



结核病细菌学检查方法

中国疾控中心结核病预防控制中心



主要目录

01 培训目标

02 职责分工

03 工作内容

04 知识要点



1

培训目标



细菌学检查方法的意义

- 涂片镜检仍是开展最广泛的实验室检测技术，便宜、快速，能发现传染性最强的患者。
- 分枝杆菌分离培养仍然作为结核病诊断的**金标准**，可以获得菌株用于后续试验。
- 涂片镜检和分枝杆菌分离培养仍是结核病患者**疗效监测**的方法，现有的分子生物学方法无法取代。
- 表型药敏试验可对更多种药物开展耐药性检测，现有商品化分子生物学方法仅能检测部分药物的耐药性。



培训目标

- 了解细菌学检查方法在结核病防治工作的作用。
- 掌握各项结核病细菌学检查方法及用途。
- 理解细菌学结果解读及临床意义。



2

职责分工



定点医疗机构

- 标本采集、接收
- 痰涂片镜检
- 分枝杆菌分离培养
- 菌种鉴定
- 药敏试验
- 标本运送和接收, 结果反馈
- 结核分枝杆菌核酸检测 (实验室其他内容介绍)
- 结核分枝杆菌耐药基因检测 (实验室其他内容介绍)

疾控机构

- 质量控制 (实验室其他内容介绍)
- 疫情处置时菌株的收集、后续基因分型及分析 (实验室其他内容介绍)
- 耐药监测药物敏感性试验开展及结果汇总



3

工作内容



2008→2021年指南对比更新



2008

检查方法相对单一

- 痰涂片镜检方法仅包含萋尼式方法，其作为发现患者的最主要实验室检查方法，也是疗效评价的唯一方法。
- 分枝杆菌分离培养仅涵盖固体培养方法。
- 药物敏感性试验仅涵盖固体比例法方法。

2021



强调合格标本质量的重要性

- 系统描述了各类标本采集的方法、要求，明确建立标本接收、拒收标准。
- 细化标本和菌株的储存和运输要求。

细菌学检查方法更加多样化

- 除痰涂片镜检外，增加了灵敏度更高的检测方法。
- 痰涂片镜检在萋尼式染色方法基础上，增加荧光染色方法，手工法和自动化染色和镜检系统均可使用。
- 分枝杆菌分离培养除固体方法外，增加更加灵敏和快速的液体方法。
- 表型药敏试验增加液体方法，同时增加更多药物种类及其临界浓度，更新部分药物临界浓度，与临床治疗方案的用药选择相匹配。



