

低收入国家
结核病细菌学检测的优先领域

第二版
2007

国际防痨与肺部疾病联盟 (IUATLD)

低收入国家结核病 细菌学检测的优先领域

第二版
2007

Hans L. Rieder
Armand Van Deun
Kai Man Kam
Sang Jae Kim
T. Martin Chonde
Arnaud Trébuçq
Richard Urbanczik

国际防痨与肺部疾病联盟 (IUATLD)
法国, 巴黎, 圣.密歇尔大道68号, 75006
本书出版得益于挪威发展合作部的大力支持

致谢与译者声明

致谢

感谢Dr Hans L Rieder在翻译本书中给予的支持。

感谢Dr Kai Man Kam在本书的翻译后校对过程中提供的帮助。

感谢Dr Cornelia Hennig在本书的翻译、印刷中给予的支持。

译者声明

《低收入国家结核病细菌学检测的优先领域》的翻译与印刷得到了国际防痨和肺部疾病联盟的授权,由国家结核病参比实验室翻译为中文,供结核病实验人员和相关结核病控制工作者参考。

译者:

夏辉 尚美 姜广路 周杨 王胜芬 董玲玲 赵雁林

校对

甘启文 许绍发

编辑：

国际防痨与肺部疾病联盟 (IUATLD)
圣·密歇尔大道68号，巴黎，法国75006

作者：

Hans L. Rieder
Armand Van Deun
Kai Man Kam
Sang Jae Kim
T. Martin Chonde
Arnaud Trébuchet
Richard Urbanczik

国际防痨与肺部疾病联盟 (IUATLD)
2007年2月

版权保留

未经作者或出版商许可，任何个人或单位不得转载本书中的任何内容。
ISBN : 2-914365-29-2

前言（第一版）

写作本书之际，在全世界许多地区尤其是一些低收入国家，结核病仍然是严重的公共卫生问题。由于实施了有效的控制策略，结核病控制取得了进展，但仍有许多国家不能充分意识到结核病控制的重要性和优先性。结核病细菌学检测是结核病控制的基本组成部分，用于发现传染源，诊断临床可疑症状者，随访监测疗效。要实施这些职能，一个组织良好的能够进行结核病细菌学检测的实验室网络是必不可少的。实验室网络能够提供有价值的信息以评价国家结核病控制规划的执行能力和影响力，鉴别需要改进的地方，制定治疗政策。基于以上原因，必须确保有一个可靠的、有能力的参比实验室，不仅用于督导实验室网络而且还要制定实验室标准和政策。

无论作为国家公共卫生实验室的一部分还是国家结核病研究所中的实验室，国家结核病参比实验室都应该是结核病实验室网络中的顶级实验室，以便作为结核病控制规划中的参比实验室。参比实验室在以下活动的组织和实施中发挥着重要的作用：制定指南；保证高质量、标准化痰涂片镜检的实施；监督对实验室人员的培训；耐药监测；参与流行病学和实施性研究；以及确保耗材的供应和优化报告系统。参比实验室还应该有足够的承担培养和药物敏感试验。

本书为国家参比实验室的负责人在以下几方面提供了实用的指导：痰涂片镜检和耐药监测中参比实验室的作用、主要职责、技术、组织管理。需要指出的是，质量保证和质量控制、培训、督导是实验室最基本的功能，虽然本书主要阐述结核病，但是同样的原则也适用于其他的疾病。因此，本书将是国家参比实验室和国家结核病控制规划专家的一个非常受欢迎的参考资料的补充。在此，我祝贺各位作者，因为他们的这些努力，将会在结核病控制一个重要领域满足实际的需要。

Dr Arata Kochi

Director, Global Tuberculosis Programme

世界卫生组织

致 谢

本书第一版非常感谢Thuridur Arnadottir, Chris Collins, Etienne Declercq, Donald Enarson, Isabel de Kantor, Nico Nagelkerke and Beat Neuenschwander提供的意见和建议。Edik Balaian制备手绘图画, Helge Myking制作了建筑图, Hanne Hemsén帮助修订图纸。Fadila Boulahbal和Jacques Grosset对于塞内加尔达喀尔的参比实验室的设计作出了极大贡献, 这对于本书有重要影响。

本书作者非常感谢Adalbert Laszlo, 他在第一版中提供了相关的建议, 而且其中的大部分内容包含在第二版中。

Donald Enarson浏览了第二版的手稿, 提出了许多重要的、中肯的意见和建议, 这对于整个内容以及整个流程的改进有巨大的帮助。另外, 在最终的修订中他还提供了许多宝贵的经验。

还要感谢Ivan Bastian 和Richard Lumb, 他们从头至尾的看了原稿, 提出了许多意见。还要感谢Thuridur , Arnadottir, 它对于许多概念提出了改进。最后还要感谢Abigail Wright, 他做了很多重要的注解。

前言（第二版）

本书第一版的名称为“低收入国家公共卫生服务国家结核病参比实验室和全国实验室网络的基本要求和服 务”。作者希望“低收入国家结核病细菌学检测的优先领域”（简称为“红皮书”）这个更加简明的题目能够体现第二版中的修定。

Helge Myking（第一版中的作者）在本书印刷之前刚去世，他为塞内加尔国家结核病控制规划中建立国家结核病参比实验室提供了建筑技术支持。本书中描述了他在那个项目中取得的经验。由Helge书写的章节和构架未加改动的保留下来。我们将此书的第二版献给Helge Myking。

这本书源于我们多个国家合作者对需求的增值。我们首先也是着重要感谢低收入国家的大量基层实验室的技术人员，他们与我们分享了问题和新的解决方法，他们还多次表达了对来源于中间级实验室，甚至是国家结核病参比实验室技术及精神方面的支持的需求。因此本书列出了实验室网络中各级职责的提纲，以及国家参比实验室作为全国实验室网络中的顶级实验室，这些都建立在全国结核病控制规划公共卫生优先领域工作框架下的。本书主要献给那些低收入国家的偏远的农村地区的技术人员，正是这些人员的常规工作为结核病控制的成功贡献了力量。

关于分枝杆菌细菌学有许多非常优秀的书。本书的目的不在于简单的再增加一本这样的书，而是要作为现有书目的补充。本书的范围和重点存在着局限性，因为它的目的不在于囊括分枝杆菌细菌学所有的领域，相反是将重点放在每一级别实验室的最低需求这一特定的部分，并且强调国家结核病参比实验室的职责。例如，培养只作为耐药监测中药敏试验的前提讨论。培养作为敏感度较高的诊断病人的方法也涉及到，但是实际应用常常存在着困难，在低收入国家结核病控制规划中不能作为常规诊断方法使用。同样，菌种鉴定只讨论从环境分枝杆菌中区分致病菌种结核分枝杆菌复合群，而没有将重点放在如何鉴定环境分枝杆菌中的菌种。

写本书时，作者特别注意到WHO和IUATLD的出版物。本书尽量与官方推荐的内容保持一致，但是由于科学不断发展，新知识的不断出现，很显然现存的某些概念受到挑战，早在1998年的第一版中已经出现过类似问题，我们知道本版也会有类似问题。然而在我们引入新概念时我们会标注清楚，并且我们有足够的科学证据支持这些概念。

