分级与职能、基本建设要求、常规操作技术标准化程序、质量保证、生物安全、仪器设备管理及有关结核病实验室的技术进展。

本手册内容翔实、系统、全面,适合于广大结核病实验室工作人员、临床医生及结核病防治人员日常工作中参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

结核病实验室技术手册 / 陈明亭,万康林主编. —北京:科学出版社,2011. 11

ISBN 978-7-03-032687-4

I. 结… II. ①陈… ②万… III. 结核病-实验室诊断-手册
IV. R520. 4-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 225701 号

责任编辑:杨小玲 康丽涛 / 责任校对:赵桂芬

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 11 月第 一 版 开本: 890×1240 A5

2011 年 11 月第一次印刷 印张: 7 3/4

字数: 236 000

定价: 49.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

结核病实验室体系规范化建设是《全国结核病防治规划》的重要组成部分,结核病实验室检测结果是确诊肺结核的重要依据,特别是对于耐多药结核病的确证,其重要依据就是抗结核药物的敏感性试验,结核病实验室的标准化操作是保证结核病实验室质量的重要前提。随着结核病防治工作的深入开展,加强结核病实验室体系建设已成为我国《十二五全国结核病防治规划》的重点工作之一。加强各级结核病实验室能力的建设,规范各项结核病实验室基本操作技术已是当前十分紧迫的任务。然而,我国目前尚缺乏系统介绍实验室技术操作质量控制方面的书籍,尽快出台结核病实验室技术手册显得十分必要。

为了进一步规范各级结核病实验室的技术操作,为加强结核病实验室体系建设提供科学依据和技术支持,我们借助科技部重大专项的资助,组织结核病实验室的专家和专业技术人员,参阅《全国结核病防治规划实施工作指南》,以及有关传染病实验室建设的标准等,经过多次讨论修改,编写了这本《结核病实验室技术手册》。本书共七章,涉及结核病实验室分级与职能、基本建设要求、常规操作技术标准化程序,质量保证、生物安全、仪器设备管理,以及有关结核病实验室的技术进展。本手册供广大结核病实验室工作人员、临床医生及结核病防治人员日常工作中参考使用。

在本手册编写过程中,得到了国内有关专家的大力支持,并提出了宝贵的建议,在此表示衷心感谢。

由于结核病实验室操作方法繁多,且涉及不同的设备、不同的操作,新技术不断涌现,同时由于编写时间仓促,本书尚有许多不足之处,敬请各位同道赐教指正。

《结核病实验室技术手册》编委会

2011年9月

目 录

前言

第一章 结核病实验室分级与职能	(1)
第一节 国家级结核病参比实验室.....	(1)
第二节 省级结核病参比实验室.....	(2)
第三节 地(市)级结核病参比实验室.....	(3)
第四节 县(区)级结核病实验室.....	(4)
第五节 结核病实验室制度建设与管理.....	(5)
第六节 跨国结核病参比实验室	(10)
第二章 结核病实验室基本建设要求	(12)
第一节 选址与布局	(12)
第二节 建筑结构	(14)
第三节 基本设施与设备	(16)
第四节 给水、排水与废水处理.....	(19)
第五节 通风、空调、空气净化	(21)
第六节 生物安全实验室	(23)
第七节 专用实验室	(29)
第三章 结核病实验室检测常规技术	(34)
第一节 涂片染色显微镜检查	(34)
第二节 分枝杆菌分离培养——固体培养技术	(44)
第三节 分枝杆菌分离培养——液体培养技术	(51)
第四节 结核分枝杆菌药物敏感性检测——固体培养技术	(60)
第五节 结核分枝杆菌药物敏感性检测——液体培养技术	(68)
第六节 分枝杆菌菌种鉴定	(76)
第七节 结核分枝杆菌免疫学检测	(82)
第四章 结核病实验室质量保证	(90)
第一节 痰涂片实验室质量保证	(92)
第二节 分枝杆菌分离培养实验室质量保证.....	(107)

