

S 号

中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CHATA XXX--XXXX

分枝杆菌新菌种鉴定及命名流程

Identification and Nomenclature process of A Novel
Mycobacterium Species

2022-XX-XX发布

2022-XX-XX实施

中国防痨协会发布

目 次

前言	4
1 范围	5
2 规范性引用文件	5
3 术语和定义	5
3.1 细菌鉴定 identification of bacteria	5
3.2 细菌命名 nomenclature of bacteria	5
3.3 标准菌株 type strain	5
3.4 种 species	5
3.5 亚种 subspecies	5
3.6 复合群 complex	6
4 提示为分枝杆菌新菌种的线索	6
5 分枝杆菌新菌种鉴定流程（附录 A）	6
5.1 分枝杆菌最低鉴定标准	6
5.1.1 抗酸性	6
5.1.2 分枝菌酸分析	6
5.1.3 G+C 含量检测	6
5.2 分枝杆菌鉴定表型特征分析	7
5.2.1 形态学	7
5.2.2 生化和培养实验	7
5.2.3 药敏实验	8
5.2.4 分枝菌酸特征	8
5.2.5 肽段组成特征	8
5.3 基因型特征分析	8
5.3.1 16S rRNA 和其他同源基因/序列分析	8
5.3.2 DNA-DNA 杂交和 ΔT_m 值	9
5.3.3 使用全基因组数据进行原核生物分类标准(附录 B)	9
6 分枝杆菌新菌种的保藏	9
7 分枝杆菌新菌种命名	10

7.1 新菌种命名方法	10
7.2 新菌种命名权的认定	10
附录	11
参考文献	16

前言

本标准按照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件结构和起草规则》的规定起草。

本文件起草单位：首都医科大学附属北京胸科医院、中国疾病预防控制中心、武汉市肺科医院、首都医科大学附属北京儿童医院、解放军总医院第八医学中心、中国疾病预防控制中心传染病控制所、上海市疾病预防控制中心、上海市肺科医院、天津市海河医院、湖南省胸科医院、广州市胸科医院、福建省福州结核病防治院、河南省胸科医院、河北省胸科医院、遵义医科大学附属医院

本标准主要起草人：黄海荣、于霞、陈素婷、张宗德、李卫民、赵雁林、夏辉、刘冠、申阿东、吴雪琼、万康林、沈鑫、余方友、张丽霞、谭云洪、刘志辉、黄明翔、王伟、梁瑞霞、杜建、姜广路、霍凤敏、郑立恒、宗兆婧、王桂荣、孙照刚、车南颖、刘毅。

分枝杆菌新菌种鉴定及命名流程

1 范围

本文件规定了分枝杆菌新菌种鉴定、保藏及命名的流程。

本文件适用于医疗卫生机构、疾病预防控制中心和科研院所对分枝杆菌新菌种的鉴定及命名，适用于环境来源和宿主中分离的菌株。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅标注日期的版本适用于本文件。凡未标注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

(1) 《International Code of Nomenclature of Prokaryotes》Prokaryotic Code (2008 Revision). Int J Syst Evol Microbiol. 2021;71:004598.

(2) 分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识. 中华结核与呼吸杂志, 2018, 41(7): 522-528.

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 细菌鉴定 *identification of bacteria*

将未知细菌按分类原则，确定细菌的分类地位。

3.2 细菌命名 *nomenclature of bacteria*

在分类基础上，给每种细菌一个科学名称，保证所有的科研工作者使用同一名称以便于交流。

3.3 标准菌株 *type strain*

标准菌株也称模式菌株，是由国内或国际菌种保藏机构保藏的，遗传学特性得到确认和保证并可追溯的菌株。是以活菌状态所保存的菌种，被指定为细菌“种”的代表，是用于分类研究“种”的参考模型。

3.4 种 *species*

细菌学分类的最基本单元，生物学性状基本相同的细菌群体归成一个菌种。

3.5 亚种 *subspecies*

同一菌种的各个细菌，在某些方面仍有一定的差异，可再分成亚种。

3.6 复合群 complex

非正式分类等级，泛指具有某种共同特性的某个集体，任何等级都可借用。

4 提示为分枝杆菌新菌种的线索

目前分枝杆菌菌种鉴定最常用方法是同源基因/序列比对。目标分枝杆菌与所有已知分枝杆菌菌种的同源基因/序列比对满足以下条件时，提示可能是分枝杆菌新菌种：16S rRNA 异质性大于 1%和/或与 rpoB、hsp65 和 16-23S rRNA 转录间隔区序列(internal transcribed spacer, ITS) 等分子标识的异质性大于 3%。但最终鉴定结果依赖以下完整鉴定程序确认。

5 分枝杆菌新菌种鉴定流程（附录 A）

5.1 分枝杆菌最低鉴定标准

5.1.1 抗酸性

分枝杆菌细胞壁富含分枝菌酸，分枝菌酸在被染料（复红或金胺“O”）染色后能抵抗盐酸乙醇等脱色剂的脱水，具有抗酸性。上述特性可被显微镜观察确认，常用染色方法包括萼—尼氏染色和荧光染色。

5.1.2 分枝菌酸分析

分枝杆菌细胞壁中的长链分枝菌酸通过裂解可产生直链酯，碳链长度在 C22 到 C26 之间，不同分枝杆菌菌种细胞壁裂解后的多种直链酯组成具有种特征性图谱。常用的直链酯检测方法包括气相色谱法和高效液相色谱法（high performance liquid chromatography, HPLC）。

5.1.3 G+C 含量检测

分枝杆菌基因组 G+C 含量为 61%~71%。常用方法包括熔解温度法和 HPLC，但近年多用全基因组测序检测 G+C 含量。

5.2 分枝杆菌鉴定表型特征分析

5.2.1 形态学

观察分枝杆菌在电子显微镜下的形态以及在固体培养基上生长菌落形态。包括细菌形态(如光滑或粗糙, 颜色等)和组成、菌体或菌毛的长度和宽度等。有些分枝杆菌菌落形态并不固定, 这种情况下所有形态都必须描述。

5.2.2 生化和培养实验

分枝杆菌属的菌种鉴定包括一系列生化和培养实验, 见表1。需要注意的是, 开展生化实验时必须保证分枝杆菌形态完整, 否则检测酶活性没有相关性。除了产色、光反应和烟酸实验, 其他实验都需要使用生长良好的菌落开展。

表1 分枝杆菌培养和生化试验方法

序号	试验名称	方法详见	是否必须
1	产色、光反应	1. V V Lévy-Frébault, F Portaeis. Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species. Int J Syst Bacteriol. 1992 Apr;42(2):315-23. 2. 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 中国教育文化出版社, 2006年1月第1版. 3. 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 人民卫生出版社, 2015年6月第1版.	是
2	不同温度生长		是
3	耐异烟肼		是
4	耐噻吩-2-羧酸肼		是
5	耐羟胺		是
6	耐对硝基苯甲酸		是
7	耐氯化钠		是
8	耐胺硫脲		是
9	耐苦味酸		是
10	耐油酸		是
11	过氧化氢酶试验		是
12	吐温 80 水解试验		是
13	尿素酶试验		是
14	烟酸试验		是
15	硝酸还原试验		是
16	酸性磷酸酶试验		是
17	芳基硫酸酯酶试验		是
18	吡嗪酰胺酶试验		是
19	α -酯酶活性试验		是
20	生长速度		是
21	铁离子吸收试验		否
22	亚硝酸盐还原试验		否
23	麦康凯琼脂培养基生长		否

	试验		
24	谷氨酸钠葡萄糖琼脂培养基生长试验		否
25	其他	其他	否

5.2.3 药敏实验

一些分枝杆菌具有致病性或条件致病性,细菌对常用抗结核药物和抗生素的药物敏感性检测是必要的。一般检测药物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

5.2.4 分枝菌酸特征

不同种类分枝杆菌具有特异性分枝菌酸组成特征,通过 HPLC 可检测,再与分枝菌酸标准数据库进行比对。

5.2.5 肽段组成特征

基质辅助激光解析电离/飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization/time of flight MS, MALDI-TOF-MS) 通过分析不同分枝杆菌的不同质/核比蛋白成分在真空电离过程中获得的特征性的蛋白谱,将分枝杆菌鉴定至种水平。

5.3 基因型特征分析

5.3.1 16S rRNA 和其他同源基因/序列分析

分枝杆菌菌种基因分析必须测定全长的 16S rDNA,同时还要全部或部分测定包括但不限于 hsp65、rpoB、ITS 序列及 sodA 等在内的不同的同源基因/序列。除了同源基因/序列的相似度直接比较外,还要绘制单个基因/序列和串联序列的进化树以分析分枝杆菌的进化位置。以上基因常用引物序列见表 2。

表 2 全长 16S rRNA、部分 *hsp65*、*rpoB*、*sodA* 基因引物序列

序列名称	上游序列	下游序列
部分 16S rRNA	27F (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')	907R (5' -GGTTACCTTGTACGACTT-3')
部分 <i>hsp65</i>	HSPF3 (5' -ATCGCCAAGGAGATCGAGCT-3')	HSPR4 (5' -AAGGTGCCGCGGATCTTGTT-3')
<i>rpoB</i> III高可变区	MF (5' -CGACCACTTCGGCAACCG -3')	MR (5' -TCGATCGGGCACATCCGG -3')
ITS	ITS1-1511F (5' -AAGTCGTAACAAGGTARCCG-3')	ITS1-23R (5' -TCGCCAAGGCATCCACC-3')
<i>sodA</i>	Sod A-F (5' - GGCCAGGTTCTTCTCGTTCA -3')	SodA-R (5' - CGCCGCATATGTCAAAGGTG -3')