尽管本书出现的大部分材料已经在现场检验过而且被证明是合适的，但是不可避免还是有一些观点需要进一步的进行现场验证。本书作者欢迎来自于

各方面的意见和评论，这些意见和评论将有助于在未来的新版本中改进某些内容。

Paris, Antwerp, Hong Kong, Seoul, Dar es Salaam,
Paris and Schomberg
2006年12月

目 录

第一章 国家结核病实验室网络的职责和人员配置

- A. 基层实验室的职责和人员配置要求.....1
- B. 中级实验室的职责和人员配置要求.....2
- C. 国家结核病参比实验室的职责.....2
- D. 国家结核病参比实验室的人员配置和工作日要求.....7

第二章 痰涂片镜检

- A. 收集痰标本.....9
- B. 痰涂片镜检申请.....11
- C. 痰涂片制备和染色.....12
- D. 痰涂片显微镜检查.....21
- E. 痰涂片检查结果的登记与报告.....22

第三章 痰涂片镜检的培训和质量保证

- A. 痰检人的培训.....24
- B. 痰涂片镜检的质量保证.....25

第四章 抗结核药物耐药监测

- A. 监测系统的目的和培养的作用.....49
- B. 实验室方面的注意事项.....51
- C. 耐药监测中特殊的技术程序.....53
- D. 耐药监测伦理学方面的考虑.....74

第五章 国家结核病实验室网络中需要的方法、材料、设备以及物理环境

- A. 基层痰涂片镜检实验室的设计.....77
- B. 国家结核病参比实验室的设计.....78
- C. 国家结核病参比实验室的建筑.....83
- D. 基层痰涂片镜检实验室的物资管理.....87

E. 国家结核病参比实验室需要的耗材·····	88
F. 实验室中需要特殊考虑的生物安全·····	97
G. 含有结核分枝杆菌复合群的培养物运输的国际规定·····	98

第六章 附件

附件1 痰涂片镜检化验单和报告单	
附件2 痰涂片镜检的实验室登记	
附件3 基层实验室痰涂片镜检的报告表格、库存情况	
附件4 痰涂片镜检批量测试表格（涂片由上级实验室下发到下级实验室）	
附件5 痰涂片镜检盲法复检表格（涂片由下级实验室上送上级实验室）	
附件6 以区域为单位复检结果的汇总报告	
附件7 培养实验室登记本	
附件8 菌种鉴定和药敏试验登记本	
附件9 痰培养实验室申请单及报告单	
附件10 药敏试验结果汇总报告格式	
附件11 基层实验室设计	
附件12 国家结核病参比实验室的设计和图纸	
图1 计划A 地点和位置设计图	
图2 计划B 实验室四周图	
图3 计划C 实验室详细布局	
图4 实验室气流控制示意图	
附件13 区域痰涂片镜检实验室耗材的报告申请表	

第一章

全国结核病实验室网络的职责和人员配置

每个国家卫生服务体系的构成及其实验室服务的构成各不相同。然而，一个国家的实验室网络总是作为综合性卫生服务的一部分，在基层、中级以及国家级水平提供服务。在国家级水平，实验室服务中往往有一些专门之处，其中之一就是结核病实验室工作。全国实验室网络通常有一个系统，这个系统能够确保整个网络实验室（不论是综合性还是专科性）中的实验员的培训和工作熟练度，这与结核病实验室服务一样。本章将会详述，国家结核病控制规划必须与实验室网络合作并给予资源上的支持，确保各个水平实验室保持痰涂片显微镜检查的熟练度借以改进涂片镜检质量。

A. 基层实验室的职责和人员配置要求

最基层的执行国家结核病控制规划的是管理单位（unit of management），他们将提供结核病的诊断、治疗服务（综合性医疗服务的一部分），收集、登记用于规划效果评估、监测和规划中需要耗材供应的最重要的数据和信息。每个单位一般覆盖人口为50,000–150,000，但是应该依据发病率、人口密度、医疗服务的可及性以及其他独特的地方因素加以调整。

诊断部分的工作要求门诊医生能从到卫生机构（即各地的每一个卫生服务点）就诊的所有人群中鉴别出结核可疑者，而实验室人员能够提供熟练的抗酸染色镜检服务。过于分散化的涂片镜检实验室不能保证实验室人员的熟练度，另外因开展质量保证、设备和耗材提供等活动也需要更高的难以实现的投入。过于集中化的涂片镜检又将影响服务的可及性，并且可能因为实验员的负担过重影响镜检的质量。因此，涂片镜检单位的设置与分布既应考虑到资源的因素（特别是督导）还要考虑到人群的可及性。

基层镜检实验室最重要的任务是用萋-尼氏法进行痰标本的抗酸染色镜检。其中包括室内质量控制，还要接受中间级实验室的常规督导和室内质量评估。另外，实验员还要负责维护显微镜，使之处于良好的功能状态，延长显微镜的使用寿命。

实验室人员要及时向开具申请单的门诊医生报告涂片镜检结果，并在全

通用的标准的实验室登记本上仔细登记。结核病实验室登记本是最重要的信息来源，用于回顾总结已经开展的活动，为计算各种指标、评估活动开展的效果提供信息。同样实验室登记本还用于室间质量评估随机抽片。

基层实验室通常有1个或者2个工作人员。这些人员除了涂片镜检外常常还有其他的额外工作，因此必须考虑实验员的工作负担不能太大否则会影响镜检的质量。每天每人的最大工作量应为20–25个标本。如果工作量经常性的超出此数值，那么可以肯定需要增加人员。

B. 中级实验室的职责和人员配置要求

中级实验室，正如名称所讲作为基层实验室和国家参比实验室之间的重要联结纽带。通常，这一级别的实验室位于较大的区域性或者省级医院，而且往往配备有几个多职能的人员。

中级实验室的工作除了为所辖的地区提供常规服务外，主要任务是为基层实验室提供支持。这种支持包括配制分发试剂、耗材（玻片、痰盒等必需品），确保基层实验室能够不间断的提供服务。

重要的是，中级实验室对基层实验室的支持应包括定期现场督导、回顾总结开展的活动、发现遇到的问题，并且及时将室间质量控制结果反馈到基层实验室。这将极大的鼓舞基层实验室人员，因为他们工作相对独立，很少有机会与上一级的人员讨论技术或者其他问题。

反过来，中级实验室接受国家参比实验室提供的支持，通过这样与国家结核实验室协作确保实验室网络中的各个环节能够顺利运作。中间级实验室是国家政策和指南贯彻执行的最重要的部分。确保所有过程在整个国家统一地执行。

中级实验室负责基层实验室的室间质量保证工作，并将结果反馈到基层实验室，还要向国家实验室提供相关的结果和信息。

C. 国家结核病参比实验室的职责

低收入国家结核病控制规划的中心任务就是通过痰涂片发现病人并给予有效的化学治疗。国家结核病参比实验室应通过全国的实验室网络，必须优先开展用于支持这个目的的活动。因此国家结核病参比实验室的主要任务包括：

- 确保基层卫生单位在常规的涂片镜检中保持高水平的熟练度
- 在全国范围内推行标准化操作

- 组织、协调实验室网络中各级人员的培训
- 组织国家实验室网络中涂片镜检的质量保证
- 开展耐药监测
- 开展实施性研究

很显然，国家结核病参比实验室很少能够开展全国范围内的培训、督导以及涂片镜检的熟练度测试，这也不是最有效的利用资源的方式。但是，国家结核病参比实验室总的职责是制定标准、评估政策的执行情况。将某些活动分散化是很有必要的，国家参比实验室应该牵头鼓励中级实验室（区域实验室、省级实验室）参与全国实验室网络中的各项重要任务。长远来看，有效的分散以便越来越有效率的为国家结核病防治规划提供支持是很有必要的。