第三节	结核分枝杆菌药物敏感性试验实验室室内质量保证·····	(114)
第四节	分枝杆菌菌种鉴定质量保证·····	(126)
第五节	结核分枝杆菌分子生物学检测质量保证·····	(129)
第六节	结核分枝杆菌免疫学检测实验室质量保证·····	(134)
第七节	结核分枝杆菌菌型鉴定质量保证·····	(137)
第五章	结核病实验室生物安全·····	(141)
第一节	管理要求·····	(141)
第二节	实验室安全管理制度·····	(142)
第三节	菌种及阳性标本的管理·····	(145)
第四节	消毒灭菌与废弃物处理·····	(152)
第五节	意外事故的处理·····	(155)
第六节	危险化学品管理·····	(157)
第六章	结核病实验室仪器和设备的管理·····	(161)
第一节	仪器和设备的管理·····	(161)
第二节	常用仪器和设备的使用及维护·····	(163)
第七章	结核病实验室检测新技术·····	(177)
第一节	结核分枝杆菌免疫荧光检测技术·····	(177)
第二节	分枝杆菌菌种分子鉴定技术·····	(180)
第三节	结核分枝杆菌分子生物学检测·····	(187)
第四节	结核分枝杆菌基因分型鉴定·····	(196)
第五节	其他分子检测新技术·····	(212)

第一章 结核病实验室分级与职能

结核病实验室检查是发现传染源的最主要手段,是结核病确诊、治疗方案选择、疗效考核的主要依据。因此,结核病参比实验室网络的建立是现代结核病控制策略中的关键环节之一。参比实验室的建立应遵循从上到下逐级接受质量控制的原则。

世界卫生组织(WHO)推荐采用三级实验室网络,即基层实验室、中间实验室、中央实验室,并对各级实验室的工作量和服务人口数也有相应规定。但我国幅员辽阔、人口众多,对此标准不能完全采用。拟根据现有的国家结核病防治组织结构设立国家级参比实验室、省级参比实验室、地(市)级参比实验室、县(区)级实验室。跨国参比实验室则由国家级参比实验室负责申请、WHO 批准。

第一节 国家级结核病参比实验室

国家参比实验室为服务于国家结核病防治工作的中心实验室,负责制定国家结核病实验室诊断标准和操作规程,对全国结核病实验室网络建设提供指导和质量控制,组织开展全国结核病的实验室监测、流行病学研究,耐药结核防治和新技术的评价与推广;负责制定全国的培训计划和开展相关培训工作。

应具备按照国家标准规范常规开展分离培养、菌种鉴定、抗结核菌药物敏感性试验、结核病新诊断技术研究和评价的条件和能力,应具备一定的教学和培训能力;具备建立国家菌株库,组织和承担相关的科研和项目工作。

国家级结核病参比实验室应有 20 名以上专业技术人员,应包括高级、中级、初级不同职称的人员,人员岗位配备合理。新参加工作人员应经过实验室基本技术和生物安全培训 2 周,合格后上岗。

具体职能如下:

(1) 负责全国结核病实验室工作的规划、质量控制和生物安全等技

术管理,为各级结核病实验室提供技术指导和技术支持。

(2) 根据国家结核病防治规划的要求,组织实施全国结核病实验室的工作,参与国家有关技术政策的制定和组织实施。

(3) 制定和推行结核病细菌学检查实验技术标准、操作规程及规章制度。

(4) 建立可行的全国结核病实验室质量控制标准和质量保证体系,并负责组织实施,协调、检查各省(自治区、直辖市)结核病实验室工作。

(5) 除常规的分枝杆菌检查项目外,承担其他结核病诊断新技术、新方法的研究和评价,承担分枝杆菌最终的菌种鉴定工作。

(6) 开展有关的实施性研究。

(7) 培训结核病实验室技术人员。

(8) 收集、分析和反馈全国结核病实验室质量控制数据。

(9) 接受跨国参比实验室的技术指导。

第二节 省级结核病参比实验室

省级结核病参比实验室为国内 31 个省(直辖市、自治区)和新疆生产建设兵团服务于结核病防治工作的实验室(暂不包括港、澳、台地区的实验室,以下地市和县级参比实验室也同此),负责实施和推广国家结核病参比实验室诊断标准和操作规程,对市县级结核病实验室工作进行技术指导、评价,以及制订本省相关的培训计划和开展相关培训工作。