结核病实验室细菌学检查范围

标本采集、储存和运

结核病细菌学检查方法

标本采集、储存和运输

- 标本采集、接收及拒收
- 标本和菌株的储存及运输

痰涂片镜检

- 萋-尼氏染色法
- 荧光染色法

分枝杆菌分离培养

- 固体分离培养
- 液体分离培养

菌种鉴定

- 细菌学方法 (PNB培养基)
- 免疫学及其他方法

表型药敏试验

- 固体法
- 液体法



01

标本采集、 储存和运输



标本采集、接收及拒收

1 留痰区域：远离人群的开放空间或负压留痰室。

2 清洁口腔：用清水漱口，保证口腔内无异物，如戴有义齿请取出。

4 检查：将痰盒交给医务人员，医务人员核对标签姓名，在光线充足条件下确认痰标本质量合格。

痰标本质量

3 收集痰标本。

1. 放松

2. 深吸气，保持几秒，缓慢呼出，重复2次。第3次深吸气，保持几秒，用力从肺部深处咳出痰。

3. 打开痰盒，靠近嘴边收集痰液。
注意：请勿触摸痰盒内壁及盒盖内部，嘴部请勿触及痰盒。

4. 如有必要重复步骤2，以确保取足够（3-5ml）合格痰标本。

5. 拧紧痰盒螺旋盖。

5 如有问题请用新痰盒重新留取。

轻拍后背有助于咳痰。
四肢舒展放松、清水漱口、重试。

6 将含有体液的废弃物及漱口水放到黄色医疗废物桶中。

7 洗手。



标本采集、接收及拒收

- **宣教：**痰标本采集图谱/视频/专人演示
- **良好的沟通：**
 - 实验室**告知**临床(门诊医生和护士) 权利和义务-培训患者采集合格痰标本的细节及要求。
 - 标本接收：核对标本、患者信息，检查痰标本质量（唾液不合格）与体积（至少3ml）。
 - **标本拒收：**拒收原因，及时通知患者重新留取合格痰标本，如确实不能重新留取，在报告单注明标本性状不合格。
 - **定期对临床反馈**痰标本质量-合格率、拒收率及原因等，强调痰标本质量对结果的影响，引起医生、患者重视。



标本和菌株的储存

- 痰标本：2-8°C,不超过7天。
- 菌株：
 - 短期保藏：2-8°C, 固体罗氏培养基、液体培养基。
 - 长期保藏：-60 ~ -80°C, 专用冻存液, 定期检测菌株活性。



标本和菌株运输

运输包装



菌株或活菌培养物



标本





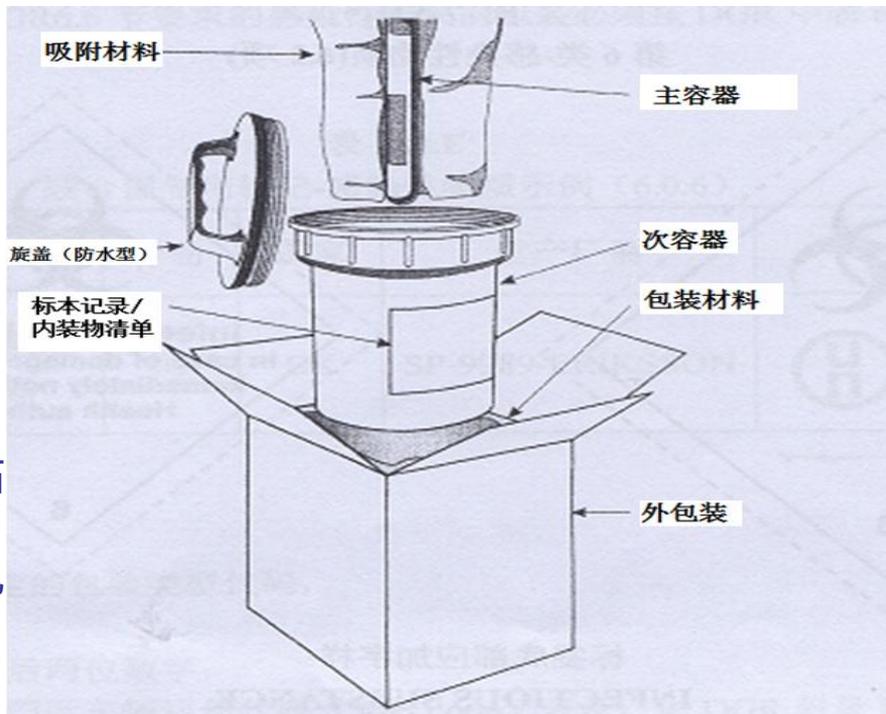
标本和菌株运输

➤ 三层包装体系:

- 防水的**主容器**
- 防水的**次容器**
- 强度满足其容积、质量及使用要求的刚性**外包装**

➤ 注意:

- 运输人员检查痰盒盖、培养管是否拧紧。
- 垂直固定放置，避免倾斜泄露。容器标签要贴在容器壁而不是容器盖上
- 在运输期间，尽可能保持低温（冰袋），避免阳光照射。
- 运输单与标本容器分开放置





标本和菌株运输

- **及时**运送痰标本及菌株。
- 运输过程中需要不少于2名接受过专业菌株运输培训的人员专人专车运送，包括省内各单位之间和单位到机场之间。
- 申请单位应当对护送人员进行相关的生物安全知识培训。在护送过程中采取相应的防护措施，并携带必要的应急防护用品，如口罩、帽子、手套、防护服、消毒剂等。
- 运输过程中携带准运证书。
- 样本交接：核对样本数量、编号、患者信息，样本接收人、运送人、运输日期、单位名称。