1. 保持常规涂片镜检的熟练度

全国范围内都可以得到涂片镜检服务，因为它主要依赖于一般的医疗服务体系中的多功能显微镜。

图I.1显示了各种用于鉴别肺结核的方法的敏感度。各种方法的相对检出频率都是估计数并受人群中各组成部分的影响。在发达国家，或者是在主动发现病人时，往往遇到的是处于疾病早期阶段的病人，只有很小比例病人涂片阳性。在所有的诊断方法中，临床症状和胸片的检查是最敏感的工具，当然要牺牲特异性。

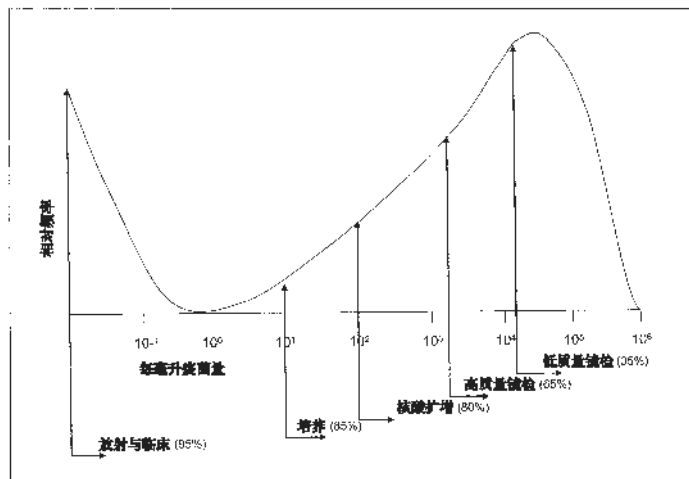


图 I.1 通过检测痰标本中菌数量的多少显示了不同的方法在诊断肺结核时的潜在收

益率。

在熟练和有经验的实验室，每毫升痰标本10个菌即可以通过培养方法检测到。某些情况下培养方法可能没有那么敏感，如由于标本的运送时间过长、培养前处理的方法、离心及其他必要步骤的不同影响到其固有的敏感性。分枝杆菌活性的降低是不可避免的。

核酸扩增技术可以检测到每毫升标本中含有100个菌。该方法的一个优势是不需要活菌，因为死菌同样含有靶核酸。为了成功地得到可靠的核酸扩增试验的结果，需要配备专用的基建房屋、设备以及高度训练有素的人员并注意各个操作细节，而且需要比涂片和培养更多的费用。而且，核酸扩增阳性结果并不能提供分离物用于菌种鉴定和药敏试验。

涂片镜检的局限性（推荐检测100个油镜视野）在于需要大量的菌才能检测到，每毫升痰标本中有1,000个以上菌有60%的机会检测到，每毫升标本中有10,000个以上菌则有95%的机会检测到。即使是镜检技术较差，每毫升标本中有30,000-60,000个菌往往也可以检测到。相对于培养来说，涂片镜检在诊断肺结核方面敏感性较差，但是在筛查接触者鉴别可疑传染源菌时高度敏感（图 1.2）。从公共卫生角度讲，涂片镜检的目的是最大范围的发现社区中的传染源，确保实验室保持最高的熟练度。

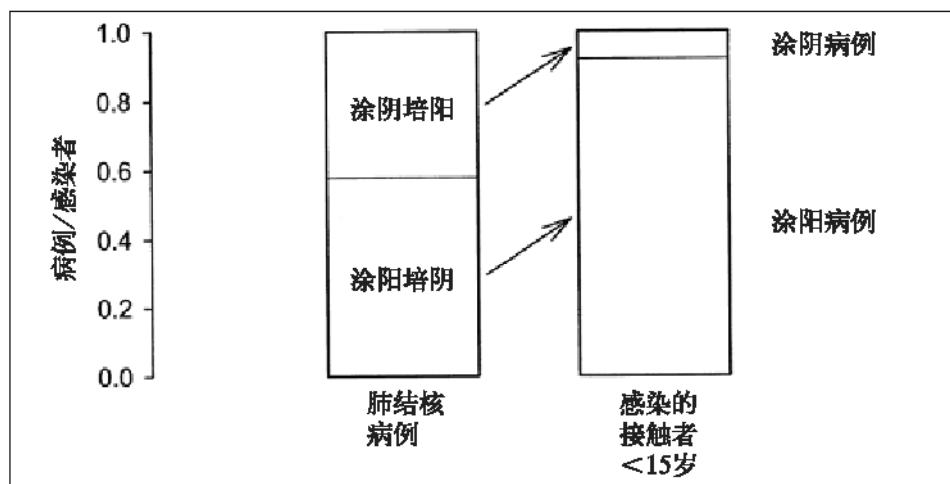


图 1.2 涂片镜检在鉴别培养证实的结核病人以及社区中结核菌的传播者的敏感度（数据来源于Grzybowski S, et al. Bull Int Tuberc 1975,50,90-106）。

国家结核病参比实验室的主要任务是确保全国实验室网络工作的质量。为

了保持能力和可信性，国家参比实验室必须具备基层实验室各种常规工作活动的熟练度，也就是说国家参比实验室应该常规检测从特定的实验室送来的可疑结核病人的标本。

为了维持细菌学诊断的能力，必须有一定数量的阳性结果。世界防痨联盟已有的经验表明，进行痰涂片镜检可疑者中的平均阳性率为15%，但是根据可疑病人中患病率的不同，范围从5%到30%不等。如果推荐初诊可疑者查3份痰，结核病人随访查痰3次，发现每个涂阳病人需要检查的涂片是 $(3/0.15)+3$ ，即23张。对于每个病人来说，需2张阳性涂片作为诊断（定义）。随访阶段，每10个病人中有1个病人在治疗2个月时涂片阳性。这相当于每个病人有2.1个涂片阳性。以每天的工作量为20-25张计算，如果是全职每年的工作量为6000张涂片，包括500张多阳性片。如果每周能够检测1-2张阳性片仍然能够保证熟练度，但是没有一个确切的确保熟练度的最低的涂片数量限制。

国家结核病参比实验室也许会冒着这样的风险，即日常工作量过大，而不能完成最主要的任务包括质量保证、培训和督导。当每天的工作量超过30张时推荐用荧光染色方法。尽管单一使用这种方法很吸引人，但是仅仅使用这种方法是不明智的，因为必须保证萋-尼氏方法的熟练度。无论选择哪种方法，萋-尼氏方法都必须坚持应用，即使每日的工作量很大（这种情况下仅有一部分的涂片用萋-尼氏方法）。参比实验室提供的服务必须与综合性医疗机构提供的一样，因为要对基层卫生单位的工作人员提供持续不断的培训。实验员必须能够得到在日常工作中经常遇到的问题相关的培训。

国家参比实验室通过积极参与复检涂片（第二复检者）维持萋-尼氏染色方法熟练度。如果日常工作量太大，应该将常规的萋-尼氏检测工作分担给其他医疗中心或者医院，以便保证将主要精力放在最优先的工作领域。