5.3.2 DNA-DNA 杂交和 ΔT_m 值

细菌种类的定义依靠 DNA-DNA 杂交实验结果及 ΔT_m 值。根据细菌分类方法协调特别委员会标准：新菌种的定义是待测菌株与已知菌种的 DNA 相似度小于 70%，且 ΔT_m 值大于 6℃。DNA-DNA 杂交实验可以在滤膜或溶液中进行，但是复性温度受很多因素影响，分析同源性时必须谨慎。

5.3.3 使用全基因组数据进行原核生物分类标准(附录 B)

全基因组测序已逐步取代 DNA-DNA 杂交分析，成为分枝杆菌菌种分类的金标准。目前，公认的新菌种鉴定的指标主要包括平均核苷酸同一性(average nucleotide identity, ANI)和数字化 DNA-DNA 杂交预测值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)。在获得符合原核生物鉴定的全基因组序列后，ANI 可通过网站(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>)计算；dDDH 采用 Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)和 formula 2 计算。公认的 ANI 临界值为 95%~96%，ANI 小于 95%可定义为新菌种，ANI 为 95%~96%时，疑似为新菌种，需要采用 dDDH 进行核实，若 dDDH<70%可定义为新菌种。

6 分枝杆菌新菌种的保藏

发表一个分枝杆菌新菌种前，必须将该菌种的标准菌株提前保存到 2 个不同国家和地区的国际性菌种保藏中心，并获得由菌种保藏中心提供的英文的馆藏证明。一些具有国际影响力的菌种保藏中心及其缩略名称如下：

ATCC: 美国典型菌种保藏中心;
CCTCC: 中国典型培养物保藏中心;
CCUG: 瑞典哥德堡大学菌种保藏中心;
CDC: 美国疾病预防控制中心;
CECT: 西班牙典型菌种保藏中心;
CGMCC: 中国普通微生物菌种保藏管理中心;
CIP: 法国巴斯德研究所菌种保藏中心;
CSUR: 法国立克次体株保藏中心;
DSM: 德国微生物菌种保藏中心;
HAMBI: 芬兰赫尔辛基大学农业和林业系应用化学和微生物部门菌种保藏中心;
INCQS: 法国国家卫生保健质量控制中心
JCM: 日本微生物保藏中心;
KCTC: 韩国典型菌种保藏中心;
NCTC: 英国国家典型菌种保藏中心;
LMG: 比利时根特大学微生物学实验室;
NBRC: 日本技术评价研究所生物资源中心;
NCCB: 荷兰细菌保藏中心;
NCIMB: 英国国家工业、食品、海洋细菌保藏中心;
VKM: 全俄微生物保藏中心;

国内的菌种保存机构有 CGMCC 和 CCTCC, 均为布达佩斯条约国际保藏单位, 能提供国际性的专利菌种保藏, 但涉及与人类疾病相关的医学菌种必须在 CMCC 保藏。

7 分枝杆菌新菌种命名

7.1 新菌种命名方法

分枝杆菌新菌种的命名遵从《国际原核生物命名守则》(International Code of Nomenclature of Prokaryotes)最新版本, 当前为 2008 修订版。文件规定所有的细菌菌种命名采用“双名”法则, 第一个词代表“属”, 第二个词为修饰词, 多为人名、地名或菌种特性描述性词语。亚种命名采用“三名”法则。中文译名参考中华医学会结核病学分会, 分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识编写组的《分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识》。

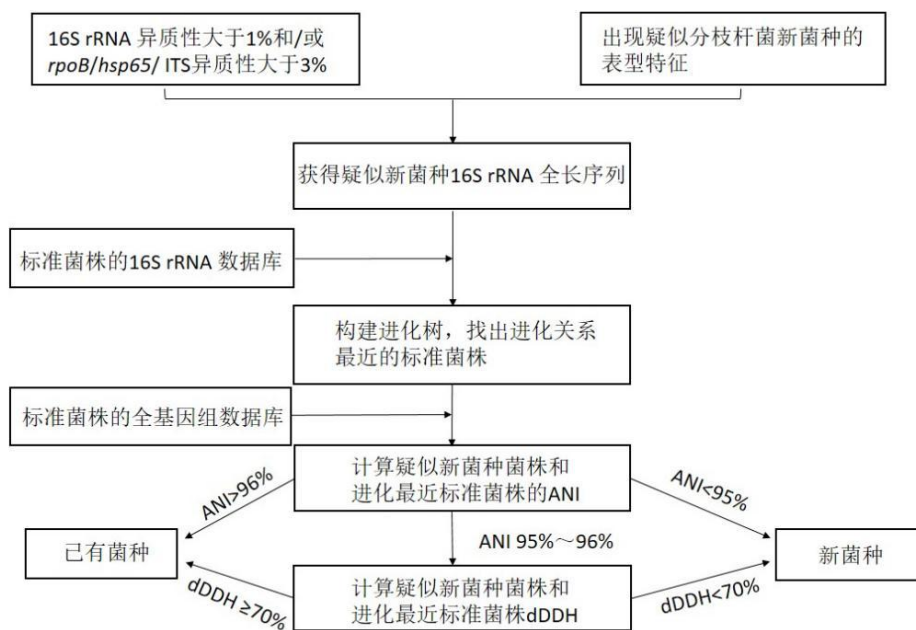
7.2 新菌种命名权的认定

按国际系统原核生物学委员会的规定，任何鉴定和命名的细菌的新分类单元，其相关论文都应该发表在《国际系统与进化微生物学杂志》(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)，如果在其他杂志发表，必须提交论文副本给该杂志公布。

附录 A

(规范性附录)

新菌种鉴定流程图



附录 B

(规范性附录)

使用全基因组数据进行原核生物分类标准

B.1 以分类为目的的基因组序列数据的最低标准

B.1.1 DNA 测序平台

尽管不同的微生物学分类标准对最终组装的重叠群的准确性和质量有不同的要求,但以分类为目的而产生的基因组序列也应用于其他领域,如环境和临床微生物学。目前,Illumina (美国)、Ion Torrent (美国 Thermo Fisher Scientific) 和 Pacific Biosciences (美国) 提供的 DNA 测序平台通常生成符合一般标准的 DNA 序列数据。任何其他未来可用的新一代测序(next generation sequencing, NGS)平台在用于原核生物分类学研究之前,都应该经过严格的评估。

B.1.2 原始 NGS 数据和组装基因组序列的质量

用于描述最终基因组组装的质量的统计参数,以确保基因组序列的质量适合分类目的。

B.1.2.1 基因组大小

基因组大小定义为所有重叠群(contigs)的长度总和。如果基因组序列未完全确定,则该值仅代表近似值。

B.1.2.2 片段重叠群的数量和 N50

基因组组装过程产生不同长度的重叠群。通常情况下,首先需要从最终装配中排除非常短的重叠部分。在选择片段重叠群方面没有明确的标准,单重叠群的数量不能很好地反映基因组序列的质量。可以使用已知的 N50 对最终组装进行更准确的评估。N50 定义为将重叠群的长度从最长到最短相加,累计 50%的最短重叠群长度。

B.1.2.3 测序覆盖深度

该值通常用 fold 来反映。这个统计数据可以在所有 DNA 测序平台上用适当的基因组组装软件进行测量。对于具有不同精度和读取长度的 NGS 平台,很难推荐单个值作为标准。理论上,生成的 fold 读取越多,组装的质量越好。建议将目前 NGS 平台(Illumina、Ion Torrent 和 Pacific Biosciences)的测序深度设置为 50× 及以上。

B.1.3 基因组组装的真实性

在基因组测序过程中，菌株及其基因组数据常常被错误地标记，导致错误的分类。这在一定程度上是因为基因组测序过程中的错误标记和污染的可能性相对较高。因此，需要核对获得的基因组序列是否确实属于正在研究的菌株。

因为几乎所有已知物种类型菌株的 16SrRNA (16S) 序列都是可用的，所以该基因可以用于确认最终基因组组装的真实性。对于系统发育学相近的 16S 序列非常相似的物种，*gyrB*、*rpoB* 和 *recA* 等蛋白质编码基因，可用于进一步支持基因组数据的真实性。为了实现这一点，应从基因组组装中提取全长 16S 或蛋白质编码基因。如果多个 rRNA 操纵子中的 16S 序列之间存在实质性差异，则应通过分子克隆和测序来解决这一问题。为了描述新菌种，应通过常规 Sanger 获得标准菌株的全长 16S 序列，并与从全基因组组装中提取的 16S 序列进行比较，以确保基因组数据的真实性。如果不能从基因组组装中提取全长 16S 序列，可以使用其他蛋白质编码基因代替 16S。但无论在哪种情况下，必须获得来自标准菌株的全长 16S 序列。

B. 1. 4 基因组组装中的污染

NGS 可以生成高通量数据，其测序覆盖深度比传统的 Sanger 测序更高。但缺点就是容易产生污染的 DNA 序列，即使是少量，也可能被纳入基因组组装中。由于在分枝杆菌领域中横向基因转移事件的发生频率不高，可使用蛋白质编码基因检查污染情况。

B. 2 测序数据的保存

由于基因组组装过程可能很难复制，应避免仅保存原始 NGS 数据（没有最终组装）。组装后的基因组数据应存入 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库。

B. 3 从公共领域选择参考基因组数据

目前，很多菌种可获得多个基因组序列。因此，选择质量最好的真实基因组序列进行 OGRI 和系统发育树分析非常重要。选择具有最佳质量的基因组序列的标准是依据 N50，N50 越大，基因组数据质量越高。此外，分类学研究中的参考基因组应该是被检测菌种的标准菌株。