应具备按照国家标准规范开展痰涂片镜检、分离培养、抗结核菌药物敏感性试验、菌种鉴定试验的条件和能力,具有组织和承担相关的科研和项目工作及具备一定的教学和培训能力。

省级结核病参比实验室至少应有 6 名以上专业技术人员,应包括高级、中级、初级不同职称的人员,人员岗位配备合理。新参加工作人员应经过实验室基本技术和生物安全培训 2 周,合格后上岗。

省级结核病参比实验室可以设立于省级结核病防治机构(疾控中心)或省级结核病定点医院内,也可以是符合条件的综合医院细菌学实验室,大学或研究机构结核病实验室。

具体职能如下:

(1) 制定本省结核病实验室工作计划。

(2) 开展结核病实验室培训和督导等工作,为全省各级结核病实验室提供技术支持,并接受国家结核病参比实验室的技术指导。

(3) 根据国家结核病实验室质量保证体系的要求,组织实施全省结核病实验室的质量保证工作。

(4) 对本省各级结核病实验室所用耗材、试剂的质量进行评估和核准,为全省统一提供抗酸染色试剂,为省内开展分离培养的实验室统一提供培养基。

(5) 按国家统一的标准化操作程序开展涂片镜检、分离培养、药敏试验和分离株的初步鉴定,有条件的省级参比实验室可建立符合国家相关规定的分枝杆菌专业实验室。

(6) 开展有关科研活动和实施性研究工作。

(7) 收集、分析和反馈全省结核病实验室质量控制数据,按有关规定向国家结核病参比实验室上报相关数据。

(8) 完成实验室日常记录的登记报告。

(9) 进行实验室设备的定期清洁维护。

(10) 试剂、耗材的登记和管理。

(11) 接受上级布置的全国结核病调查、监测等工作的实验室检测任务。

第三节 地(市)级结核病参比实验室

地(市)级结核病参比实验室负责实施和推广国家结核病参比实验室诊断标准和操作规程,对县(区)级结核病实验室工作进行技术指导、评价,以及制定本市相关的培训计划和开展相关培训工作。

应具备按照国家标准规范常规开展痰涂片镜检、分离培养、抗结核菌药物敏感性试验的实验室条件和能力。能够制定并实施本地(市)结核病实验室相关培训工作。

地(市)级结核病参比实验室应有 4 名以上专业技术人员,应包括高级、中级、初级不同职称的人员,人员岗位配备合理。新参加工作人员应经过实验室基本技术和生物安全培训 2 周,合格后上岗。

地(市)级结核病参比实验室可以设立于地市级结核病防治机构(疾控中心)或地(市)级结核病定点医院内,也可以是符合条件的综合医院细

菌学实验室。

具体职能如下：

(1) 制定本地市结核病实验室工作计划。

(2) 按国家统一的标准化操作程序开展工作,有条件的地(市)可以在省参比室的核准和指导下开展分离培养、结核分枝杆菌复合群鉴定及药物敏感试验工作。

(3) 组织实施本地(市)痰涂片镜检的盲法复检和现场评估,并按要求向省参比实验室报告结果。地(市)级实验室对县级实验室的盲法复检,每季度进行 1 次。在省级实验室的组织下,接受痰涂片镜检盲法复检,每半年进行 1 次。