2. 基层实验室痰涂片镜检的培训和质量保证

质量保证：持续提高实验室服务的可靠性和有效性的体系。包括3个组成部分：

- **质量控制（QC,也称为室内质量保证）：**控制涂片镜检实验室的操作包括设备检测以及每批新染液的检测的所有方法。
- **室间质量评估(EQA)：**通过批量测试和盲法复检，通过将被评估实验室的结果与网络中的其他实验室（中间级实验室或者国家实验室）的结果相比较而评估该实验室的能力。室间质量评估还包括现场评价操

作的质量、现场阅读片子。

- 质量提高 (QI)：分析痰涂片镜检诊断服务的各个方面，旨在永久改善不足地方的过程。资料收集、资料分析、创造性地解决问题是质量提高的核心部分。包括连续性的监测，发现不足，提出整改措施（如需要时再培训防止错误的重复发生）。质量提高经常依赖于有效的现场评估。

痰涂片实验员的培训必须与日常工作相关。培训的主要目的是加强实验员在常规应用技术的熟练度，因此理论的讲解应尽量少，培训的三分之二时间（通常培训的时间为5天）应该用于现场显微镜实习。

国家参比实验室的职责是确保基层实验室提供的痰涂片镜检服务按照标准化操作程序进行，并且有高水平的熟练度。这就意味着国家参比实验室主任必须详细制定督导地区级以及所辖市、县的年计划。这些督导最好与国家结核病防治规划一起。这种督导提供了全程督导日常工作的机会。尽管直接督导是最重要的质量保证方式，但是必须建立正式的痰涂片镜检的室间质量评估体系。这个体系的主要目的是维持和持续提高痰涂片镜检服务的质量。

为了确保室间质量评估能够覆盖全国，中间级实验室积极参与到室间质量评估中是非常重要的，因为国家级实验室直接与基层实验室相联系是不可行的也是不必要的。

只有实验室网络和国家结核病防治规划有效的合作，在整个国家室间质量评估才可能正确地执行。室间质量评估需要到基层实验室抽片并将结果及时反馈给基层实验室。如果没有规划的人员，EQA也不可能在全部的规划单位开展。如果想室间质量评估成功实施，规划人员必须参与抽片并提供结果反馈。

3. 耐药监测

耐药监测是国家结核病参比实验室的主要任务之一。在任何地方，耐药监测都是很复杂的，需要：

- 理解有代表性的抽样以及抽样对于获得有意义结果的关键性
- 构建规划活动与实验室网络的密切合作机制
- 确保收集质量合格的痰标本和适宜的标本运输条件
- 痰标本匀化、前处理、接种、培养结果判读和菌种鉴定的技术能力
- 药敏试验的熟练度
- 室内质量保证和室间质量评估的体系

本书旨在促进规划管理者和实验室专家之间的合作，以获得一个有效地对

当地耐药的评估。

D. 国家结核病参比实验室的人员配置和工作日要求

为了确保更好地开展工作，国家结核病参比实验室必须有足够的人员。对于一个小国家来说，实验室的最低人员数量要求如下：

- 实验室主任 1人
- 实验室高级副主任 1人
- 涂片镜检实验员 2人
- 培养相关实验员 2人（轮流，负责制备培养基、接种、药敏试验、结果判读）
- 洗刷、清洁 1人（高压、洗刷、废弃物处理）

一旦工作量增加要相应的增加员工的数量。

实验室主任负责整个参比实验室的运作并且与国家结核病防治规划密切合作，执行国家结核病控制的各项重要工作。尤其重要的是参比实验室的各项职能要优先。理想状况下，实验室主任的资历应该拥有微生物学、医学或者相关专业的博士学位。实验室主任应该具备高水平的组织、协调、执行各种任务的能力。

实验室副主任应该有足够的能力承担实验室内相关的各种各样的活动，实验室负责人不在时应该承担相应的职责。具有的资历与实验室主任应该是相同的，但是在年资方面可以稍逊一筹。

参比实验室中训练有素的技术人员应该在光学和荧光显微镜中都具备相应的知识。这对于确保高质量的常规服务、提供培训、协助涂片镜检的室间质量评估都是重要的。

为了确保和维持高水平的标准培养和药敏试验技术的熟练度，必须由2个人负责该项工作。

需要一个全职的实验室辅助人员负责污染物的消毒、洗刷、日常的实验室清洁。

应该避免国家级参比室与其他参比实验室的人员进行轮转，这样会导致工作效率很低。

参考文献

1. Aziz M A, Ba F, Becx-Bleumink M, Bretzel G, Humes R, Iademarco M F, et al. External quality assessment for AFB smear microscopy. In: Ridderhof J,

- Humes R, Boulahbal F, eds. Washington, DC, USA: Association of Public Health Laboratories, 2002.
2. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. Second edition. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997.
 3. Enarson D A, Rieder H L, Arnadottir T, Trébucq A. Management of tuberculosis. A guide for low income countries. Fifth edition. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
 4. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
 5. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. Third edition. WHO/CDS/TB/2003.313:1-108. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.
 6. World Health Organization. The WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world. Report No. 3. Geneva, Switzerland: WHO, 2004. WHO/CDS/TB/2004.343:1-129.
 7. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part I: Organization and management. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.
 8. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.
 9. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture. Geneva, Switzerland: WHO, 1998.

第二章

痰涂片镜检

Robert Koch在1882年首次发表文章发现结核病的致病菌时，已经描述了染色和培养的方法。Robert Koch的染色方法使用初染液和媒染剂（使染色剂更好的渗透入富含脂质的细胞壁）、脱色剂、复染剂。这样做的原因是脂质是疏水性的，染色剂很难渗透入细胞壁内。Robert Koch使用亚甲基兰作为初染液，碱性氢氧化钾溶液作为媒染剂。他没有用脱色剂而使用vesuvium既作为脱色剂又作为复染剂。Ehrlich提出用复红作为初染液（在其他的选择之中），碱性苯胺作为媒染剂。他还提出硝酸作为脱色剂，如果初染液是红色（如复红）的应该用蓝色背景。Ziehl对媒染剂提出了质疑，他建议用苯酚。Neelsen将所有好的方面结合起来，他建议使用Ehrlich的初染液，但建议使用Neelsen提出的媒染剂（苯酚），脱色剂由硝酸改为硫酸，这也就是Ziehl-Neelsen染色方法的基础，诞生于1882年。

涂片阳性的病人是最强的传染源。涂片镜检的敏感度（辨别出真正肺结核的比例）对于诊断肺结核还远远不够完美。如果技术娴熟，在患病率高的国家大约有三分之二的最终培养证实阳性的病人可以通过涂片镜检发现。但是这种比例在合并感染HIV的病人中会低一些，在儿童检出率也大大降低。然而，涂片镜检在发现传染源方面的敏感度超过80%，无论如何，涂片阳性的病人相对于阴性的病人讲更容易传播结核菌。因此，痰涂片镜检在国家结核病控制规划中是最有效的、效率最高的病人发现的方法。这种方法能够有效地发现结核病控制中最应优先发现的病人。而且，痰涂片镜检在发现抗酸菌方面有很高的特异性，在患病率高的国家几乎完全被诊断为结核病。而且，这种方法提供了一种非常快速的诊断方法。在患病率高的国家，任何级别的实验室的任何一个医务人员，借助于一台多用途的设备即可开展涂片镜检。正因为如此，痰涂片镜检是结核病控制中的最基础的诊断方法。