02

痰涂片镜检



痰涂片镜检作用

- 应用最广泛的结核病实验室检查方法，涂阳患者意味着体内菌量更大，传染性更强。
- 监测治疗效果,仍是敏感性结核病疗效评价的检测方法。
- 涂片阳性是某些耐药基因检测方法的前提。



涂片镜检方法



光学显微镜 (Z-N法)



荧光显微镜 (荧光染色法)



LED荧光显微镜
(荧光染色法)



萋尼氏染色显微镜检查 VS 荧光染色显微镜检查

萋尼氏染色显微镜检查	荧光染色显微镜检查
灵敏度低，特异性高。	敏感度增加（约10%），特异度稍低。
简单易行，易聚焦，易确定痰膜边缘； 视野数要求多，阴性读片时间长。	不易聚焦，不易确定痰膜边缘； 报告阴性视野数要求少，读片时间更短。
明场显微镜价格低廉。	传统汞灯荧光显微镜：价格昂贵，维护成本高需要汞灯（费用高，寿命短、需要预热不能随用随开、光强度不可调，费电、有毒性的汞蒸汽释放至环境）、需要暗室。 LED荧光显微镜：价格较低，稳定光源(寿命长),随用随开，光强度可调，不释放有毒气体，不需要暗室。



痰涂片镜检的优势/劣势

优势

- 简单，廉价，快速、仪器设备简单、时间短（30min）、需标本量少:0.1ml、涂片可长期保存。
- 适用于基层和及其他实验室，直接涂片法生物风险相对其他检测低。
- 可用于疗效监测。

劣势

- 对痰标本质量要求高。
- 敏感性低：5000 - 10000条菌/ml，尤其是肺外结核，HIV感染者和儿童。
- 特异性差：只能报告“抗酸菌阳性”，不能区分结核和非结核分枝杆菌，也不能区分MTB和同一组其他类型的分枝杆菌。镜下只能观察菌体形态，不能辨别死、活菌。
- 不能区分药物敏感性和耐药性结核。



临床意义及结果解释

➤ 涂片结果

- 提供患者肺部细菌载量的估计值（涂片阳性级别），提示传染强度。
- 治疗过程中阳性级别的改变可以作为治疗效果的参考。

➤ 涂片阳性：

- 仅能报告检出抗酸杆菌,不一定是结核分枝杆菌复合群(MTBC),也可能是非结核分枝杆菌（NTM）、麻风分枝杆菌、诺卡菌。
- 在NTM流行高的地区尤其注意，需要加以鉴别。



临床意义及结果解释

- 涂片结果与胸片结果不一致
 - 可能是样本质量、病变部位(如支气管结核)、涂片敏感度低等因素。
- 涂片结果与培养结果不一致
 - 涂阳培阴：可能是患者接受抗结核药物治疗（诊断前或治疗过程中）、样本保存条件（失去活性）、培养条件（合并感染-处理过强或污染菌生长过快、培养基或仪器质量不稳定/温度、未使用同一份标本、标本选择不当、接种量少）。
 - 涂阴培阳：方法学差异，培养灵敏度更高。
- 涂片结果与分子检测结果不一致
 - 确保分子检测技术操作质量（室内质控阳性和阴性质控均正常，排除扩增抑制物等）
 - 分子检测阴性、涂片阳性：很大可能是NTM/诺卡菌
 - 分子检测阳性、涂片阴性：方法学差异，分子检测灵敏度较高。



03

分枝杆菌 分离培养



分支杆菌分离培养作用

- 结核病诊断的金标准，从细菌学上确认患有结核病，敏感性：10-100个以上结核菌/ml。
- 对痰涂片阴性或分子生物学阴性的患者进行进一步检测。
- 获得纯培养物进行进一步的鉴定和药敏试验。
- 疗效判断：是评价治疗效果特别是耐药结核病的重要指标。
- 疫情处置时获得分离培养阳性菌株是进行基因分型的前提。



