

实验室检测

1 检测人员要求

实验室检测技术人员应当具备实验室工作经历以及相关专业技术技能，接受过致病性病原相关检验检测技能培训。此外检测机构应当按照所开展检测项目及标本量配备实验室检测人员，以保证及时、高效完成检测和结果报告。

2 检测细菌核酸

2.1. 细菌核酸的检测方法

2.1.1. PCR（聚合酶链式反应）：使用 PCR Master Mix（如 Qiagen 的 HotStarTaq Master Mix）、引物（例如 16S rRNA 引物）、核酸模板和其他所需试剂。

2.1.2. 实时定量 PCR（qPCR）：使用实时 PCR Master Mix（如 Applied Biosystems 的 SYBR Green PCR Master Mix 或 TaqMan Universal PCR Master Mix）、引物、探针、核酸模板和其他所需试剂。

2.1.3. 循环介导的等温扩增（LAMP）：使用 LAMP 试剂盒（如 Eiken Chemical 的 Loopamp DNA Amplification Kit）、引物、核酸模板和其他所需试剂。

2.1.4. 16S rRNA 测序：准备 16S rRNA 引物、PCR Master Mix、测序试剂（如 Illumina 的测序试剂套件）、PCR 产物纯化试剂等。

2.2. 实验室要求

2.2.1. 实验室应设有符合 BSL-2 或 BSL-3 级别的生物安全实验室，并按照相关规定操作。

2.2.2. 实验室应配备 PCR 工作站、实时 PCR 仪器、等温扩增仪器、测序仪器等设备，保证实验的顺利进行。此外试剂和设备应符合国家标准，并定期维护和检修。

2.2.3. 实验室应具备合格的通风设施和生物废物处理设施，确保实验操作安全。

2.2.4. 工作人员需要接受相关的培训，熟悉实验室操作规程和安全操作流程。

2.2.5. 实验室需要建立完善的样本管理和数据记录系统，确保数据的准确性和可追溯性。

2.3. 试剂存储、准备、制备、分析

2.3.1. 试剂存储：试剂应存储在符合要求的环境中（冰箱或冷冻箱中），避免阳光直射、高温和潮湿。此外根据要求分开存放，避免混淆和污染。

2.3.2. 试剂准备：在操作过程中，需要严格按照试剂说明书的要求进行试剂的准备和稀释，确保试剂浓度正确，确保实验的可重复性和准确性。

2.3.3. 试剂制备：按照实验方案制备 PCR 反应体系或 LAMP 反应体系，确保反应物的配比准确。

2.3.4. 分析：使用实时 PCR 仪器或其他适当的设备进行 PCR 反应或 LAMP 反应的分析，记录结果并进行数据处理。分析过程中应使用严格的质控方法，包括阴性对照、阳性对照、反应混合物的制备等。

2.4. 基因组测定（样本选择、测序要求）

2.4.1. 样本选择：应考虑细菌的来源、数量、处理方法等因素，确保样本的代表性和可检测性。选择经典分离鉴定或 16S rRNA 基因序列鉴定后的细菌培养物，确保样品纯度和可测序性。

2.4.2. 测序要求：通常包括测序平台的选择、测序深度的确定、测序质量控制等方面。根据实验需求选择合适的测序平台和测序深度，常见的包括 Illumina MiSeq 或 Illumina HiSeq 平台等。

2.5. 阳性确定样品准备

使用已知细菌的纯培养物，根据需要提取 DNA 作为阳性对照样本，确保检测方法的准确性和灵敏度

2.6. 质控

2.6.1. 室间质控：实验室应定期参加国家级或省级疾控机构组织的质控考核。

2.6.2. 性能验证：临床标本检测前，实验室应对核酸提取试剂、提取仪、扩增试剂、扩增仪等组成的检测系统进行必要的性能验证，性能指标包括但不限于精密度（至少要有重复性）和最低检测限。建议选用高灵敏的试剂（检测限 ≤ 500 拷贝/ml）。