A. 收集痰标本

无论对病人还是对于实验室人员，痰标本的收集应做到尽可能的便捷有效。诸多研究表明，检出病例的增加值随着连续收集的标本而降低。大多数国

家采用WHO和国际防痨联盟推荐的收集三份痰标本作为发现传染性肺结核病人的最佳方法。在最终痰涂片阳性的病人中大约80%在第一份痰是阳性，15%在第二份痰是阳性，另外5%在第三份痰是阳性。然而，最近的几个研究显示依赖第三份痰检出阳性的只占1%–3%，这样为进一步发现剩余的病人而增加了大量的工作量。需要多少张片子才能再进一步发现一个病人取决于可疑者中的患病率和涂片镜检的阳性检出的增加值。例如，如果可疑者中的阳性病人为10%，依赖第三份痰标本检出阳性的比率为5%，那么依赖第三份痰标本（前两份标本为阴性）发现一个病人需要镜检的片数为 $1/(0.1 \times 0.05)$ 或者200张，这是8–10天的工作量。如果第三份痰标本检出的阳性比率更低，则需要的工作量相应加倍。由于在HIV高流行国家实验室涂片镜检的工作量急剧增长，因此在这样的地域正在考虑是否可以采用收集两份痰标本用于诊断的政策。

涂片镜检的低敏感性正在不断地被指责，一些更加敏感的方法（但是很复杂同时耗费大量的劳动）正在被提议广泛应用。每个国家应该考虑到阳性检出的增加幅度，因地制宜的制定最适合自己的政策：

- 如果人员充足或者荧光染色镜检能够为大量的痰标本提供准确的结果，应该检测三份（或者更多）痰标本以增加敏感性。病人能够在病程的较早阶段就诊时，这种方法尤其好，因为早期痰标本中的菌并不是匀质存在的。

- 依赖第三份痰标本检出阳性的比率低时，检测两份痰标本（间隔1–2周）对于诊断来说是非常有效的（尽管应用了用于其他感染的抗生素但是症状仍未改善）。这也许也是最敏感的策略，特别是在由于工作量过大引起镜检质量差的地域。

推荐的采集三份痰标本（首次就诊时采集第一份，次日清晨采集第二份，病人将第二份晨痰送来时采集第三份痰标本，即所谓的即时痰–晨痰–即时痰）是介于最佳阳性检出率（晨痰）和方便病人（即时痰）两者中间的一个折中的方法。采集三份晨痰以获得最佳的涂片阳性检出率不太切合实际，因为这需要病人多次到医疗机构（四次）。如果收集的都是晨痰，则第一份痰标本检出阳性的占95%，原因是即时痰的质量往往较晨痰质量差。另外，在HIV高流行地区由于工作量的增加，可能只对第一份痰标本给予足够的重视和耐心的检查。病情严重的门诊病人应该收集即时痰并给予立即检查，而住院的可疑结核病人应该连续收集三天的晨痰，而不是敏感度较低的即时痰–晨痰–即时痰。

当前推荐的阳性结核病人的定义是有两份痰标本阳性，争论的主要焦点是需要第二份痰标本用于排除由于标本的交叉污染引起的假阳性。基层实验室发生这种错误的几率知之甚少。然而，仅有的几项研究表明发生假阳性（包括技术错误和判读错误）的频率只有1%–2%。通过室间质量评估抽取报告阳性的涂

片（以自然发生的阳性率）可发现这样的问题。发生一次这样的问题，应该给予足够的重视而且必须进一步跟踪随访而不必考虑统计学意义。

在患病率高的国家，与其他标准的诊断方法如胸片检查、培养（交叉污染比较常见）相比，抗酸染色的极高的特异性仅仅由于偶尔的管理错误会降低。需要第二个阳性结果的原因是为了进一步证实，如果能够保证完全正确的技术操作，那么这只是为了增加严谨性而不是必需的（参照第三章）。任何情况下，得到一个阳性结果后要立即开始治疗，不要因为等待第二个阳性结果而耽误治疗，因为第二个阳性结果的目的不是为了指导治疗而只是区分病人是涂阳还是涂阴。

痰标本的质量是非常重要的。必须鼓励病人耐心的从肺部深处咳痰。即使这样，一些研究表明即使主要是口水痰也有可能检出菌，只是菌量很少。因此所有的痰标本都要进行镜检，如果没有其他的痰标本即使是看起来像口水痰的痰标本也要镜检，如正在接受治疗的病人。对什么样的标本绝对是口水痰给出一个既准确又操作性强的定义很难。为了记录常规标本的质量，往往用肉眼区分。这也许不是十分的准确，但是很有实际意义。主要将痰标本分为口水痰、粘液痰、脓痰、粘脓痰。按照这种分类，口水痰标本的特征是水性的，而没有粘液或者脓性的部分。更精确的方法是应用痰细胞学，即计算每个低倍视野下（大约放大100x）白细胞和上皮细胞的数量。如果白细胞与上皮细胞数量之比小于1，那么这份标本含有大量口水痰的可能性增加，然而只要有白细胞存在，获得阳性镜检结果或者阳性培养结果的可能性还是很大的。

B. 痰涂片镜检申请

对于痰标本的镜检，标本收集与染色之间的时间间隔不是特别重要。因此，标本或者痰膜可以由收集点送到距离较远的实验室进行镜检而不影响准确率。然而，大多数的国家采用送病人到最近的痰检点的策略，因为尽管理论上讲送标本或者痰膜对于病人来说很方便，但是这样的策略在实际上是很难有效的实施的。运输已经固定的痰膜而不是痰标本也许是更容易的方法，但是这需要额外的培训和用于制备痰膜的简易设备。在大多数的贫穷国家运送标本的后勤保证仍然是一个非常严重的问题，很难以一种可靠的方式安排。

痰盒的种类是非常重要的，并且会影响采集的痰标本的质量。应该是防泄漏的、透明的塑料盒、广口、螺旋盖（螺纹为1.5圈），能够防泄漏、防干燥、防止气溶胶的形成(图 II.1)。容量应该至少20毫升。

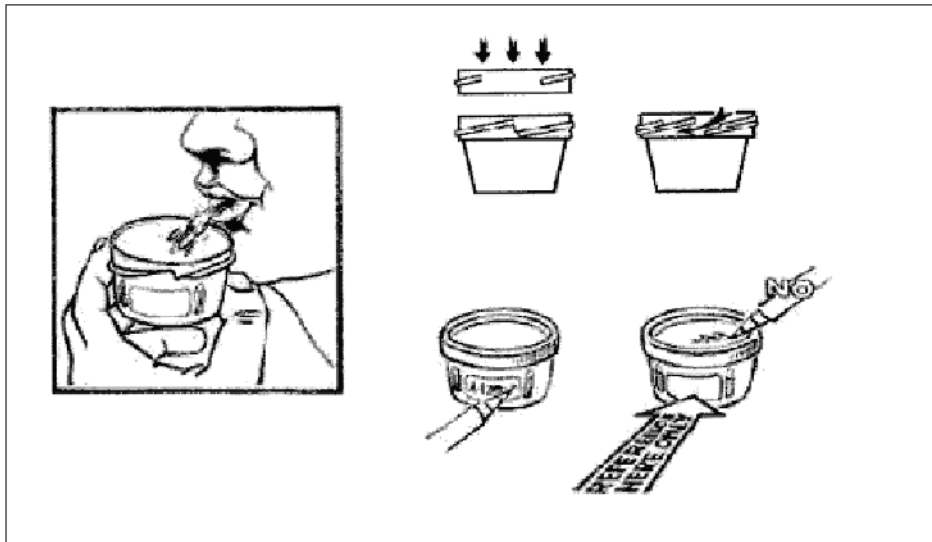


图 II.1 基层实验室收集痰标本使用的广口、螺旋盖、塑料痰盒

实验室人员获得进行痰检的病人的基本信息是非常重要的。这可以通过一张痰检申请单而完成(附件1)，门诊医生和实验室人员都应该有。门诊医生应在申请单上写明申请目的是为了诊断还是治疗随访。实验室人员应记录在登记本上，既用于管理（计算实验室物资需求）也用于流行病学评估。对于随访来说，病人的登记号和治疗的第几个月份应该显示；在结果得出后对于新登记的病人这种信息也要提供给实验室人员，并登记到实验室登记本上。