AB. 4 分类目的的生物信息学

B. 4. 1 基因组数据识别新菌种

DDH 被定义为原核生物的物种边界，至今仍作为原核生物分类学的金标准。ANI 广泛应用于计算进化上相近菌种间的分类。ANI 的替代指标是 dDDH (Genome-to-Genome Distance Calculator)，可通过网站进行计算 (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)，也被广泛用于分类鉴定。ANI 和 dDDH 临界值分别定义为 95%-96% 和 70%，ANI < 95% 定义为新菌种，ANI 在 95%-96% 疑似为新菌种，需要采用其他指标进行核实；当 dDDH ≤ 70%，定义为新菌种。

B. 4. 2 基因组数据识别亚种

目前，尚无使用基因组数据定义亚种的指南，一般认为应该包括以下标准：（i）亚种和其他菌种之间的 ANI 应低于菌种水平的临界值；（ii）亚种之间的 ANI 应高于菌种水平的临界值；（iii）属于不同亚种的菌株应在基因组上一致，并通过 ANI 和系统发育树形成可区分的分支；（iv）亚种应通过足够数量的表型进行区分；（v）命名亚种应该有一个合理的理由来解释。

B. 4. 3 系统进化树

鉴于基因组序列中存在的大量信息，我们现在能够在不同的分类水平上探索更精确的系统发育关系。将基因组数据应用于系统发育分析，称为系统发育树，可以通过基于多个基因而不是单个基因（如 16S）推断系统发育树来实现。系统基因组学应该提供更好的分类框架，特别是在属和更高层次上。针对分枝杆菌常用的系统进化分析的基因包括 16S, rpoB, hsp65, rpsA。

参考文献

- [1]International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019, 69(1A):S1-S111.
- [2]VV Lévy-Frébault, F Portaeels. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1992, 42(2):315-23.
- [3]M I Popa, D Stavri, Henriette Stavri, Loredana Gabriela Popal, Ioana Mihai. Establishing of a minimal set of tests (minimal standards) to identify species included in the genus *Mycobacterium*. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2006, 65(1-2):41-5.
- [4]中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 中国教育文化出版社, 2006年1月第1版.
- [5]Konstantinos T Konstantinidis, Alban Ramette, James M Tiedje..The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006, 361(1475):1929-1940.
- [6]Erko Stackebrandt, Wilhelm Frederiksen, George M Garrity, Patrick A D Grimont, Peter Kämpfer, Martin C J Maiden, Xavier Nesme, Ramon Rosselló-Mora, Jean Swings, Hans G Trüper, Luc Vauterin, Alan C Ward, William B Whitman. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002, 52(Pt 3):1043-1047.
- [7]Johan Goris, Konstantinos T Konstantinidis, Joel A Klappenbach, Tom Coenye, Peter Vandamme, James M Tiedje. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007, 57(Pt 1):81-91.
- [8]Enrico Tortoli, Thomas A Kohl, Barbara A Brown-Elliott, Alberto Trovato, Sylvia Cardoso Leão, Maria Jesus Garcia, Sruthi Vasireddy, Christine Y Turenne, David E Griffith, Julie V Philley, Rossella Baldan, Silvia Campana, Lisa Cariani, Carla Colombo, Giovanni Taccetti, Antonio Teri, Stefan Niemann, Richard J Wallace Jr, Daniela M Cirillo. Emended

description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016, 66(11):4471–4479.

[9] Jongsik Chun, Aharon Oren, Antonio Ventosa, Henrik Christensen, David Ruiz Arahal, Milton S da Costa, Alejandro P Rooney, Hana Yi, Xue-Wei Xu, Sofie De Meyer, Martha E Trujillo. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018, 68(1):461–466.

[10] Tomohiko Tamura, Tetsuhiro Matsuzawa, Syoko Oji, Natsuko Ichikawa, Akira Hosoyama, Hiroshi Katsumata, Atsushi Yamazoe, Moriyuki Hamada, Ken-ichiro Suzuki, Toru Gono, Nobuyuki Fujita. A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012, 102(3):481–491.

[11] 中华医学会结核病学分会, 分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识编写组. 分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识. *中华结核和呼吸杂志.* 2018, 41(7):522–528.

[12] Jongsik Chun, Aharon Oren, Antonio Ventosa, Henrik Christensen, David Ruiz Arahal, Milton S da Costa, Alejandro P Rooney, Hana Yi, Xue-Wei Xu, Sofie De Meyer, Martha E Trujillo. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018, 68(1):461–466.

S 号

中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CHATA XXX-XXXX

结核病相关临床样本保藏标准

Storage regulation of Clinical Specimen of tuberculosis

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

中国防痨协会发布

目录

前言	3
1 范围	4
2 规范性引用文件	4
3 术语和定义	4
4 标准制定原则	6
5 生物安全管理原则	6
6 人类遗传资源采集与保藏备案原则	6
7 样本采集	6
7.1 基本要求	7
7.2 样本采集时间	7
7.3 温度	7
7.4 样本的采集程序	7
8 样本运输	12
8.1 院内运输	12
8.2 院外运输	12
9 样本验收与登记	14
9.1 信息记录	14
9.2 样本标识	14
10 样本实验室处理和保存/保藏	14
10.1 血清标本	14
10.2 外周血单个核细胞	15
10.3 细胞冻存	18
10.4 细胞复苏	20
10.5 血细胞 DNA 提取	22
10.6 痰标本的处理与保存	24
10.7 尿液标本的处理与冻存	25
10.8 体液标本（如胸水、腹水、脑脊液、脓液等）的处理与保存	26
10.9 消化道标本的处理与保存	27

10.10 结核分枝杆菌的收集与保存	27
10.11 结核分枝杆菌菌株 DNA 的提取及保存	28
10.12 结核分枝杆菌的复苏	30
11 样本的分装	30
12 存储样本的质量控制	30
12.1 固体标本	31
12.2 组织切片	31
12.3 液体样本	31
12.4 细胞样本	31
12.5 微生物样本	31
12.6 生物分子样本	31
13 废弃样本的处理	32
13.1 基本准则	32
13.2 处置要求	32
附录 A	33
参考文献	34

前言

本标准依照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件结构和起草规则》的规定起草。

本标准由中国防痨协会归口。

本文件起草单位：首都医科大学附属北京胸科医院、中国疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京儿童医院、解放军总医院第八医学中心、上海肺科医院、上海疾病预防控制中心、天津海河医院、湖南省胸科医院、福州肺科医院、河南省胸科医院、武汉肺科医院、河北省胸科医院、遵义医学院附属医院

本文件主要起草人：黄海荣、姜广路、张宗德、孙照刚、王桂荣、赵雁林、夏辉、霍凤敏、于霞、陈素婷、车南颖、申阿东、吴雪琼、余方友、沈鑫、张丽霞、谭云洪、黄明翔、王伟、刘冠、郑立恒、宗兆婧。

结核病相关临床样本保藏标准

1 范围

本标准规定了结核病相关临床生物样本保藏的技术规范，涉及多领域的技术和规范。本标准规定了结核病临床生物样本保藏的相关设备、设施及环境的要求，样本采集、样本处理、贮存及管理的相关要求。本标准适用于开展结核病生物样本保藏和保存的各级各类卫生机构。

2 规范性引用文件

临床生物样本的保藏和保存要符合国家相关规范。按照国际通用惯例，文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准，其随后所有的修改单或修订版均不适用于本标准，根据本标准建设的临床生物样本库支持使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

中华人民共和国主席令 中华人民共和国生物安全法

ISBN 7564105836 全国临床检验操作规程（第三版）

GB/T 37864-2019 生物样本库质量和能力通用要求

ISBN 7801941950 临床技术操作规范病理学分册

HJ 628-2011 生物遗传资源采集技术规范（试行）

GB 50346-2012 实验室建筑技术规范

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

CNAS-CL05-2009 实验室生物安全认可准则

GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 18883-2002 室内空气质量标准

MH/T 1019-2005 民用航空危险品运输文件

GB/T 5458-2012 液氮生物容器

WS/T 224-2002 真空采血管及其添加剂

GB/T 20269-2006 信息安全技术信息系统安全管理要求

GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写

GB/T 12905-2000 条码术语

GB/T 17172-1997 四一七条码 GB/T 18347-2001 128 条码

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 标本 Specimen

在某特定时间从受试者或捐献者采集到的组织、血液等标本。

3.2 样本 Sample

从人体、动物、植物、微生物或非动物/植物类的多细胞生物（如棕色海藻和真菌）等生物体获得或衍生的任意物质。（ISO 20387, 3.7）

3.3 临床生物样本库 Clinical Specimen bio-bank

开展生物样本保藏的合法实体或其部分（ISO 20387, 3.5），临床生物样本库包含其地理位置以及与其运营相关的所有活动。

3.4 捐赠者 Donor

按照法律规定、医学标准和程序提供作为样本的人或尸体。有的国家用“受试者”或“个体”来表示捐赠者，尤其是在涉及到人体样本的时候。

3.5 知情同意 Informed consent

有完全行为能力的个人获取必要信息并充分理解其内容，经考虑后作出参与研究的决定。此决定不受恐吓、利诱或其他不当行为的影响。

3.6 知情同意书 Writtern Consent

捐赠者或其法定监护人表示自愿捐赠个体生物样本而签署的文件。

3.7 采集 Collection

是指获取某个样本的过程或技术，也可以指已经明确研究目的而经过特别方法获取的一个或多个样本。

3.8 保存 Storage

在样本处理和贮存过程中通过使用化学试剂，改变环境条件或者其他手段来防止或延缓样本生物或物理性能的退化。

3.9 分装 Aliquot

是指将样本分成几份并贮存到单个容器中的过程，分装后的样本即成为独立的样本个体，“分装”一词也可以作为名词用来表示一个样本。

3.10 分发 Allocation

是指从样本申请单的接受、样本选择、最终核查、到运输至另一临床生物样本库、样本采集中心或实验室的过程。

3.11 标签 Label

任何写在、印在或贴在样本容器或包装上的手写、印刷或图形文字或材料。

3.12 标识符/识别信息 Labelled information/ Recognizable information

可以识别主体的信息，例如姓名、社保号码、医疗记录或病理号码等。对于某些样本，这些信息可能包括分类学上的名称和收集时的编号。

3.13 玻璃化温度 Temperature of glassify

是指液态物质转变为玻璃化状态的一个特定的温度，在此温度点，物质的黏稠度大大增加，以至于看起来象是处于固体状态。由于极高的黏稠度，物质分子因活动性大大降低而出现分子重组，同时也就显著减缓了物质原来因各种反应而变性的速度。