2.6.3. 室内质控：每批检测至少有 1 份弱阳性质控品（第三方质控品，通常为检出限的 1.5-3 倍）、3 份阴性质控品（生理盐水）。质控品随机放在临床标本中，参与从提取到扩增的全过程。

2.6.4. 物品和环境样本的采集检测：在采样过程中设立现场空白样本及运输空白样本，以进行过程中的质量控制。

3 检测病毒核酸

3.1. 病毒核酸检测方法

病毒核酸检测方法能够准确、快速地检测病毒 RNA 或 DNA，是病毒感染的主要诊断手段之一。常用病毒核酸检测方法为实时荧光 RT-PCR（实时定量 PCR）。

3.2. 实验室要求

病毒核酸检测实验室按功能区布置位置的不同，可分为集中布置形式和分散布置形式。开展病毒核酸检测的实验室应当设置以下区域：试剂储存和准备区、样本制备区、扩增和产物分析区。根据所采用仪器的实际情况，样本制备区、扩增和产物分析区可进行合并。集中布置形式的实验室设置应遵循“各区独立，单向流动（注意风向，压力梯度走向），因地制宜，方便工作”的原则。各区的功能如下：

3.2.1. 试剂储存和准备区：用于分装、储存试剂、制备扩增反应混合液，以及储存和准备实验耗材。该区应配备冰箱或冰柜、离心机、试验台、涡旋振荡器、微量加样器等。为防止污染，该区宜保持正压状态。

3.2.2. 样本制备区：样本转运桶的开启、样本灭活（必要时）、核酸提取及模板加入至扩增反应管等。该区应配备冰箱或冰柜、生物安全柜、离心机、试验台、微量加样器，可根据实际工作需要选配自动化核酸提取仪等。样本转运桶的开启、分装应在生物安全柜内完成。为防止污染，该区宜保持负压状态。为方便操作，样本的分装以及核酸提取也可以在独立的生物安全二级

(BSL-2)实验室进行,提取的核酸可以转运至该区加至扩增反应液中。

3.2.3. 核酸扩增和产物分析区:进行核酸扩增反应和产物分析。该区应配备实时荧光定量 PCR 仪。为防止扩增产物污染环境,该区宜保持负压状态,压力等于或低于标本制备区。

3.3. 试剂存储、准备、制备、分析

3.3.1. 试剂存储:试剂应存储在符合要求的环境中(冰箱或冷冻箱中),避免阳光直射、高温和潮湿。此外根据要求分开存放,避免混淆和污染。

3.3.2. 试剂准备:应当选择国家药品监督管理部门批准的试剂,建议选择磁珠法、膜吸附法等进行核酸提取,建议根据核酸提取试剂及扩增体系的要求选择配套的标本采样管,不建议免提取核酸直接进行核酸扩增反应。

3.3.3. 试剂制备:据实验室的 SOP 制定试剂制备的具体操作流程,严格按照 SOP 进行操作。在制备过程中,严格控制试剂的浓度和配比,避免误操作引起试剂污染或错误。每一步操作都需记录实验员的姓名、操作时间和操作步骤,以确保操作的可追溯性。

3.3.4. 分析:记录 Ct 值、扩增曲线形状等数据,用于后续结果判断和分析。通常根据 Ct 值和扩增曲线形状来判断阳性与否,低 Ct 值和典型的 S 形扩增曲线提示阳性结果。

3.4. 基因组测定(样本选择、测序要求)

3.4.1. 测序标本选取原则：

3.4.1.1. 样本质量：选取的样本应具备良好的核酸质量，避免样本中有大量的 RNA 或 DNA 降解产物。需要评估样本的完整性和纯度，确保样本适合进行基因组测序。

3.4.1.2. 病毒负载：选择病毒负载高的样本进行测序，以确保能够获得足够的病毒 RNA 或 DNA，以便进行全基因组测序。

3.4.1.3. 代表性和多样性：样本应具有代表性，能够反映当前流行株或具有特定临床特征的病毒株。在选择样本时，可以考虑病毒的地理来源、时间分布、临床表现等因素，选择不同来源、不同时间点的样本进行测序，以获取多样性的病毒序列数据。