C. 痰涂片制备和染色

挑取痰标本质量最好的部分直接涂片，干燥、固定，用萋-尼氏方法染色，在普通光学显微镜下镜检。痰标本也可以经过浓缩后再涂片，用强碱或者次氯酸钠（漂白剂）消化后离心、沉淀、漂浮甚至是过滤。

最初的染色技术应用“饱和复红(Ehrlich)”或者含有0.75%碱性复红的石碳酸复红溶液(Neelsen)。之后不久，Johnne与Neelsen交流后建立了一个新的方法：用1%复红，热染至蒸汽产生，25%硫酸脱色，亚甲基兰复染。然而，随着时间的改变，这项技术已经改进，现在常用的浓度是0.3%石碳酸复红。除了碱性复红外用于光学显微镜检的其他染色技术也被应用，但是从来没有被广泛采用，另一方面各种各样的复红技术的变更倒是很广泛。用饱和（3%）复红染

液冷染被称为Kinyoun 染色，尽管最初这种方法包含次氯酸盐消化、漂浮步骤。Gabbett将脱色和复染结合起来，减少操作步骤至两步，这在劳动力昂贵的国家很受欢迎。Tan Thiam Hok染色技术将冷染、饱和初染液与Gabbett修订的方法结合起来，同样被广泛应用。在一项研究中，对多种不同石碳酸复红浓度的染色方法进行了比较，1%复红热染15分钟表现出最高的敏感度且结果一致性最好。用酸酒精溶液代替硫酸或者其他酸脱色在能够负担的国家采用，因为脱色更加容易干净。代替甲基蓝的孔雀绿有时作为常规应用。用后者的缺点是对某些色盲或者色弱的试验人员不便（可能有不多于10%的男性是红绿色盲）。尽管有研究表明苦味酸是最佳的复染液，但是常规应用相当困难。

在某些国家光学显微镜被荧光显微镜代替，如在患病率低且人力费用远远高于仪器费用的国家，又如阳性级别低的标本很多的国家。这项技术需要不同的染液。金胺O经常作为初染液，单独或者与罗丹明一起应用以增加分辨率。荧光染色方法的背景染色存在多种方法，高锰酸钾用来猝灭非特异性的荧光，但是也有不复染或者应用吡啶橙、噻嗪红或者亚甲基兰作为复染的。然而这些方法可能会大大降低视野与背景的对比如。最近，在现场有人发现用稀释的蓝墨水很好，不仅没有使背景变深还有很好的对比，如果背景过黑将会影响聚焦（正如高锰酸钾有时所表现）。加入一些酚将会减少人为荧光假象(data courtesy, K Feldmann, Kuratorium Tuberkulose in der Welt, Gauting, Germany, 2 July 2004)。

1. 直接制备痰膜

制备痰膜之前试验人员必须决定选取哪一部分标本。痰标本往往不是匀质的，除非痰标本放置过夜（如第一份即时痰），这会发生局部自我分解。如果痰标本有明显的脓性部分，应该选取。细的一次性的涂抹棍（竹质或者类似的材料）比接种环好，因为它容易挑取需要的标本且足够坚固方便涂抹痰膜。而且，竹签用完后可以销毁，接种环在下次接种前必须将其放到含有沙子的酒精溶液中进行清洗、消毒（基层实验室中很少能做到），然后灼烧。显然应用竹签较安全、省时。竹签的断端是纤维刷，握住竹签将其与玻片垂直，那么很容易均匀的将标本涂抹在玻片上。椰子叶、棕榈叶纤维很少，木棍往往有一个尖端，涂抹痰膜的效果不太令人满意。

涂抹好的痰膜并非像看起来那样容易，需要锻炼和耐心。好的痰膜不厚不薄，涂抹均匀，需要长时间的划圈涂抹。不要在火焰上涂抹，这可能造成非常不均匀的痰膜。整个痰膜或局部痰膜过厚可能影响阅读染毕的片子。痰膜过厚

还可能造成在染色时发生痰膜脱落，因为很难合适的干燥和固定。作为标准，合适的痰膜厚度应该在未染色时能够透过痰膜阅读报纸上的字，痰膜均匀的分布在片子上。一个染色好的片子应该是亚甲基兰复染的亮蓝色。如果是深蓝，则可能是痰膜太厚。推荐的大小是20mmX10mm，20mm的长度相当于100个油镜视野。因为实验人员在读片时主要专注于阅读而不是数视野，因此推荐这样的涂片尺寸。

加热固定前，应该自然干燥避免在阳光下直晒。不要加热湿的痰膜，因为可能破坏分枝杆菌，或者造成玻片断裂。在非常潮湿的条件下，可以将一玻璃盘放于照明灯上面，然后将玻片放置于玻璃盘上可以加快干燥的过程。

已经有多种设备用于涂片过程中增加安全性，如玻片固定器、金属板。这些不是不可或缺的，一些随时可得的如报纸、纸巾覆盖在涂片工作区域（每日更换）可以发挥同样的作用。

2. 痰标本的浓缩

标本浓缩是培养的一个标准的准备步骤，通常离心的沉淀物要再镜检。这种方法提高了敏感度。然而若想有效，需要强力的离心机，因为抗酸杆菌非常容易漂浮。在低收入国家的镜检单位，这些通常难做到。

其他过去应用过的浓缩技术，如以絮凝为基础继而离心或者漂浮，最近又引起了新的注意。应用次氯酸钠（普通家用漂白剂）消化后浓缩已经被广泛研究，结果也很令人鼓舞。此项技术，将痰标本与等体积的5%漂白液混匀，静置30分钟。尽管一个研究显示不经过离心，静置后的沉淀物也能检出额外的阳性标本，但是多数情况下静置后要用水稀释然后再离心。经漂白液消化后的痰标本很容易离心，有很低的离心力就足够。沉淀物过夜后阳性率增加。即使在设备很简陋的国家也可以应用这项技术。应用漂白技术可以杀灭分枝杆菌，这使得痰标本安全但是却不能再用于培养。漂白消化后还有一些其他的浓缩技术，如浮集，消化的痰标本与有机溶剂（电油、氯仿）混合震荡后分枝杆菌会漂浮在液体表层，或者用酒精处理后过滤。