3.14 校准 Calibration

将测量仪器的输出或指示值调整到一定的精确度范围内并与所提供的标准值一致的过程。

3.15 冷链 cold-link

对温度进行恒定控制的供应链。

3.16 匿名 Anonymous

不收集与样本相关的可识别的个人信息，或是收集的相关数据被隐藏而不能检索，这样就无法追踪到样本来源。

3.17 前瞻性 Prespectiveness

按照现行确定的研究目的而后进行的研究或收集数据方式。

3.18 容器 Container

用来放置一个或多个样本的贮存器。

3.19 无菌 Sterilized

无任何活性污染微生物的存在。

3.20 个人防护装备 Personal protection equipment (PPE)

防止人员个体受到生物性、化学性或物理性等危险因子伤害的器材和用品。

3.21 生物危险 Bio-hazard

因生物因子导致的直接或潜在的危險。

3.22 新鲜冰冻组织 Fresh frozen tissue

未经试剂处理而在规定的时间内冷冻储存的组织样本。

4 标准制定原则

- 4.1 所有存在生物安全风险操作均应该符合《中华人民共和国生物安全法》及生物安全相关法规、条例的各项要求。
- 4.2 在生物样本保藏之前，需按照规范要求在中国人民共和国科学技术部提交人类遗传资源采集审批并得到批准。
- 4.3 进行任何临床标本采集都必须取得捐赠者的知情同意书，除非伦理委员会根据适当的法律及法规确定或特定情形可以豁免。
- 4.4 临床生物样本必须对样本和数据均进行匿名化处理，除非经伦理审查委员会批准样本使用者可以访问捐赠者的身份信息，否则捐赠者的身份信息必须在样本提供给使用者之前删除。
- 4.5 临床生物样本和相关数据的采集、贮存和使用必须需建立在对个体的尊重、隐私的保护和保密的基础上。样本的国际共享需遵循涉及国家的法律和政策。

5 生物安全管理原则

- 5.1 确保所开展操作的生物安全风险等级与实验室生物安全等级相匹配。
- 5.2 生物样本的操作均要符合与结核病相关的生物安全操作规范。
- 5.3 建立生物安全保障制度，注重对所有相关人员开展生物安全培训。
- 5.4 建立生物安全风险评估体系，随时监测和分析生物安全隐患并采取防护措施。

6 人类遗传资源采集备案

根据《中华人民共和国行政许可法》主席令第 7 号（2003 年 8 月）和《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》国令第 717 号（2019 年 5 月）的规定，凡在中国境内开展中国人类遗传资源活动前，均需要在中华人民共和国科学技术部（<https://www.most.gov.cn/index.html>）网站提交采集保藏审批申请，获得批准后方可开展相关活动。保藏是指将来源合法的人类遗传资源保存在适宜环境条件下，保证其质量和安全，用于未来科学研究的行为，不包括实验室检测后按照法律、法规要求或临床研究方案约定的临时存储行为。

7 样本的采集

7.1 基本要求

- 7.1.1 样本的采集和处理应有专属场地，禁止场地兼作办公使用。
- 7.1.2 采集人员应经过职业道德规范和伦理规范的培训，切实保护被捐赠者的隐私，严格遵守医院和临床生物样本库的各项规章制度。
- 7.1.3 样本的捐赠必须经由捐赠者知情同意，每份样本都有对应的《泛知情同意书》。

7.2 样本采集的时间

根据不同的研究应用目的，标本采集和处理的时间节点的重要性有所不同。当标本处于缺血或离体状态时，应尽快贮存于低温环境下。需对采集、处理、贮存、运输过程进行记录。

7.3 温度

标本采集后至运送前时间和温度的控制极其重要，应根据标本采集类型和后续开展研究内容决定样本采集、处理和贮存的适宜温度。采集和处理时间应记录在案，并提供给最终用户。

7.4 样本的采集程序

参照临床标本的采集标准流程，见附件 1。

8 样本运输

8.1 院内运输

新鲜标本采用常温或冷藏运输，运输介质为冰袋，一般用于医院内、短时间、近距离运输。

8.2 院外运输

结核分枝杆菌属于《人间传染的病原微生物名录》（卫生部，2006）中第三类病原微生物，其相关的生物样本的运输包装分类为 A 类的病原微生物菌（毒）种或样本，以及疑似高致病性病原微生物菌（毒）种或样本按照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（卫生部，2005）进行申请、包装和运输。

8.2.1. 申请

(1) 申请文件：

从事疾病预防控制、医疗、教学、科研、菌（毒）种保藏以及生物制品生产的单位，因工作需要，可以申请运输高致病性病原微生物菌（毒）种或样本。申请运输高致病性病原微生物菌（毒）种或样本

的单位（以下简称申请单位），在运输前首先向省级卫生行政部门提出申请，并提交以下六项申请材料（原件一份，复印件三份）：

- a. 可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输申请表；
- b. 法人资格证明材料（复印件）；
- c. 接收高致病性病原微生物菌（毒）种或样本的单位（以下简称接收单位）同意接收的证明文件；
- d. 接收单位证明文件复印件（包括：1、法人资格证书；2、从事高致病性病原微生物实验活动资格的实验室；3、取得有关政府主管部门核发的从事高致病性病原微生物实验活动、菌（毒）种或样本保藏、生物制品生产等的批准文件）。
- e. 容器或包装材料的批准文号、合格证书（复印件）或者高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输容器或包装材料承诺书；
- f. 其它有关资料。

(2) 批准单位

申请在省级行政区域内运输的，由省级卫生行政部门审批，符合要求的申请，在 5 个工作日内获得省级卫生行政部门颁发《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本准运证书》。申请跨省运输的，先由省级卫生行政部门进行初审，符合要求的上报国家卫生行政部门进行审批，并获得相关准运证书。

8.2.2. 包装

运输结核分枝杆菌菌株或可能含结核分枝杆菌样本的容器或包装材料应当达到国际民航组织《危险物品航空安全运输技术细则》（Doc9284 包装说明 PI602）规定的 A 类包装标准，符合防水、防破损、防外泄、耐高温、耐高压的要求，并应当印有卫生部规定的生物危险标签、标识、运输登记表、警告用语和提示用语。符合 UN2814 的包装可运输菌株和样本，符合 UN3373 要求的包装只能运输样本。

8.2.3 运输

经陆路运输高致病性病原微生物菌（毒）种或样本，至少 2 人护送。申请单位应当对护送人员进行相关的生物安全知识培训。需航空运输时，申请单位应当凭省级以上卫生行政部门或中国疾病预防控制中心核发的《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本准运证书》到民航等相关部门办理手续。通过民航运输的，托运人应当按照《中国民用航空危险品运输管理规定》（CCAR276）和国际民航组织文件《危险物品航空安全运输技术细则》（Doc9284）的要求，正确进行分类、包装、加标记、贴标签并提交正确填写的危险品航空运输文件，交由民用航空主管部门批准的航空承运人和机场实施运输。如需由未经批准的航空承运人和机场实施运输的，应当经民用航空主管部门批准。

9. 样本验收与登记

9.1 信息记录

样本发出人员、接收人员应做好样本交接的记录工作，记录内容包括但不限于：样本发送时间、样本清单、发送人、接收人、接收时间和运送条件，不合格样本及其处置信息。

9.1.1 标本验收

标本送达实验室后按要求进行验收，验收内容包括但不限于：

- (1) 验收样本数量与所填写数量是否一致；
- (2) 样本标号是否清楚、与纸版记录（或电子记录）是否相符；
- (3) 样本是否新鲜；
- (4) 检查样本量及外观：外观质量如有无溶血、血清有无乳糜、抗凝血中是否有血块、容器有无破裂；
- (5) 样本采集及送达之间的时间间隔，必要时了解样本采集后的保存方法。

9.1.2 不合格标本处理

- (1) 对于不合格标本，如空管、样本太少、抗凝血凝固、严重溶血、采集管破裂、脂血样本，签收人有权拒收，同时注明拒收原因；
- (2) 对不合格但可以接受的样本，签收人记录样本缺陷，及时与病房沟通尽可能重新采集样本。

9.2 样本标识

样本标识应采用二维条形码，储存生物样品的每个容器应有唯一的，清晰明了的识别符号，能够牢固附着在容器上，并能耐受低温储存的条件。所有的相关信息能够和这个惟一的识别符相联系。

样本验收合格后，根据研究需求，生成、打印样本标签（与分装的样本类型、数量对应），并将标签贴到拟存放分装样本的容器表面。

10 样本实验室处理和保存/保藏

10.1 血清或血浆样本

10.1.1 试剂耗材

- (1) 无菌螺旋口耐低温血清冻存管
- (2) 吸管
- (3) MARK 笔
- (4) 移液器
- (5) 吸头

10.1.2 设备（应明确设备的关键技术指标）

- (1) 离心机
- (2) -80℃冷冻柜

10.1.3 处理方法

- (1) 真空采血管应一直保持封闭垂直位置直到离心取出血清或血浆，防止震荡过于剧烈造成溶血。
- (2) 血清（非抗凝血）或血浆（抗凝血）：采血后标本必须颠倒混合 5~10 次，非抗凝血室温静置 15~30 分钟后可自行完全凝固，禁用木棍和玻棒等剥离凝块。离心 2000 转/分钟（round per minute, rpm），10 分钟后分离血清或血浆至冻存管，每份标本按 200 μ l/管分装。
- (3) 标本冻存管按顺序分别放置各自的冻存盒中，置于-80℃冰箱保存。