(4) 收集、分析、上报和反馈本地区结核病实验室质量保证的数据。负责实验室内质量控制。

(5) 开展痰培养操作的地(市)级实验室,在确保符合感染性物质运送相关规定前提下,负责将结核菌株运送到省级实验室接受进一步检验。

(6) 完成实验室日常记录的登记报告。

(7) 进行实验室设备的定期清洁维护。

(8) 试剂、耗材的登记和管理。

(9) 接受上级布置的全国结核病调查、监测等工作的实验室检测任务。

(10) 培训所辖县(区)结核病实验室技术人员。

第四节 县(区)级结核病实验室

县(区)级结核病实验室负责开展痰涂片检查工作,根据当地实际情况逐步开展结核分枝杆菌的分离培养。

应按国家标准规范常规开展痰涂片镜检工作,正确处理标本和污染物,按规定妥善保存痰涂片接受上级实验室考核。

县(区)级结核病实验室应有 2 名或以上专职工作人员,新参加工作人员应经过实验室基本技术和生物安全培训 2 周,合格后上岗。

县(区)级结核病实验室可以设立于县级结核病防治机构(疾控中心)或县级结核病医院内。

具体职能如下：

(1) 制定本县(区)结核病实验室工作计划。

(2) 按国家统一的标准化操作程序常规开展痰涂片镜检工作,根据实际情况有能力、具备条件的实验室可以开展分枝杆菌培养和结核分枝杆菌复合群鉴定。

(3) 在地(市)级实验室的组织下,开展痰涂片镜检盲法复检。开展痰培养操作的县级实验室,接受上级实验室定期质量控制。负责实验室内质量控制。

(4) 开展痰培养操作的县级实验室,在确保符合感染性物质运送相关规定前提下,负责将结核菌株运送到地市级实验室接受进一步检验。

(5) 对辖区内乡镇卫生院查痰点的工作提供培训和技术支持。

(6) 完成实验室日常记录的登记报告。

(7) 进行实验室设备的定期清洁维护。

(8) 试剂、耗材的登记和管理。

(9) 接受上级布置的全国结核病调查、监测等工作的实验室检测任务。

(10) 对乡镇卫生院查痰点提供技术支持,统一提供实验室试剂和耗材。

第五节 结核病实验室制度建设与管理

各级结核病实验室应建立明确的经费管理、档案管理、仪器设备管理等制度,对实验室的经费、档案及实验室的仪器设备进行规范管理。

一、文件控制

(1) 实验室应对所有管理体系文件进行控制,制定和维持文件控制程序,确保实验室人员使用现行有效的文件。

(2) 应将每份受控文件的复件存档,并规定其保存期限。文件可以用任何适当的媒介保存,不限定为纸张。并应符合国家和地方的有关文件保存的法规或标准。

(3) 应有相应的程序以保证:

1) 管理体系所有的文件应在发布前经过授权人员的审核与批准。

2) 动态维持文件清单控制记录,并可以识别现行有效的文件版本及

其发放情况。

3) 在相关场所只有现行有效的文件可供使用。

4) 定期评审文件,需要修订的文件经授权人员审核与批准后及时发布。

5) 立即从所有使用地点撤掉无效或已废止的文件,或可以确保不误用。

6) 适当标注存留或归档的已废止文件,以防误用。

(4) 如果实验室的文件控制制度允许在换版之前对文件手写修改,应规定修改程序和权限。修改之处应有清晰的标注、签署并注明日期。被修改的文件应按程序及时发布。

(5) 应制定程序规定如何更改和控制保存在计算机系统文件。

(6) 安全管理体系文件应具备唯一识别性,文件中至少应包括以下信息:

1) 标题。

2) 文件编号,版本号,修订号。

3) 页数。

4) 生效日期。

5) 作者。

6) 参考文献。

二、实验室设施设备管理

(1) 实验室应有对设施设备(包括个体防护装备)管理的政策和程序,包括设施设备的完好性监控指标、巡检计划、使用前核查、安全操作、使用限制、授权操作、消毒、禁止事项、定期校准或检定,定期维护、安全处置、运输、存放等。