不幸的是，漂白消化后浓缩并不总能够提高敏感度。至于特异性，有可能带来假阳性结果，例如因为重复利用离心管而带来交叉污染，或是因为环境中的分枝杆菌污染稀释用水。还有一些研究者报道漂白消化离心这种方法没有什么帮助，甚至会降低阳性率，也不适用于随访的标本或者水样痰。当直接涂片镜检的质量不好时，漂白消化可能有助于增加敏感性。对于阳性级别高的标本，或者拥有很好的直接涂片萋-尼氏染色技术，这种方法的作用很小，而且

很难判断会带来多大的额外的工作量或者是增加多少假阳性的风险。

漂白处理通过几方面的作用改进抗酸染色镜检的结果。按照报道的结果，仅仅是静置30分钟后就能增加阳性，因此浓缩技术可能不是最重要的作用。痰消化后使痰标本匀质，因此选择标本中正确的颗粒显得不是非常重要。这种方法使得制作痰膜很容易，且容易阅读结果，因为均匀的厚度以及背景不会掩盖抗酸菌。因为用强氧化物处理可以使得染色变得容易，所以漂白液处理可以弥补由于质量差的石碳酸复红或者染色技术而带来的假阴性结果。很显然，合适的涂片、染色以及仔细的阅读会有同样的效果。这种情况下，漂白消化浓缩只能增加阳性级别低的标本的阳性率，如在结核病人合并感染HIV率高的地方。目前为止，只有一项研究显示HIV阳性病人相对于HIV阴性病人，漂白消化浓缩方法的阳性检出率更高。这种方法应该在HIV高患病率的地区进行进一步的研究。在基层单位何时选取浓缩方法还不清楚。

3. 抗酸菌的染色

抗酸染色镜检的染色已经有多种方法，但是并非所有的方法均适用于全国结核病实验室网络。在全国统一应用一种标准化的方法非常关键。规划必须坚持用一种方法以及与这种方法相适应的合适染液。规划选取涂片镜检方法的关键点是选择一个光学和一个荧光的显微镜检技术，在整个系统内标准化。若每个实验室用不同的方法，那么就不可能进行有效的质量保证。订购试剂也变为不可能，因为不同的方法需要不同类型、不同量的试剂。而且也经常容易发生错误，如将一种方法的染液不适当的用于其他的方法上。从长远考虑，用统一的标准方法培训新工作人员或者确保已经参加过培训的人员改用推荐的技术是一项很好的投资。冷染方法，即使是用高浓度的染液在某些实际情况下也是不可靠的，如Kinyoun方法。除非延长染色时间，否则往往只能检测到很少的阳性结果。事实上，延长染色时间经常没有被执行，最终的结果会造成假阴性。因此国家规划应该选择热染。除了染色时间和加热时间，若想获得深红色的抗酸菌、增加检出率，复红（苯酚）的浓度是一个非常重要的因素。若想获得高浓度的复红需要高质量的能够很好溶解的复红粉末。另外还要确保复红没有放置的时间过长。在规划情况下这些要求经常不能满足。另外，在一些大型的繁忙的实验室还经常发生染色的错误。正因如此，作者喜欢用1%的染液染色10-15分钟而不是用世界防痨联盟和WHO指南中推荐的0.3%的染液染5分钟。以他们的经验，这种染色方法在常规应用时效果非常好。尽管0.3%的浓度染色5分钟在参比实验室也可以获得相同的结果，但是这太接近于最低要求，几乎不允

许犯任何错误。许多国家应用最初的标准即1%浓度的强石碳酸复红，效果很好。

石碳酸复红的过滤非常必要，过滤时要沿着垫有滤纸的漏斗倾倒染液至玻片上。其他的技术不再被推荐。假如在储存试剂瓶中的染液很少，剩余的染液应该弃掉，因为没有滤纸能够完全截获染液中含有的大量结晶。

确保盖满玻片的石碳酸复红加热至冒蒸汽并保持5分钟非常重要。重复加热和延长染色时间没有害处，相反，这可以带来更深的红色，当然前提是石碳酸复红不干燥在痰膜上。为了防止干燥，染液应该总是覆盖整个玻片。为了方便操作，要将染色架放在洗手池中，玻片之间要留有足够的空间（一指宽）避免染液从一张玻片流向另一张玻片。

4. 脱色

脱色对于去除抗酸菌外多余的石碳酸复红非常重要。需要使用强酸。在脱色液中加入酒精不是绝对必需的，但是可以使得玻片脱色更干净。擦去玻片背面的染液，有时即使用较便宜的用水稀释的酸也可以得到满意的效果。多数情况下，20%–25%的硫酸或者3%盐酸乙醇都能够提供好的脱色效果。染色很好的抗酸杆菌用水稀释的酸脱色几乎不可能，所以这种情况下脱色时间的长短不是最重要的，如果一次脱色后红色仍然很深，那么可以重复脱色这一步骤。过厚的痰膜不易很好的脱色。盐酸乙醇比硫酸脱色能力更强，因此脱色时间不应该过长。选择酸乙醇还是以水稀释的酸取决于每个地方的可行性以及乙醇的价格（因为需要的乙醇量很大）。还有其他的方法稀释酸，但是这些溶剂的实际价值还有待于仔细研究，以确保如费用、易用性和结果等优点能够达到同样的水平。

5. 复染

复染要能保证形成鲜明的对比，保证即使在涂的很厚的片子中，能将红色的背景而非抗酸菌掩盖住。要能给予片子上足够细节使得技术人员在镜检时很容易聚焦，但是也不能因背景过重而分散了注意力。

亚甲基兰在染色时能形成鲜明的对比，但有时并不最理想，在涂得很厚的片子或者染色时间过长的时候，可能将抗酸菌掩盖住。因此，一些专家建议亚甲基兰浓度为0.1%（而不是表Ⅱ.1推荐的0.3%），而且染色时间小于1分钟。如果这种方法使得背景过红，则说明片子涂得过厚。如果这些因素都考虑进

去，很容易发现是涂片技术存在缺陷还是脱色不够。

其他的方法也能获得好的复染结果，例如轻染，用稀释的孔雀绿或者碱性亮绿液，在片子厚的地方很容易与复红形成对比（但是对于色盲的人来说是不适用的），因为即使是长时间的染色，也不容易掩盖红色的抗酸菌。

6. 冲洗水

必须保证冲洗水的干净，而且，如果因质量评估而要做重复染色的话，要使水中没有分枝杆菌。因为环境中的分枝杆菌会使涂片污染，尤其使用一个橡胶管子直接套到水龙头上是来源之一。另外，可以用过滤后的水放在大口杯里代替自来水，因为它是能够完全进行清洁的。

7. 准备萘-尼染色液

制定规划的时候应尤其考虑到复红粉末和苯酚的质量，必须购买质量合格品，而用于染色的其他化学物质（酸、酒精）可以是专业级的。制备合格的染色液需要一些设备和好的技术。购买地必须集中在中级或中央实验室的地域，以便随时可以向显微镜中心提供染液。至少要保证配制染液所用的水是纯净的、无菌的（蒸馏或超过滤水，而不仅仅是沸腾或去离子水），有合适容积的带刻度的量筒及其他玻璃容器。另外，规划要保证这些级别的实验室有制备染液的详细过程手册。天平精确度要达到0.1g水平。苯酚应是液体的，并通过体积量取。如果配制1%的石碳酸复红，则不需要考虑粉末中染色剂的含量，量也不必那么精确。配制的方式是很重要的，尤其对于复红，因复红的溶解度随着其组成成分的不同而改变。