分离培养的优势/劣势

优势

- 提供明确的结核病诊断，比显微镜检查可多出约20%的病例（高灵敏度）；
- 为药物敏感性测试和基因分型提供所需的分离株；
- 是监测耐药结核病治疗效果的方法。

- 液体培养的其他优点包括：与固体培养相比阳性率更高（高10%）；
- 比固体培养更快（2-3周）。

劣势

固体培养的缺点包括：

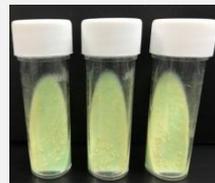
- 由于生长缓慢，结果需要很长时间（固体报阴约两个月，液体报阴约6周）；
- 需要进一步菌种鉴定；
- 某些贝达喹啉耐药株对孔雀绿敏感（假阴性，液体培养不影响）。

液体培养的缺点包括：

- 更容易污染；而且存在一定程度的假阴性，有些菌氧代谢活性低消耗少 假阴性；
- 离心时增加生物安全风险；
- 比固体培养更昂贵；

多数分枝杆菌能生长

需进一步鉴定





结果解释及临床意义

- 分枝杆菌分离培养阳性（经过抗酸染色涂片确认抗酸菌阳性）
 - 仅能提示分枝杆菌培养阳性,不一定是结核分枝杆菌复合群(MTBC),也可能是非结核分枝杆 (NTM)。
 - 而且患者在抗结核治疗后痰液中有可能含有非结核分枝杆菌 (NTM)。
- 液体培养仪器报告阳性需排除杂菌污染（肉眼观察, 液体培养还需同时做血琼脂平板试验, 以确定是否为杂菌污染）。污染需谨慎判断: 区别是与杂菌污染有关还是与疾病（感染NTM）有关。
 - 快速生长型分枝杆菌（小于等于7天生长）：偶发、脓肿、龟、耻垢分枝杆菌等。
 - 慢生长型分枝杆菌（大于7天生长）：堪萨斯、鸟/胞内分枝杆菌复合群、海、蟾蜍分枝杆菌等。
- 分离培养阳性需进一步进行菌种鉴定（如MPB64抗原检测），以确认结核分枝杆菌生长, 可报告结核分枝杆菌生长阳性, MPB64抗原检测阴性且临床怀疑NTM时使用其他方法进行进一步菌种鉴定。



结果解释及临床意义

- 诊断时分枝杆菌分离培养为非常灵敏的检测方法，并可以提供患者肺部细菌载量的估计值（生长的半定量评估：罗氏培养基的菌落数，液体培养结果报告时间）
- 治疗过程中细菌载量的变化和阳转/阴转提示治疗方案的有效性。
- 注意疗效随访中单一的一次（特别是治疗早期）培养结果有时不能准确反映药物治疗方案的有效性，需要连续多次监测培养结果来评估疗效。



结果解释及临床意义

- 培养结果与胸片、临床结果不一致
 - 方法学差异-培养检测排出活菌量，胸片检测的是病变组织与正常组织对x射线阻挡的差异。
 - 临床支持结核但培养阴性：排菌少、不排菌，未形成空洞排菌。
- 培养结果与分子检测结果不一致
 - 分子检测阴性、培养阳性：鉴定培养物是否为MTB或其他NTM。
 - 分子检测阳性、培养阴性：考虑有无用药史影响培养结果，尤其是分子检测阳性级别很低时结合临床等，必要时重复标本检测。



结果解释及临床意义

➤ 对于固体培养报告为低菌落数的解释

初诊患者：

- 通常认为没有开始药物治疗的患者不应出现低菌落数的情况，但有些患者可能在治疗前用过抗生素类药物(如氟喹诺酮类) 出现此类情况。或胸片病变轻微、免疫缺陷类疾病（如TB/HIV合并感染）。
- 如果与以上情况都不符合，提示实验室交叉污染（回顾性查看同批次操作临近的标本是否有高阳性级别结果），有条件可通过基因分型证实。