(2) 应制定在发生事故或溢漏(包括生物、化学或放射性危险材料)时,对设施设备去污染、清洁和消毒的专用方案。

(3) 设施设备维护、修理、报废或被移出实验室前应先去污染、清洁和消毒;但应意识到,可能仍然需要要求维护人员穿戴适当的个体防护装备。

(4) 应明确标示出设施设备中存在危险的部位。

(5) 在投入使用前应核查并确认设施设备的性能可满足实验室的安全要求和相关标准。

(6) 每次使用前或使用中应根据监控指标确认设施设备的性能处于正常工作状态,并记录。

(7) 如果使用个体呼吸保护装置,应做个体适配性测试,每次使用前核查并确认符合佩戴要求。

(8) 设施设备应由经过授权的人员操作和维护,现行有效的使用和维护说明书应便于有关人员使用。

(9) 应遵循制造商的建议使用和维护实验室设施设备。

(10) 应在设施设备的显著部位标示出其唯一编号、校准或验证日期、下次校准或验证日期、准用或停用状态。

(11) 应停止使用并安全处置性能已显示出缺陷或超出规定限度的设施设备。

(12) 无论什么原因,如果设备脱离了实验室的直接控制,待该设备返回后,应在使用前对其性能进行确认并记录。

(13) 应维持设施设备的档案,内容至少包括:

- 1) 制造商名称、型式标识、系列号或其他唯一性标识。
- 2) 验收标准及验收记录。
- 3) 接收日期和启用日期。
- 4) 接收时的状态(新品、使用过、修复过)。
- 5) 当前位置。
- 6) 制造商的使用说明或其存放处。
- 7) 维护记录和年度维护计划。
- 8) 校准(验证)记录和校准(验证)计划。
- 9) 任何损坏、故障、改装或修理记录。
- 10) 服务合同。
- 11) 预计更换日期或使用寿命。
- 12) 安全检查记录。

三、实验室人员管理

(1) 应聘用适当的有资格人员承担管理实验室安全的职责。实验室

安全负责人应：

- 1) 具备专业教育背景。
 - 2) 熟悉国家相关政策、法规、标准。
 - 3) 熟悉所负责的工作,有相关的工作经历或专业培训。
 - 4) 熟悉实验室安全管理工作。
 - 5) 定期参加相关的培训或继续教育。
- (2) 实验室或其所在机构应有明确的人事政策和安排,并可供所有员工查阅。
- (3) 应对所有岗位提供职责说明,包括人员的责任和任务,教育、培训和专业资格要求,应提供给相应岗位的每位员工。
- (4) 应有足够的人力资源承担实验室所提供服务范围的工作以及承担管理体系涉及的工作。
- (5) 如果实验室聘用临时工作人员,应确保其有能力胜任所承担的工作,了解并遵守实验室管理体系的要求。
- (6) 员工的工作量和工作时间安排不应影响实验室活动的质量和员工的健康,符合国家法规要求。
- (7) 在有规定的领域,实验室人员在从事相关的实验室活动时,应有相应的资格。
- (8) 应培训员工独立工作的能力。
- (9) 应定期评价员工可以胜任其工作任务的能力。
- (10) 应按工作的复杂程度定期评价所有员工的表现,应至少每 12 个月评价 1 次。
- (11) 人员培训计划至少应包括：
- 1) 上岗培训,包括对较长期离岗或下岗人员的再上岗培训。
 - 2) 实验室管理体系培训。
 - 3) 安全知识及技能培训。
 - 4) 实验室设施设备(包括个体防护装备)的安全使用。
 - 5) 应急措施与现场救治。
 - 6) 定期培训与继续教育。
 - 7) 人员能力的考核与评估。
- (12) 实验室或其所在机构应持有和妥善保存每个员工的人事资料,并保护隐私权。人事档案至少应包括：

- 1) 员工的岗位职责说明。
- 2) 岗位风险说明及员工的知情同意证明。
- 3) 教育背景和专业资格证明。
- 4) 培训记录,应有员工与培训者的签字及日期。
- 5) 员工的免疫、健康检查、职业禁忌证等资料。
- 6) 内部和外部的继续教育记录及成绩。
- 7) 与工作安全相关的意外事件(事故)报告。