10.1.4 注意事项

- (1) 血清中不能混有血丝、纤维丝

(2) 取到标本后短时间内处理

(3) 有可能含有 RNA 病原微生物的标本应存入-80℃冰箱，避免冻融，用于其他用途可酌情放置在-40℃冰箱保存。

10.2 外周血单个核细胞

10.2.1 工作原理

常用来分离人外周血单个核细胞(PBMC)的分层液比重是 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖(Ficoll)-泛影葡胺(Urografin) (F/H) 分层液。Ficoll 是蔗糖的多聚体，呈中性，假 W 水性高，平均分子量为 400,000，当密度为 1.2g/ml 仍未超出正常生理性渗透压，也不穿过生物膜。红细胞、粒细胞比重大，离心后沉于管底；淋巴细胞和单核细胞的比重小于或等于分层液比重，离心后漂浮于分层液的液面上，也可有少部分细胞悬浮在分层液中。吸取分层液液面的细胞，就可从外周血中分离到单个核细胞。

10.2.2 试剂耗材

(1) 比重 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺(商品名为淋巴细胞分离液)。

(2) 培养液 RPMI1640

(3) 10%小牛血清 RPMI1640

(4) 0.2%台盼兰染色液，用等渗的 PBS 配制。

(5) 15ml 及 50ml 一次性无菌尖底离心管

(6) 一次性塑料吸管(3ml)

(7) 一次性移液管(10ml)

10.2.3 设备(应明确设备的关键技术指标)

(1) 细胞计数板

(2) 显微镜

(3) 水平式离心机

(4) 生物安全柜

10.2.4 处理方法

(1) 依据所分得抗凝全血量取 15 ml 或 50 ml 离心管(10 ml 全血可用 15 ml 离心管\10 ml 以上全血可用多支 15 ml 离心管或 50 ml 离心管)，向管内加入淋巴细胞分离液，与全血的比例为 1:2。

(2) 左手将已加入淋巴细胞分离液的离心管与桌面成 45 度夹角，将混合均匀的抗凝全血用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上，注意保持清楚的界面。水平离心 2000rpm×20min。注意，离心机不能骤停，一定要关掉面板上的 BRAKE 键。

(3) 小心取出离心管，离心后管内分为三层，上层为血浆，下层主要为红细胞和粒细胞。中层为淋巴细胞分离液，在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带，单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞，还含有血小板。

(4) 用吸管小心吸取最上层的血浆，分装保存，在液面距云雾层 1cm 处停止吸取，注意不要干扰云雾状的 PBMC 层。

(5) 用毛细血管插到云雾层，吸取单个核细胞。置入另一灭菌的离心管中，加入 5 倍以上体积的 RPMI1640，

1500rpm×10 分钟，弃去上清，可见管底部乳白色的细胞团，将细胞团弹起，再次加入 10 ml RPMI1640，1500rpm×10min 洗涤细胞。

(6) 末次离心后，弃上清，弹起管底细胞团，加入含有 10% 小牛血清的 RPMI1640，重悬细胞。取 10 μ l 细胞悬液与 10 μ l 0.2% 台盼兰染液混合，于血球计数板上，计数四个大方格内的细胞总数，或使用细胞计数仪计细胞总数。

单个核细胞浓度(细胞数/1 毫升细胞悬液) = 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times 2$ (稀释倍数)

(7) 细胞活力检测：死的细胞可被染成蓝色，活细胞不着色。计数 200 个淋巴细胞。计算出活细胞百分率。

$$\text{活细胞百分率} = \frac{\text{活细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

(8) 预期收获：用本法分离 PBMC，健康者每毫升外周血可以分离得到大约 $(1 \sim 2) \times 10^6$ PBMC，纯度在 90% 以上，收获率可达 80~90%，活细胞百分率 > 95%。

10.2.5 注意事项：

- (1) 抽取人外周静脉血时要注意无菌操作，与抗凝剂充分混合。
- (2) 操作全程应尽可能在采血后 6 小时内完成，以免增加死细胞数。
- (3) 用淋巴细胞分离液分离 PBMC 时，离心机转速的增加和减少要均匀、平稳，以便保持清晰的界面。
- (4) 小鼠、兔等动物淋巴细胞比重与人不同，应配制相应密度的 Percoll 或不同比例的聚蔗糖和泛影葡胺。
- (5) 为减轻标本中红细胞浓度过高引起的聚集，改善分离效果，可用培养液对标本进行稀释；
- (6) 分离液与培养液在实验前恢复至室温，温度低可能影响分离效果，温度过高，细胞的活力受到影响而且容易导致红细胞聚集而影响分离。最佳温度为 18~20 摄氏度。

10.3 细胞冻存

10.3.1 工作原理

细胞冻存及复苏的基本原则是慢冻快融，实验证明这样可以最大限度的保存细胞活力。目前细胞冻存多采用甘油或二甲基亚砷 (DMSO) 作保护剂，这两种物质能提高细胞膜对水的通透性，加上缓慢冷冻可使细胞内的水分渗出细胞外，减少细胞内冰晶的形成，从而减少由于冰晶形成造成的细胞损伤。

10.3.2 试剂耗材

- (1) 吸头
- (2) 枪头
- (3) 移液管 (10ml)
- (4) 15ml U 形底离心管
- (5) 冻存管 (2ml)

- (6) 记号笔
- (7) 移液枪
- (8) 胎牛血清
- (9) 培养液 RPMI-1640
- (10) DMSO (分析纯)

10.3.3 设备（应明确设备的关键技术指标）

- (1) 超净台或生物安全柜
- (2) 离心机
- (3) 恒温水浴箱
- (4) 冰箱（-80℃）
- (5) 倒置相差显微镜
- (6) 液氮罐
- (7) 梯度降温盒

10.3.4 处理方法

- (1) 配制冻存生长液（含 10%DMSO 或甘油的胎牛血清）：DMSO 与胎牛血清 1：9 配制，混匀，4℃冰箱预冷备用。
- (2) 将梯度降温盒放置于 4℃冰箱预冷备用。
- (3) PBMCs 分离计数
- (4) 将悬起的细胞再次离心，1500rpmx5min，弃上清，弹起管底细胞团，加入适量配制好的冻存培养液，用吸管轻轻吹打混匀，细胞计数，调节使细胞最终密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ ；注意，尽量减少吹打次数，以免 DMSO 放热损伤细胞。
- (5) 将细胞分装入冻存管中，每管 1 ml；
- (6) 将冻存管放入梯度降温盒中，放入-80℃冰箱，过夜
- (7) 取出冻存管，移入液氮容器内。标记位置。
- (8) 冻存有效时间：细胞储存在-70 中可保存一年；细胞储存在液氮中（-196℃），理论上储存时间是无限长的。

10.3.5 注意事项

- (1) 在冻存细胞时细胞冻存液要经过预冷，避免 DMSO 放热对细胞造成损伤。
- (2) 冻存过程中温度的缓慢下降是细胞活性的良好保障，推荐使用梯度降温盒以保证细胞温度有规则的缓降，避免快速降温导致的细胞温度不均。

10.4 细胞复苏

10.4.1 工作原理

复苏细胞应采用快速融化的方法，这样可以保证细胞外结晶在很短的时间内即融化，避免由于缓慢融化使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤。

10.4.2 试剂耗材

- (1) 吸头
- (2) 枪头
- (3) 移液管 (10ml)
- (4) 15ml U形底离心管
- (5) 记号笔
- (6) 移液枪
- (7) 胎牛血清
- (8) 培养液 RPMI-1640
- (9) DMSO (分析纯)
- (10) R10 液 (胎牛血清与 RPMI-1640 9: 1 混合)

10.4.3 设备 (应明确设备的关键技术指标)

- (1) 超净台或生物安全柜
- (2) 离心机
- (3) 恒温水浴箱
- (4) 倒置相差显微镜

10.4.4 处理方法

- (1) 取出新鲜配置的 R10 液, 恢复至室温, 取一次性无菌 U 形管底离心管, 吸 9ml R10 液至管内备用。
- (2) 从液氮容器中取出细胞冻存管, 直接浸入 37℃ 温水中, 并不时摇动令其尽快融化。
- (3) 从 37℃ 水浴中取出冻存管, 迅速擦干外部水滴, 在生物安全柜内打开盖子, 用吸管吸出细胞悬液, 滴加到已注入 R10 液的离心管中, 混匀; 离心, 1500rpm, 5 分钟;
- (4) 弃去上清液, 弹起细胞团, RPMI-1640 10ml 洗涤细胞一次, 1500rpm, 5 分钟
- (5) 弃上清, 弹起细胞团, 加入含 10% 小牛血清培养液重悬细胞, 计数, 调整细胞密度, 培养箱内培养备用。

10.4.5 注意事项:

- (1) 将冻存管放入液氮容器或从中取出时, 要做好防护工作, 以免冻伤;
- (2) 冻存和复苏最好用新配制的培养液。

10.5 血细胞 DNA 提取

10.5.1 试剂耗材

- (1) 吸头
- (2) 枪头
- (3) 移液管 (10ml)
- (4) 15ml U形底离心管
- (5) 记号笔
- (6) 移液枪

10.5.2 设备 (应明确设备的关键技术指标)

- (1) 超净台或生物安全柜
- (2) 离心机
- (3) -20℃冰箱

10.5.3 处理方法

(1) 提取 PBMC 分离后，无菌吸管吸取红细胞上层的粒细胞层 3ml，置一新的无菌 15ml 尖底离心管中，加入红细胞裂解液 9ml，室温孵育 15 分钟，中间轻轻反转数次；（或浓缩白细胞 300 μL，红细胞裂解液按比例）