3.4.2. 测序要求：建议首选膜吸附法（人工）提取核酸，以二代测序技术进行新冠全基因组测序。在接收标本 24 小时内开展测序工作，关键样本要求收到样本后一周内提供测序结果报告，并在获得测序结果后将基因序列原始数据（一般为 fastq 格式）和测序样本送检单保存并记录存档。

3.5. 阳性确定样品准备

使用已知浓度和纯度的病毒核酸进行适当的稀释或浓缩处理，作为阳性对照样品以确保样品的浓度适合后续实验操作。

3.6. 质控

3.6.1. 室间质控：实验室应定期参加国家级或省级疾控机构组织的质控考核。

3.6.2. 性能验证：临床样本检测前，实验室应对核酸提取试剂、提取

仪、扩增试剂、扩增仪等组成的检测系统进行必要的性能验证，性能指标包括但不限于精密度（至少要有重复性）和最低检测限。建议选用高灵敏的试剂（检测限 ≤ 500 拷贝/ml）。

3.6.3. 室内质控：每批检测至少有 1 份弱阳性质控品（第三方质控品，通常为检出限的 1.5-3 倍）、3 份阴性质控品（生理盐水）。质控品随机放在临床标本中，参与从提取到扩增的全过程。

3.6.4. 物品和环境样本的采集检测：在采样过程中设立现场空白样本及运输空白样本，以进行过程中的质量控制。

4 检测毒素

4.1. 毒素的检测方法

实验室毒素检测的方法多种多样，具体选择方法取决于待检测的毒素类型、样品来源以及实验室设备和技术水平等因素。以下是一些常见的实验室毒素检测方法：

4.1.1. 酶联免疫吸附法（ELISA）：ELISA 是一种常用的毒素检测方法，通过检测样品中毒素与特异性抗体结合产生的颜色反应来定量或半定量分析毒素的存在。ELISA 方法具有灵敏度高、操作简单、速度快等优点，常用于食品、水样、血清等各种样品中毒素的检测。

4.1.2. 质谱分析法（Mass Spectrometry）：质谱分析是一种高灵敏度的毒素检测方法，通过分析样品中毒素的质量和质荷比来确定毒素的存在和含量。质谱分析方法包括质谱仪、液相色谱质谱联用（LC-MS）、气相色谱质谱联用（GC-MS）等，可以应用于

各种类型的毒素检测，具有高分辨率和高准确性的特点。

4.1.3. 生物检测法：生物检测法包括细胞毒性测定法、生物传感器等方法，通过使用生物学体系（如细胞、细菌、酵母等）对毒素进行敏感反应，进而检测毒素的存在和活性。生物检测法具有灵敏度高、检测速度快等优点，常用于特定类型毒素的快速筛查和检测。

4.1.4. 免疫层析法（Immunochromatography）：免疫层析法是一种简便快速的毒素检测方法，类似于 ELISA，通过样品中毒素与特异性抗体结合形成检测线条来判断毒素的存在。免疫层析法具有操作简单、便携性强等优点，适用于野外或实验室简易检测。

4.1.5. 核酸检测法：核酸检测法主要用于检测某些毒素产生的基因或毒素相关的核酸序列，包括 PCR、实时荧光 PCR 等方法。核酸检测法通常具有高灵敏度和特异性，适用于检测某些特定类型毒素。

4.2. 实验室要求

4.2.1. 实验室安全要求：实验室应该有明确的安全操作规程，并确保操作人员都受过相关安全培训。实验室应有适当的安全设备，如生物安全柜、化学品柜等，用于储存和处理样品、试剂和废物。实验室应采取必要的措施防止毒素泄露、扩散和接触，确保操作人员和环境的安全。