8) 有关确认员工能力的证据,应有能力评价的日期和承认该员工能力的日期或期限。

- 9) 员工表现评价。

四、实验室材料管理

(1) 实验室应有选择、购买、采集、接收、查验、使用、处置和存储实验室材料(包括外部服务)的政策和程序,以保证安全。

(2) 应确保所有与安全相关的实验室材料只有在经查验或证实其符合有关规定的要求之后投入使用,应保存所采取的符合性查验活动的记录。

(3) 应评价重要消耗品、供应品和服务的供应商,保存评价记录和允许使用的供应商名单。

(4) 应对所有危险材料建立清单,包括来源、接收、使用、处置、存放、转移、使用权限、时间和数量等内容,相关记录安全保存,保存期限不少于20年。

(5) 应有可靠的物理措施和管理程序确保实验室危险材料的安全和安保。

- (6) 应按国家相关规定的要求使用和管理实验室危险材料。

五、实验室活动管理

(1) 实验室应有计划、申请、批准、实施、监督和评估实验室活动的政策和程序。

- (2) 实验室负责人应指定每项实验室活动的项目负责人。

(3) 在开展活动前,应了解实验室活动涉及的任何危险,并为实验人员提供如何在风险最小情况下进行工作的详细指导,包括正确选择和使用个体防护装备。

(4) 涉及微生物的实验室活动,操作规程应符合良好微生物标准操作要求和(或)特殊操作要求。

(5) 实验室应有针对未知风险材料操作的政策和程序。

六、实验室内务管理

(1) 实验室应有对内务管理的政策和程序,包括内务工作所用清洁剂和消毒剂的选择、配制、效期、使用方法、有效成分检测及消毒效果监测等政策和程序,应评估和避免消毒剂本身的风险。

(2) 不应在工作面放置过多的实验室耗材。

(3) 应时刻保持工作区整洁有序。

(4) 应指定专人使用经核准的方法和个体防护装备进行内务工作。

(5) 不应混用不同风险区的内务程序和装备。

(6) 应在安全处置后对被污染的区域和可能被污染的区域进行内务工作。

(7) 应制定日常清洁(包括消毒)计划和清场消毒计划,包括对实验室设备和工作表面的消毒和清洁。

(8) 应指定专人监督内务工作,应定期评价内务工作的质量。

(9) 实验室的内务规程和所用材料发生改变时,应通知实验室负责人。

(10) 实验室规程、工作习惯或材料的改变可能对内务人员有潜在危险时,应通知实验室负责人并书面告知内务管理负责人。

(11) 发生危险样本漏出时,应启用应急处理程序。

第六节 跨国结核病参比实验室

全球跨国参比实验室网络(the Network of Supranational Reference Laboratories)是由 WHO 和国际防痨联盟(IUATLD)在 1994 年共同组建的。跨国参比实验室网络致力于支持以确保全球结核病实验室药物敏

感试验(DST)的准确性,确保全球耐药监测(DRS)项目来自各国的药敏试验结果的可比性。目前该网络包括分布在全球的 26 个跨国参比实验室。跨国参比实验室网络协调中心是位于比利时安特卫普市的 Leopold 亲王热带病研究院,主要负责对跨国参比实验室进行熟练度测试、药敏试验质量控制、确保 WHO/IUATLD 耐药监测项目试验方法的标准化。

为应对耐药结核病控制的挑战,跨国参比实验室网络仍然在不断扩展。支持耐药结核病控制规划的国家级参比实验室要与一个跨国参比实验室建立稳定的联系,以保证在机构发展、财政预算和培训时有足够的专家参与。

(赵 津 徐彩红 李卫彬)

参 考 文 献

中华人民共和国卫生部. 2007. 结核病防治工作规范.

中国疾病预防控制中心. 2009. 中国结核病防治规划实施工作指南. 中国协和医科大学出版社.

World Health Organization. 2000. Anti-tuberculosis drug resistance in the World. WHO/CDS/TB/2000. 278.

World Health Organization. 2008. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis(Emergency update 2008). WHO/HTM/TB/2008. 402.

World Health Organization. 1998. Laboratory services in tuberculosis control. Parts I, II and III, WHO/TB/1998. 258.