(2) 待离心管中液体透明清亮，水平离心机 1500rpm×15 分钟，弃上清，弹起管底细胞团，加入细胞裂解液 600；

(3) 吸取细胞裂解缓冲液 600 μL，加入 200 μL 蛋白沉淀液，充分混合；13000rpm 离心 15 分钟；

(4) 小心吸取上清液体到另一无菌尖底血清管中；

(5) 加入等体积的异丙醇，充分混匀，13000 rpm 离心 3 分钟；

(6) 弃上清液，加入 70%乙醇 200 μL；13000 rpm 离心 3 分钟；

(7) 弃上清，吸去残留液体；

(8) 加入纯水 100 μL；-20 度冰箱储存。

(9) 进行核酸含量检测。

10.6 痰标本的处理与保存

10.6.1 工作原理

用于长期储存的痰液标本不得以任何可能影响将来检测或诊断应用的方式消毒或处理。采集用于在样本库中储存的痰液标本建议使用痰消化液（主要成分为二硫苏糖醇，DTT）处理以降低痰液粘度，并可在消化液中长期储存。经终浓度为 0.01% 的 DTT 处理的标本可用于分析细胞壁成分和细胞因子，该浓度的 DTT 不会对之后的标本处理工作产生任何不利影响。

10.6.2 试剂耗材

- (1) 二硫苏糖醇（dithiothreitol, DTT）
- (2) 2.5mL 自立式刻度冷冻管
- (3) 无菌移液管，1mL 或 5mL
- (4) 移液器
- (5) -80℃冷冻柜
- (6) 2 英寸冷冻保存盒
- (7) 冷冻记号笔

10.6.3 处理方法

- (1) 制备 0.1% DTT 工作液方法一

a. 以无菌方式在 92.5 mL 无菌蒸馏水中加入一瓶 DTT 内容物（7.5 mL）。

b. 混合均匀，在容量瓶上标示试剂名称、配置浓度、制备日期和到期日期。

c. 工作液（0.1% DTT）应该立即使用，否则在 2-8℃ 下最长可储存 48 小时。

（2）制备 0.1% DTT 工作贮备液方法二

a. 取 10 mg DTT 溶解于 10 mL PBS 中（无菌，细胞级，pH 7.4±0.2）。

b. 过滤消毒，制备 1 mL 等分试样。

c. 工作液（0.1% DTT）在 2-8℃ 下最长 48 小时。

d. 注意：DTT 溶液易于氧化和失活，必须每天现配现用。制备的 0.1% DTT 溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤消毒后，可在 2-8℃ 下储存最长 48 小时。

（3）使用 DTT 处理痰液标本的程序

a. 准备并使用合适的标本条形码标签标示 4 个冷冻管。

b. 确定加入痰液标本的 DTT 工作液体积，得到最终浓度为 0.01% DTT。

c. 0.1% DTT 加入痰液的量为痰液总体积的十分之一。例如，每 1 mL 痰液加入 100 μL 0.1% DTT；或者，每 5 mL 痰液加入 500 μL 的 0.1% DTT。

d. 使用无菌移液管，在痰液标本中加入适量 0.1% DTT。DTT 溶液和痰液标本均必须处于室温下，以便有效地进行消化过程。

e. 漩涡振荡标本 20s。

f. 将标本放置于平台振荡器上，以 60 rpm 的速度机械振摇 20 分钟；

g. 使用无菌移液管，向每个预先标示的 2 mL 冷冻管中转移 1mL DTT 均匀痰液，制备等分试样。

h. 盖紧瓶盖并密封每个冷冻管。

i. 在 -80℃ 下储存痰液等分试样。

10.7 尿液标本的处理与冻存

10.7.1 试剂耗材

（1）标本条形码标签

（2）15mL 自立式刻度冷冻管，带外螺纹

（3）无菌移液管，5 mL 或 10 mL

（4）移液器

（5）-80℃ 冷冻柜

（6）离心管冷冻保存盒

（7）冷冻记号笔

10.7.2 处理方法

（1）尿液标本应该储存在 15ml 离心管的冷冻保存盒中，具有 6×6（36 孔）独立插入位置。

（2）使用合适的条形码标签标示冷冻管。

- (3) 分装之前充分混匀尿液，每 40ml 尿液中加入 1ml TE 缓冲液（0.5M EDTA -0.5M Tris-HCl, pH 8.5）。
- (4) 使用无菌移液管，在每一个冷冻管中分装 10ml（4 管）分装冻存。拧紧每一个盖子。
- (5) 确认每一个冷冻管均贴有合适的预先打印的条形码标签。
- (6) 将冷冻保存盒放置于-80℃冷冻柜中保存。

10.7.3 注意事项

- (1) 冻存需使用耐低温冻存盒，不建议使用泡沫制盒子，其在低温冷冻状态下被挤压容易开裂。

10.8 体液标本（如胸水、腹水、脑脊液、脓液等）的处理与保存

10.8.1 试剂耗材

- (1) 标本条形码标签
- (2) 2.5mL 自立式刻度冷冻管
- (3) 无菌移液管，1mL 或 5mL
- (4) 移液器
- (5) 2 英寸冷冻保存盒
- (6) 冷冻记号笔

10.8.2 设备（应明确设备的关键技术指标）

- (1) 生物安全柜
- (2) -80℃冷冻柜

10.8.3 处理方法

- (1) 在生物安全柜中分装体液样本，每管 1.5ml。
- (2) 盖紧瓶盖并密封每个冷冻管。
- (3) 在-80℃下储存体液等分样。

10.9 消化道标本的处理与保存

将新鲜样本置于内衬塑料包装的容器或不透水的贮存容器内，直接冷冻保存或分装后冷冻保存，新鲜胃液标本需要先进行中和后冷冻保存或分装后冷冻保存。

10.10 分枝杆菌的收集、保存和复苏

此标准中规定的分枝杆菌包括结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌，不同的菌种有类似的操作规范，但结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌的操作在生物安全防护级别存在差异，此外少数非结核分枝杆菌菌种需要特定的培养基、特定的培养温度（见附录）。以下方案以结核分枝杆菌为例，适用于多数非结核分枝杆菌。

10.10.1 试剂耗材

- (1) 标本条形码标签
- (2) 2.5mL 自立式刻度冷冻管
- (3) 无菌移液管，1mL 或 5mL

(4) 移液器

(5) 2 英寸冷冻保存盒

(6) 冷冻记号笔

(7) 7H9 冻存液 (含 20%甘油):称取 4.75 克 7H9 粉末, 200ml 甘油, 蒸馏水补齐至 900ml, 121℃, 15min 高压灭菌, 待温度降至 50℃, 加入 100ml OADC。置于 4℃ 冰箱冷藏保存待用。

(8) 油酸-白蛋白-右旋糖-过氧化氢酶 (Oleic acid-albumin-dextrose-catalase, OADC) 添加剂 (美国 BD 公司, 212351)。

10.10.2 设备 (应明确设备的关键技术指标)

(1) 生物安全柜

(2) -80℃ 冷冻柜

10.10.3 收集与保存方法

(1) 固态培养基生长的结核分枝杆菌

- a. 选取在固体培养基上生长良好的新鲜菌落 (生长周期不超过 2 个月, 初生长 2-3 周内的菌株状态最佳);
- b. 用刮菌环轻轻刮取罗氏培养基斜面上的菌落;
- c. 置于含有 3 滴 5% 的 Tween80 的磨菌瓶中, 研磨均匀后;
- d. 转入加有 1ml 20% 甘油的 7H9 培养液的冻存管中;
- e. 放置于 -80℃ 冷冻柜保存。

(2) 液体培养基生长的结核分枝杆菌

- a. 选取近期 (报告阳性不超过 2 个月) 液体培养报告阳性且初步鉴定为结核分枝杆菌复合群的培养管;
- b. 离心收集沉淀 (12000rpm, 5 分钟);
- c. 将菌落分散于含 5 mL Middlebrook 7H9 培养基 (加入高压消毒后的甘油至终浓度为 20%) 的试管中, 小心上下吹吸使溶液混合均匀;
- d. 每管 1 毫升分装后立即储存在 -80℃ 冷冻柜。

10.10.4 分枝杆菌的复苏

10.10.4.1 试剂耗材

(1) 中性罗氏培养基

(2) 无菌吸管

10.10.4.2 设备 (应明确设备的关键技术指标)

(1) 生物安全柜

(2) 37℃ 培养箱

10.10.4.3 处理方法

- (1) 取出 -80℃ 冰箱保藏的结核分枝杆菌菌株;
- (2) 37℃ 培养箱中回温 4h;

- (3) 吸取 100 μ l 结核分枝杆菌菌液，均匀接种至中性罗氏培养基斜面上；
- (4) 将接种后的罗氏培养基转移至 37℃ 培养箱温浴 4 周 $\pm$ 1 周至菌落生长。

10.11 分枝杆菌菌株核酸（DNA 和 RNA）提取及保存

10.11.1 试剂耗材

- (1) 标本条形码标签
- (2) 2.5mL 自立式刻度冷冻管
- (3) 无菌移液管，1mL 或 5mL
- (4) 移液器
- (5) 2 英寸冷冻保存盒
- (6) 冷冻记号笔
- (7) 天跟 DP302 DNA 提取试剂盒

10.11.2 设备（应明确设备的关键技术指标）

- (1) 生物安全柜
- (2) -80℃ 冷冻柜

10.11.3 处理方法

(1) 采用商品化 DP302 DNA 提取试剂盒（天跟生物技术有限公司）进行 DNA 的提取，操作步骤参考试剂盒说明书。

将收集到的 DNA 溶液分装至冻存管中，贴标签后放入 -80℃ 冷冻柜保存。

(2) 采用商品化 RNA 提取试剂盒（QIAGEN）进行 RNA 的提取，操作步骤参考试剂盒说明书。

10.12 组织标本的冻存

10.12.1 试剂耗材

- (1) 标本条形码标签；
- (2) 2.5mL 自立式刻度冻存管、15mL 无菌离心管；
- (3) 无菌用品：手套、纱布、剪刀、镊子、刀柄、刀片；
- (4) 移液器、刻度移液管
- (5) 2 英寸冷冻保存盒
- (6) 组织清洗液、组织保存液。