随访患者：

- 治疗过程中比初诊时阳性级别降低（如：1+ → 几个菌落），需结合治疗时间、临床疗效、药敏试验结果、胸片结果综合判断。
- 菌落数极低也可能提示实验室交叉污染。



04

菌种鉴定



分枝杆菌菌种鉴定

结核分枝杆菌复合群(MTBC) 01

包括结核、牛、非洲、田鼠、山羊、pinnipedii、suricattae和mungi分枝杆菌。

分枝杆菌属
(抗酸染色阳性)

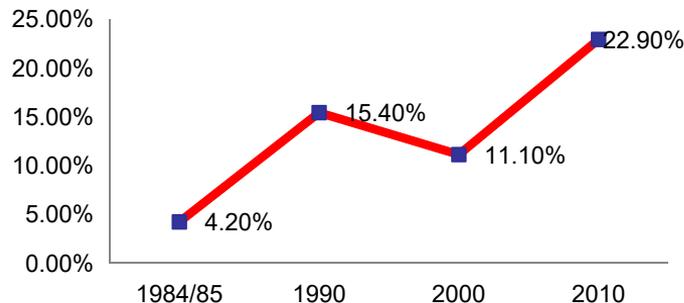
02

03

麻风分枝杆菌

非结核分枝杆菌 (NTM) 除结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌以外的一大类分枝杆菌的总称，迄今为止，共发现NTM菌种190余种，14个亚种，其中大部分为寄生菌，仅少部分 (大约30-50种) 对人体致病，属条件致病菌。

历次全国流行病学调查NTM分离率





菌种鉴定作用及意义

- 各菌种生物学特性、致病性、耐药谱不同，治疗药物及方案完全不同。
- 菌种鉴定是连接培养和药敏的桥梁，需根据不同的菌种选择适宜的药敏试验。
- 在NTM低流行地区，以鉴定结核分枝杆菌复合群为主；在NTM高流行地区，或某些免疫抑制人群，临床上考虑NTM感染患者，需要进一步鉴定到NTM种甚至亚种。
- 鉴定MTB→NTM→NTM种→亚种。



菌种鉴定方法

方法	时间	特点
免疫学 (MPB64)	15min	检测MPB64抗原。 试验条件要求简单、操作简单、快速、特异性较高。 阴性不能确定是NTM，而且有些结核菌MPB64抗原缺失检测不到。
细菌学 (PNB生长试验)	至少4周	绝大多数NTM可以生长，而MTB则不能生长。 经典方法，可靠性较好，适合于对菌种进行初步鉴定。 往往与药敏一起做，时间长。 仅能对确定是分枝杆菌的菌株进行鉴定。而诺卡菌、冢村菌、支气管戈登菌也可生长。
分子生物学	1天	对细菌活性无特殊要求，快速，鉴定种类较多，目前获批的试剂盒较少。 线性探针杂交：需要专门仪器，操作繁琐，易造成DNA污染。 基因芯片：需PCR后处理，易造成DNA污染。 DNA测序：易受杂菌干扰，不适用于混合感染检测。
质谱	1天	检测样本：生长旺盛的阳性分离株。鉴别种类较多，仪器价格昂贵，分枝杆菌鉴定操作复杂（需破壁提取），特异性较高要求。
生化		鉴定种类少，影响因素多，操作复杂，目前已不常用。





05

表型药敏 试验



表型药敏试验作用

- 区分敏感或是MDR/RR-TB结核病。
- 针对MDR/RR-TB标准化治疗方案中核心药物进行耐药性检测，确保有效的药物数量，从而组成有效的治疗方案。如几种新药耐药性目前仅能通过表型药敏试验获得。
- 针对更多其他药物耐药性进行检测，为患者制定个体化治疗方案提供参考。评估新药或药物治疗方案的疗效，选择和调整治疗方案。
- 某些方法可以获得不同的MIC值，或者区分低浓度和高浓度耐药，指导使用合理的药物剂量。
- 通过耐药监测了解某地区某些抗结核药物的耐药情况，尤其是临床常规检测未覆盖的药物，作为常规检测工作的有力补充。