4.2.2. 设备和仪器要求：实验室应配备适当的仪器和设备，如光谱仪、质谱仪、酶标仪、离心机、PCR 仪、ELISA 分析仪等，用于毒

素的检测和分析。这些仪器和设备应保持良好状态，定期维护和校准，确保其准确性和可靠性。

4.2.3. 样品处理和储存要求：实验室应建立适当的样品处理流程，包括样品接收、储存、处理和销毁等环节。样品应按照规定程序进行标识、记录和储存，确保样品信息的准确性和可追溯性。

4.2.4. 操作规程和质量控制：实验室应建立标准的操作规程(SOP)，确保实验操作的一致性和可重复性。实验室应建立质量控制体系，包括阳性对照、负性对照、标准曲线等，用于监控实验的质量和准确性。

4.2.5. 环境监测和清洁要求：实验室应定期进行环境监测，包括空气质量、水质和温湿度等参数的监测，以确保实验环境符合要求。实验室应保持清洁和整洁，定期进行清洁和消毒，防止交叉污染和实验结果受到影响。

4.2.6. 数据管理和报告要求：实验室应建立完善的数据管理系统，包括数据记录、存储和备份等，确保实验数据的完整性和可追溯性。实验室应及时报告实验结果，并保留相关记录和报告，以备日后查阅和审查。

4.3. 试剂存储、准备、制备、分析

4.3.1. 试剂存储：所有试剂应存放在干燥、阴凉、避光的环境中，远离高温和阳光直射。根据试剂的特性，有些试剂可能需要储存在冰箱或冰柜中，确保其稳定性和长期保存。此外所有试剂的存储位置应有明确的标识，包括试剂名称、批号、有效期等信

息。

4.3.2. 试剂准备和制备：在开始实验之前，应根据实验方案 and 操作规程准备好所需的试剂。所有试剂的配制和制备应严格按照操作规程和标准程序进行，确保试剂的质量和浓度符合要求。在试剂制备过程中，应注意避免交叉污染和试剂误差，保持操作的准确性和可靠性。

4.3.3. 试剂分析：分析试剂的浓度、纯度和活性等参数时，应选择合适的分析方法和仪器，如紫外-可见分光光度计、高效液相色谱仪等。在进行试剂分析前，应对仪器进行校准和验证，确保分析结果的准确性和可靠性。对于一些特殊的试剂或样品，可能需要进行附加的分析和检测，以确保试剂的质量和适用性。

4.3.4. 试剂使用和废弃：在使用试剂时，应根据操作规程和安全要求正确操作，避免试剂的浪费和污染。使用过的试剂容器和废弃物应根据规定的程序进行处理，如清洗、消毒、回收或安全处置等。

4.4. 阳性确定样本准备

阳性对照样品应当是已知含有目标毒素的样品，其浓度应该是已知的，并且在试验中产生可靠的阳性信号。可以从认证机构或合格的实验室购买认证的阳性对照样品，或者根据已知的毒素标准溶液制备阳性对照样品。

4.5. 质控

4.5.1. 正负对照样本：使用已知含量的毒素样品作为正对照和负对

照，用于验证检测方法的准确性和灵敏度。正对照样本应包含待检测毒素，而负对照则不含。

4.5.2. 内部质控标准（Internal Quality Control, IQC）：在实验过程中加入已知浓度的质控样品，监测实验仪器和方法的稳定性和准确性。IQC 通常由实验室自行准备，以确保每次实验的可重复性和准确性。

4.5.3. 外部质量评估（External Quality Assessment, EQA）：实验室参与由权威机构组织的质量评估计划，接收盲样本进行检测，然后将结果提交给评估机构进行比对。这有助于评估实验室的准确性，并与其他实验室进行比较。

4.5.4. 仪器校准和标准曲线：定期校准检测仪器，并使用标准曲线来确定待检测毒素的浓度。标准曲线应该覆盖待检测毒素的浓度范围，并且应该在每次实验中一并测量以验证检测方法的准确性。

4.5.5. 重复测试和统计分析：对样本进行重复测试，并进行统计分析以评估数据的可靠性和精确性。