10.12.2 设备（应明确设备的关键技术指标）

- (1) 生物安全柜或无菌通风柜
- (2) -80℃ 超低温冰箱
- (3) 样本转运箱
- (4) 高压灭菌锅

10.12.3 处理方法

- (1) 手术标本由医院手术医生在术中切除，将切除后的组织样本放入 8 号无菌手套内并系好手套口；
- (2) 在无菌手套外再套一层 8 号无菌手套，确保样本无菌；
- (3) 将装有组织样本的无菌手套放入组织样本标本袋内，并在袋上标记受试者姓名、病案号，将组织样本标本袋放入样本转运箱，交给医院样本转运人员；
- (4) 医院样本转运人员将组织样本在 15-30 分钟内常温转运至医院病理科；
- (5) 对接收的样本进行核对和检查，进行姓名、科室、住院号及标本部位的核对和确认，无误后，接收标本；
- (6) 取材病理医师佩戴无菌手套在生物安全柜或无菌通风柜内对样本进行取材，
- (7) 将样本放入到相应的组织清洗液离心管内反复清洗三次，
- (8) 转移到已加入组织保存液的离心管中，做好标记。
- (9) 转移至冻存管中低温冻存，或直接用于组织细胞的后续分离培养等工作。

11 样本的分装

分装处理样本的实验室应符合 GB14189-2008《实验室生物安全通用要求》中生物安全实验室的要求。样本处理时应合理地分配有限的样本，并尽量保持样本原有的形态。每份完整或分装处理的样本都应分配条形码编号。

样本分装原则：

- (1) 应按原始样本的性质，控制原始样本从采集离体到开始处理的时间。
- (2) 完成处理的样本在储存前应选择适宜的分装量进行分装，满足使用要求的同时避免对生物样本的反复冻融。
- (3) 在处理前对样本进行必要的检测，以确定采集的样本是否满足要求及明确样本的一些特性和质量数据。
- (4) 对所有处理过程中和处理完成准备储存和使用的样本进行唯一性标识，确保其能追溯到采集的原始样本。

12 存储样本的质量控制

为保证保藏样本的质量，应定期随机抽检一定数量的样本，开展样本适宜的检测，以了解保藏样本的质量。通过抽检的方式反映同期同一类型标本的质量随报餐时间的延长的变化。目前还缺乏公认的样本抽取数量和周期的标准。可根据保藏标本的数量、标本来源的珍贵性、未来开展检测的目的等设置符合自身情况的抽检标本。可采用固定抽取比例、或是固定数量。

12.1 固体样本

固体组织样本应符合研究方案的需求，其质量控制应由病理学家、细胞生物学家或经过培训的专业人员完成。通过对样本的显微镜检查和对核酸以及蛋白质等特殊分子的检测进行质量控制。

12.2 组织切片

组织切片通过对肉芽肿百分比、干酪样坏死百分比、细胞结构和其他形态特征的检测来进行质量控制，并应由病理学家、细胞生物学家或经过培训的专业人员来完成。

12.3 液体样本

对于液体样本如血清、血浆、尿液、脑脊液等，对其中的特定物质实施检测以进行质量控制。用分子标记物来评估样本质量，如用血红蛋白来评估溶血情况。如果需要进行一个特定细胞因子的检测，新采集的样本也参考先前样本中该细胞因子水平来进行质量控制。

12.4 细胞样本

对于基本细胞培养基或者细胞系，主要控制细菌、真菌和病毒的污染。根据复苏后细胞活力或细胞悬浮液的纯度进行细胞样本的评估。

12.5 微生物样本

微生物样本通过其表型特征和功能分析等进行质量控制。对于微生物样本分类学鉴定，通过核糖分型或经典的生化试验等实现，将特定的微生物置于特定的培养基或特定的培养环境中培养，防止杂菌污染。

12.6 生物分子样本

生物分子如核酸样本和蛋白质样本通过凝胶电泳等检测 DNA、RNA 和蛋白质的完整性来进行质量控制。

13. 废弃样本的处理

13.1 基本准则

临床生物样本库存在生物安全风险的废弃物的处理和处置应符合国家或地方的法律和标准的要求。

13.1.1 处置废弃物的原则：

- (1) 将操作、收集、运输、处理和处置废弃物的危险降至最小。
- (2) 将其对环境的伤害降至最小。
- (3) 只使用规定的或者被认可的技术和方法处理和处置废弃物。
- (4) 废液排放应符合国家或地方的法律规定和标准。
- (5) 应有废弃物处理和处置的程序和操作规程，有能力采取措施处理和处置危险废弃物。
- (6) 应评估和避免废弃物处理和处置本身的风险。
- (7) 应根据废弃物的性质和危险性分类处理和处置。

13.2 处置要求

- (1) 样本和所有危险废弃物都应该装入适当的容器，锐器应置于锐器盒中。
- (2) 所有的尖锐废弃物应放入贴有生物危害标签的抗刺穿的容器，针头等尖锐废弃物不能重复使用。
- (3) 所有储存化学废弃物的容器必须能完全封闭且不能被损坏，根据内容物不能同能耐受不同的储存条件，特别是储存一些化学废弃物，不推荐使用软木塞或橡胶塞。
- (4) 标签上应提供废弃物信息，废弃物成份的通用名称，每种成份的大概百分比，不能使用缩写或商业名，不使用模糊的种类。
- (5) 液体废弃物容器只能允许装满 70-80% 的总容量，允许蒸汽膨胀，减少满载时溅出的可能。废弃物的

处理可以使用高温高压灭菌或者加入化学消毒剂，应避免处理时产生气溶胶或液体溅出。

（6）危险化学废弃物不能和一般垃圾混在一起，需要特殊处理的有机过氧化物，需要和其他废弃物分离。只含危险化学品的废弃物应交专业处理机构处理。

（7）所有含有生物样本的废弃物都被认为有生物危险性，应进行 121 摄氏度 15 分钟高压蒸汽灭菌处理后，装入黄色医疗垃圾袋，交医疗废弃物处理专业机构处理。

（8）高压后废弃物应该被储存在集中存放废弃物的设施中。

附录 A

(规范性附录)

附录 1

临床标本采集的标准工作程序

1. 血液标本采集程序

(1) 定义

静脉或动脉穿刺血液标本 (Blood specimens): 从病人静脉或动脉穿刺获取的可提供的用于血生化检验或医学研究的血液标本。

添加剂 (additive): 除采血管的管壁和管盖上的涂料外, 以实现某种目的为目标, 在血标本采集过程中加入采血管中的有效化学成分。常用的添加剂成分有惰性分离胶和促凝剂、肝素、枸橼酸钠、EDTA 等。

(2) 血液采集步骤:

- a. 采血前准备: 核对样本采集名单及受试者姓名, 向受试者解释操作目的并取得合作, 在采血管上贴好与采集记录相对应的标签。
- b. 穿戴工作服、口罩、帽子, 手消毒、戴无菌手套。
- c. 选择血管, 常用肘窝静脉、肘正中静脉、前臂内侧静脉。
- d. 在穿刺部位肢体下放一次性垫巾、止血带。
- e. 用符合碘棉签消毒穿刺部位。
- f. 在静脉穿刺部位上方 4-7 厘米处扎止血带, 嘱受检者握紧拳头, 使静脉充盈显露。
- g. 穿刺: 摘掉静脉穿刺针上的保护套, 以左手固定受试者前臂, 右手拇指和食指持穿刺针, 沿静脉走向使针头和静脉成 30° 角, 快速刺入皮肤, 然后成 5° 角向前刺破静脉壁进入静脉腔, 见回血后将刺塞针端 (用橡胶管套上的) 直接穿刺作好标记的真空采血管中央的胶塞, 血液自动流入试管内, 如需多管血样, 将穿刺端拔出, 刺入另一做好标记的负压真空管即可。达到采血量后, 松开压脉带, 嘱受检者松拳, 拔下刺塞端的采血试管。用消毒干棉签压住穿刺孔, 拔出针头, 嘱受检者继续按压 3~5 分钟, 勿揉。
- h. 若一次采集血需要采集多项标本时, 推荐采血顺序为: ①血培养管; ②无添加剂管; ③凝血试验管; ④有添加剂的管依次为: 枸橼酸钠管、肝素管、EDTA 管。将收集到的血液分装至冻存管中, 贴标签后放入 -80°C 冰箱入库保存。
- i. 注意事项: ① 提前一天的晚餐应当避免饮酒、禁食高脂肪、高蛋白饮品, 禁食咖啡、浓茶、高糖及可乐类饮料, 避免剧烈运动; ②在平静状态抽血, 避免情绪激动; ③禁止从输液三通管采血; ④

应在输液结束 30 分钟以后再采血，避免从正在输液的肢体上采血。

2. 痰标本采集程序

(1) 定义

即时痰：就诊时深呼吸后咳出的痰液；

晨 痰：患者晨起后，立即用清水漱口后，咳出的第 2 口、第 3 口痰液；

夜间痰：送痰前一日，患者晚间咳出的痰液。

(2) 痰液采集步骤：

- a. 留痰前准备：核对样本采集名单及受试者姓名，向受试者解释操作目的及留取方法并取得合作，在留痰管上贴好与采集记录相对应的标签。
- b. 穿戴工作服、口罩、帽子，手消毒、戴无菌手套，将留痰管交与受试者。
- c. 受试者以复方硼砂溶液漱口。
- d. 深呼吸 2-3 次，每次用力呼出。
- e. 从肺部深处咳出。
- f. 将打开盖的留痰管靠近嘴边收集痰液。
- g. 拧紧管盖。
- h. 将收集到的 DNA 溶液分装至冻存管中，贴标签后放入-80℃冰箱入库保存。
- i. 注意事项：当患者咳嗽、咳痰时，易产生含有结核菌的气溶胶，感染周边人气的几率较高，故采集痰标本的地点应选择远离人群的开放空间，或通风良好的留痰室。