什么时候开展表型药敏试验？

- 最好是发病早期，使用抗生素前。
- 分子生物学检测利福平耐药情况后，如果无法继续用分子生物学方法检测异烟肼、氟喹诺酮类（左氧氟沙星或莫西沙星），需使用表型药敏试验检测，推荐逐步开展针对四种新药的耐药性检测。
- 其他药物根据治疗方案的选择开展，如吡嗪酰胺、乙胺丁醇、阿米卡星、卷曲霉素等。
- 临床治疗评估无效后。



表型药敏试验方法

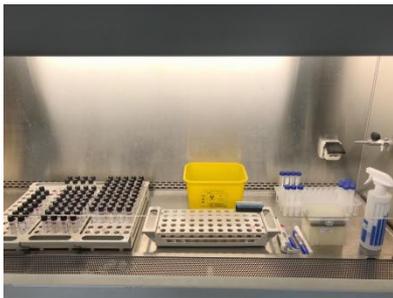
固体法

液体法

MIC法

定性检测

根据临床和实验室经验数据，设定药物的关键浓度，以菌是否在此关键浓度下生长来判断耐药/敏感。



定量检测

通过按比例稀释的一系列药物浓度来确定可以抑制某一株菌生长的最低抑菌浓度，因此可半定量确定不同临床菌株对某种抗结核药的耐药程度。



表型药敏试验含药培养基药物临界浓度

药物 (英文缩写)	罗氏培养基内药物临界浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	液体培养基内药物临界浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
异烟肼 (INH)	0.2	0.1
链霉素 (SM)	4.0	1.0
乙胺丁醇 (EMB)	2.0	5.0
利福平 (RFP)	40.0	1.0
吡嗪酰胺 (PZA)	-	100.0
左氧氟沙星 (LFX)	2.0 [#]	1.0
莫西沙星 (MXF)	1.0 [#]	0.25/1.0
贝达喹啉 (BDQ)	-	1.0 [#]
利奈唑胺 (LZD)	-	1.0

药物 (英文缩写)	罗氏培养基内药物临界浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	液体培养基内药物临界浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
氟法齐明 (CFZ)	-	1.0 [#]
德拉马尼 (DLM)	-	0.06 [#]
阿米卡星 (AK)	30.0	1.0
卡那霉素 (KM)	30.0	2.5
氧氟沙星 (OFX)	4.0	2.0
卷曲霉素 (CPM)	40.0	2.5
乙硫异烟胺 (ETO)	40.0	5.0
丙硫异烟胺 (PTO)	40.0	2.5
对氨基水杨酸 (PAS)	1.0	-

#表示临时推荐浓度



表型药敏试验优劣势

表型药敏试验 | 检测耐药

优势

- 比例法更好地规避接种量/菌活性差异导致的影响
- 可以同时检测多种一线药物、二线药物等药物的耐药性；
- MIC方法可以提供不同的耐药程度，为临床提供更多的信息。

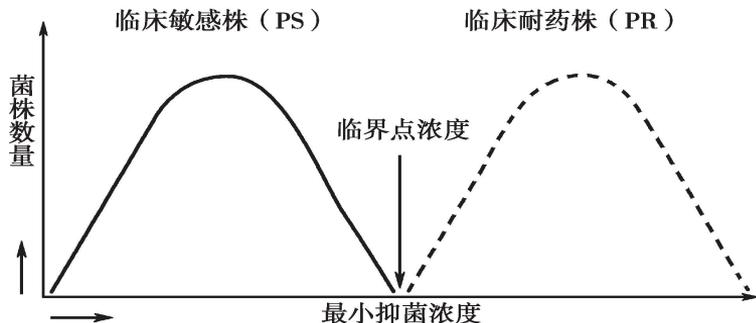
劣势

- 在设备完善的实验室中使用，如我国在地市级以上开展；
- 生物安全级别要求高，要求在加强型生物安全二级实验室进行；
- 操作步骤复杂，人工操作步骤多，结果受人为因素影响大；
- 结果报告周期较长（自分离到菌株，接种至获得药敏结果至少4周）。



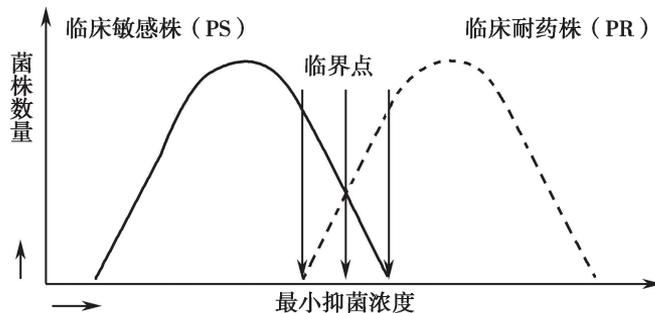
表型药敏实验临界点的确定对结果稳定性和准确性的影响

不同药物浓度时，可能敏感株、耐药株的生长受抑制的频率



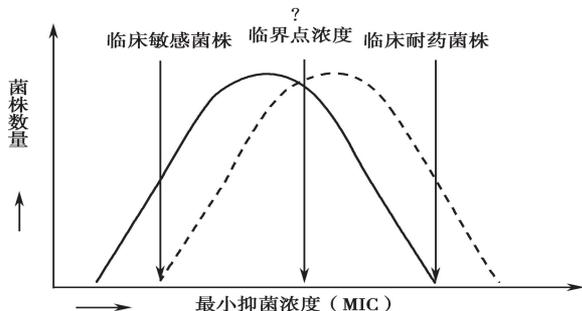
理想情况下耐药临界点浓度区分敏感菌株和耐药菌株

不同药物浓度时，可能敏感株、耐药株的生长受抑制的频率



实际情况下耐药临界点区分敏感菌株和耐药菌株 (利福平、异烟肼等)

可能敏感菌株/可能耐药菌株
在不同药物浓度下受到抑制的频率



部分药物耐药临界点区分敏感菌株和耐药菌株 (乙胺丁醇等)



结果解释及临床意义

- 表型药敏试验结果与治疗效果不一致：体外试验与体内的差别，药物吸收差，有空洞，菌量多，空洞壁厚，药物渗透差/弱，血药浓度远高于MIC值的治疗效果更好（目前无法常规监测血药浓度）。
- 多数药物表型结果较稳定，但有些药物不稳定，如固体比例法检测乙胺丁醇耐药性。
- 液体方法检测利福平耐药，依据现有临界浓度，有些低浓度耐药(对应某些rpoB突变位点)菌株被判断为敏感（WHO新的推荐浓度已经从1ug/ml降到0.5ug/ml来改善此类情况）。
- 液体方法检测吡嗪酰胺耐药，依据现有接种菌量，相比其他药物的药敏试验，吡嗪酰胺含药培养管中接种菌量更多（10倍），使得PH值升高，影响PZA在酸性环境下发挥作用，引起某些假耐药的误判。
- 耐药基因检测与表型药敏试验结果相关度：利福平（90-95%）、异烟肼/氟喹诺酮类（80-85%），其他略低。



4

知识要点



结核病实验室细菌学检测重点关注内容

疾病预防控制机构

具备熟练开展结核病细菌学检测的能力

建立与承担工作匹配的生物安全级别实验室

积极推动促进辖区内结核病实验室内细菌学检测的质量管理工作，提供技术指导，组织药敏试验熟练度测试、盲法复检等室间质评工作

组织实施耐药监测并进行质量监控，对分离菌株按照统一要求开展鉴定、药敏试验和基因分型。

定点医疗机构

高质量开展结核病细菌学检测，与分子生物学检测互为补充

建立与承担工作匹配的生物安全级别实验室

建立完善的标本采集、接收拒收、储存和运输程序，并按照程序实施

耐药监测相关工作，病原学检查，菌株保存



思考题

- 标本采集、接收及拒收过程中需要做哪些沟通。
- 培养报阳后，需做哪些推断性试验和确认性试验，若出现不同结果如何处理。
- 莫西沙星药敏试验设定两个浓度意义？



The clock is ticking