3. 胸水标本采集程序

(1) 定义

胸水：又称胸液，胸膜渗出液。正常情况下，胸膜腔两层胸膜间内含浆液，约为每公斤体重 0.1～0.2ml，通常无色、透明，起润滑胸膜作用，它的渗出和再吸收处于平衡状态。任何因素造成其渗出增加和(或)再吸收减少，即出现胸膜腔内液体积聚，形成胸腔积液。

(2) 胸水采集步骤：

- a. 经 X 线摄胸片，B 超或 CT 定位胸水量，定位进针点，进针深度。
- b. 向受试者解释操作目的及注意事项并取得合作。
- c. 穿戴工作服、口罩、帽子，手消毒、戴无菌手套。
- d. 穿刺点周围，以 10～15cm 为半径，圈状常规消毒、盖洞巾，用 2%利多卡因自皮肤到椎间韧带做逐层局部麻醉。
- e. 根据穿刺点及进针深度进针，抽出液体后，固定穿刺针，连接一次性无菌引流袋。
- f. 引流袋悬挂在低于患者身旁作持续性体位引流。
- g. 待胸水不在流出后，拔出穿刺针，覆盖消毒纱布，用胶布固定。
- h. 将收集到的胸水分装至冻存管中，贴标签后放入-80℃冰箱入库保存。

i. 注意事项:

- 1) 穿刺后, 患者不能咳嗽, 以免咳嗽中肺部收缩, 引起穿刺针划伤肺部;
- 2) 穿刺时患者如出现晕眩、恶心、心悸等症状时, 立即停止操作, 并作相应的处理。

4. 脑脊液标本采集程序**(1) 定义**

脑脊液: 也称脑脊髓液, 是充满在脑部内颅骨与大脑皮质之间的蛛网膜下腔的透明体液, 即位于脑膜的蛛网膜和软脑膜之间的透明液体。

(2) 脑脊液采集步骤:

- a. 向受试者解释操作目的及注意事项并取得合作。
- b. 穿戴工作服、口罩、帽子, 手消毒、戴无菌手套。
- c. 患者侧卧于硬板床上, 背部与桌面垂直, 头部尽量向前胸屈曲, 两手抱膝紧贴腹部, 使躯干尽可能呈弓形; 或由助手在术者对面用一手挽患者头部, 另一手挽双下肢腘窝处并用力抱紧, 使脊柱尽量后凸以增宽椎间隙, 便于进针。
- e. 确定穿刺点, 通常以双侧髂棘最高点连线与后正中线的交汇点为穿刺点, 此处相当于第 3~4 腰椎棘突间隙, 有时也可以在上一或下一腰椎间隙进行。
- f. 穿刺点周围常规消毒、盖洞巾, 用 2%利多卡因自皮肤到椎间韧带做逐层局部麻醉。
- g. 术者用左手固定穿刺点皮肤, 右手持穿刺针以垂直背部、针尖稍斜向头部的方向缓慢刺入, 成人进针深度约为 4~6cm, 儿童约 2~4cm。当针头穿过韧带与硬脑膜时, 有阻力突然消失感。此时可将针芯慢慢抽出 (以防脑脊液迅速流出, 造成脑疝), 可见脑脊液流出。
- h. 放液前先接上测压管测量压力。正常侧卧位脑脊液压力为 70~180mmH₂O (0.098Kpa=10mmH₂O) 或 40~50d/分。若继续做 queckenstedt 试验, 可了解蛛网膜下腔有无阻塞。即在测初压后, 由助手先压迫一侧颈动脉约 10s, 再压另一侧, 最后同时按压两侧颈动脉。正常时压迫颈动脉后, 脑脊液压力立即迅速升高一倍左右, 解除压迫后 10~20s, 迅速降至原来水平, 称为梗阻试验阴性, 表示蛛网膜下腔通畅; 若压迫颈动脉后, 不能使脑脊液压力升高, 则为梗阻试验阳性, 示蛛网膜下腔完全阻塞。若施加压力后缓慢上升, 放松后又缓慢下降, 示有不完全阻塞。但是。颅内压增高者, 禁做此试验。
- i. 撤去测压管, 收集脑脊液 2~5ml, 用无菌试管留标本。
- j. 术毕, 将针芯插入后一起拔出穿刺针, 覆盖消毒纱布, 用胶布固定。
- k. 去枕平卧 4~6 小时, 以免引起术后低颅压头痛。
- l. 将收集到的脑脊液分装至冻存管中, 贴标签后放入 -80℃冰箱入库保存。
- m. 注意事项:
 - ①严格掌握禁忌症, 凡疑有颅内压力升高者必须先做眼底检查, 如有明显视乳头水肿或有脑疝先兆者, 禁忌穿刺。凡患者处于休克、衰竭或濒危状态以及局部皮肤有炎症、颅后窝有占位性病变者均

列为禁忌；②穿刺时患者如出现呼吸、脉搏、面色异常等症状时，立即停止操作，并作相应的处理；③鞘内给药时，应先放出等量脑脊液，然后再等量置换性药液注入。

5. 支气管肺泡灌洗液标本采集程序

(1) 定义

支气管肺泡灌洗术（bronchoalveolar lavage, BAL）是应用纤维支气管镜进行支气管肺泡灌洗，采取肺泡表面衬液进行炎症与免疫细胞及可溶性物质检查的方法。

支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage Fluid, BALF）：通过支气管肺泡灌洗术获得的液体。

(2) 支气管肺泡灌洗液采集步骤：

- 取支气管肺泡灌洗液前准备：核对样本采集名单及受试者姓名，向受试者解释操作目的及留取方法并取得合作。
- 穿戴工作服、口罩、帽子，手消毒、戴无菌手套，将留痰管交与受试者。
- 受试者进行局部麻醉。
- 将纤维支气管镜插入右肺中叶或左肺舌段的支气管，将其顶端契入支气管分支口。
- 经气管活检孔缓缓少入 37℃ 灭菌生理盐水，每次 30～50ml，总量 100～500ml，不应超过 300ml。
- 每次注液后以 -13.3～-19.95kpa 负压吸出，要防止负压过大，过猛。

6. 组织样本，如活检组织、手术组织等采集程序

在手术采集样本时，应注意不能对病理诊断及治疗造成影响。诊断后剩余的手术样本可以被采集。经伦理委员会批准和患者知情同意，可以切取特定部分样本用做研究。样本从外科到病理科或到临床生物样本库的运送过程中应保持样本新鲜而无需固定，并将样本装在与无菌的容器里且置容器于冰上（2～8℃）。除非研究人员有特殊要求，否则组织样本一般直接放在有标签的、配有生物低温介质的无菌容器里并移交给临床生物样本库处理。监督样本的采集或活检过程，样本的特征应记录并保存，使终端用户能够借此判断组织的有效性。

7. 尿液采集程序

(1) 定义

尿(Urine)：又称尿液或小便，是人类和脊椎动物为了新陈代谢的需要，经由泌尿系统及尿路排出体外的液体排泄物。

(2) 尿液的采集步骤：

- 打开尿液采集容器（120ml 尿液采集广口容器）。
- 不得接触杯子或杯盖内侧。
- 将第一段尿液排到厕所内。
- 在容器中收集中间（中段）尿标本。
- 拧紧容器上的盖子。

8. 便标本采集程序

采集新鲜便标本收集于无菌容器中。

9. 其它类型标本采集程序

如心包积液、腹水、拭子、骨髓等，依照卫生管理部门发布的标准文件进行采集。

附录 2

临床常分离的非结核分枝杆菌菌种的培养条件

分类	细菌学名	常用培养基	生长温度	代期？或其它特殊情况需要描述
慢生长分枝杆菌	结核分枝杆菌			
	牛分枝杆菌			
	鸟分枝杆菌			
	胞内分枝杆菌			
	堪萨斯分枝杆菌			
	戈登分枝杆菌			
	瘰癧分枝杆菌			
	苏尔加分枝杆菌			
	蟾分枝杆菌			
	海			
	溃疡			
快生长分枝杆菌	脓肿			
	龟			
	偶发			

参考文献

- [1] Global Laboratory Initiative. GLI model TB diagnostic algorithms. Geneva: Global Laboratory Initiative. 2017.
- [2] WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [3] WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [4] World Health Organization. Use of liquid TB Culture and Drug Susceptibility Testing (DST) in Low and Medium Income setting:2007.
- [5] Definitions and reporting framework for tuberculosis - 2013 revision (updated December 2014) [WHO/HTM/TB/2013.2]. Geneva, Switzerland: WorldHealth Organization; 2013.
- [6] World Health Organization. Using the Xpert MTB/RIF assay to detect pulmonary and extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and children: 2013.
- [7] WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [8]The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin. Policy update. Geneva: World Health Organization; 2016
(<https://www.who.int/publications/guidelines/tuberculosis/en/>,accessed 28 May 2020).
- [9]李仁忠, 王黎霞. 实验室新技术用于耐药结核病诊断流程的建议. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39 (7) :568-569.

7. 相关文件

记录单见 BBCR-BJCH-TR-4-024-2.0

8. 参考标准和文献

- 8.1. 《病原微生物实验室生物安全管理条例》国务院 2004 年 424 号令
- 8.2. 《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》卫生部 2005 年 45 号令