制备染液的实验室必须负责在下发染液前对染液进行适当的鉴定和质量控制，至少配制时要在每一个瓶子上注明染液名称和配制的时间，要作为质量控制记在染色质控记录本上，这可以作为后续工作的参考。对染液的质控需要对固定好、没有染色、已知阳性和阴性结果的片子做复染，最好是只经过一次染色、1+的阳性片子，这便于后续对此片的抗酸菌的数目和颜色的强度评价。复红的最大吸收峰超过550nm，抗酸菌的染色会很深，而且不易掉色（尤其是复红浓度为1%，苯酚的浓度为5%，染色时间足够长）。阴性对照显示没有环境分枝杆菌污染。在镜检前需对酸和亚甲基兰反复检测，如果按照以上要求过滤石碳酸-复红，则现配制的染液不再需要过滤了。染液储存在黑色瓶子或紧闭的柜子等没有阳光直射的地方，石碳酸复红的保存期随试剂质量、配制、浓度

以及储存条件不同而改变。因此，要根据一年内消耗用量制备。酸和亚甲基兰的保存期不是问题。

表 II. I 配制萋-尼染色方法染液需要的材料和试剂以及染色方法

1L 石碳酸复红染液配制方法	
变性乙醇或甲醇	100.0ml
苯酚晶体	50.0g
*碱性复红	10.0g
水（如果条件允许，最好蒸馏）	850.0ml
*在很多推荐方案中，可能只需要 3.0g 的碱性复红，此章节的作者推荐高浓度以增加安全域。	
将石碳酸溶解在乙醇中，加入碱性复红搅动混合物直至所有的晶体都溶解，有些品牌的品红不易溶，在这种情况下，需要不断搅动后逐渐加入水，最后把剩余的水全部加入，再次混合。	
将配制好的染液转移到瓶子里（最好是黑色），并贴上标签：“石碳酸复红染液，配制日期=…”	
1L 脱色液配制方法	
冷水（如果条件允许，最好蒸馏）	750.0ml
缓慢加入浓硫酸	250.0ml
或者	
96%乙醇	970.0ml
加盐酸	30.0ml
1L 复染液配制方法	
亚甲基兰	3.0g
水（如果条件允许，最好蒸馏）	1000.0ml
染色时，玻片必须放置在染色池的染色架上，有痰膜的一面朝上，两个玻片间的距离大约为一手指宽。	
1) 用带滤纸（例如，whatman1 号）的漏斗过滤复红将其铺满玻片表面，缓慢加热至产生蒸汽，注意不要加热到沸腾或使玻片表面干燥。持续热染 5 分钟。	
2) 缓慢冲洗玻片，直至所有肉眼所见色都被冲掉。脱色液覆盖整张玻片 3-5 分钟，并用干净的水冲洗，用镊子夹住玻片去掉多余的冲洗水，如果仍有红色则重复这个过程一次，最后用镊子夹住玻片去掉剩余的冲洗水。	
3) 用亚甲基兰铺满玻片，时间小于 1 分钟。用干净的水冲洗玻片直至多余的染液被冲掉，用镊子夹住倾斜玻片甩掉多余的水，并将玻片放在干燥架上，在开放的空气中干燥，但避免阳光直射。	

8. 金胺O的荧光染色

如果每个技术员的日工作量超过30张，能够保证持续供电，则应用金胺O荧光染色法，用金胺O的荧光染色法前必须考虑培训和其他资源的因素（投资和维修），另外，应经常更换卤灯（最长工作时间为100-200小时）。因为需要进口而且非常贵，通常情况下没有货存。结果常常超过推荐的工作期，产生的光亮度、强度不够，这样的灯容易损坏，对显微镜损害很大，有经验的人才可以对灯进行调整，否则，不合格的显微镜一直这样用下去会导致假阴结果。

荧光染色的最大优势是可以低倍镜检，所以单位时间内能够看到更多的视野。荧光显微镜2分钟就可以看的区域，光学显微镜需要10分钟。荧光显微镜的主要缺点是太昂贵：至少是普通光学染色的5倍。在此两种方法上的花费主要由技术员的工资决定：在给予高的劳动费用后，他们的工作效率会提高。

除了荧光染料取代了石碳酸复红外，荧光显微镜和萋-尼染色的过程是一样的，另外脱色酸浓度要小些，用于淬灭背景的复染液，不是必要的（表II.2），哥本哈根Statens serum研究所对23,000标本研究发现，荧光染色法比普通光学染色法检测阳性标本稍敏感，特异性一致，但实际上不一定总是这样。因为实际中由于假象的存在包括表面上与抗酸菌相似的物质因此需要对荧光染色法进行更深入的培训，以取得与普通光学染色法一致的特异性。另外，视野对比越好，则可以浏览更多的视野，技术员更不易疲劳。当工作量大、涂片中抗酸菌很少的时候，敏感度会更高。

国家参比室人员必须熟练掌握萋-尼氏法和荧光染色镜检法。使用荧光法推荐初染液用金胺O。使用金胺O，抗酸菌在暗背景下呈现亮黄色，即使在只扩大200x-250x（物镜20-25x，目镜10x）时看的效果也非常好。如果在低倍镜下不能确认细菌存在，可以用更高倍数物镜（40x）的来确认。荧光染色时，若抗酸菌很少，可用萋-尼氏法对涂片重新染色确认，但是这样在检查可疑菌时存在一些问题，因为经过重染过程后，原有的少量的抗酸菌可能被冲洗掉，导致检出率低，这样会降低荧光法镜检增高的敏感度。

因放大倍数较低，实际观察的面积大，荧光检查与普通光学检查对于抗酸菌密度结果分级不相同。检查的面积与物镜相对倍数倒数的平方成反比，例如，40倍物镜×10倍目镜检查的视野是100倍物镜×10倍目镜检查的5倍，是200-250倍扩大的10-12倍，鉴此，必须根据放大倍数来调整分级标准。（表II.3：不同放大倍数的相对分级结果）。

表 II.2 荧光染色法染液配制需要的材料和试剂以及染色方法

摘自: Hagemann PKH. Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münch Med Wschr 1938, 85: 1066-1068, with a modification by Kuratorium Tuberkulose in der welt, Gauting, Germany.

金胺染色液

金胺 O	1.0 g
乙醇	100.0 ml
苯酚 (液态)	30.0 ml
蒸馏水	870.0 ml

将金胺 O 粉末溶解在乙醇中, 苯酚溶解在蒸馏水中, 混合两种溶液。工作液必须保存在黑色瓶子中。

液态苯酚经常配成储存液。将 9 份 (以重量计) 酚结晶溶于 1 份 (以重量或者体积计) 暖水中, 稍微加热。此溶液于室温保持液态 (酚熔点是 43℃, 酚与 6% 水混合熔点为 20℃)。

脱色液

浓盐酸	10.0 ml
95% 乙醇或甲醇	990.0 ml

永远是加盐酸到水中 (不能加水到酸中)

背景猝灭染液

高锰酸钾	0.5 g
蒸馏水	100 ml

可选的背景猝灭染液

墨水蓝	100.0 ml
蒸馏水	900.0 ml
苯酚 (液态)	5.0 ml

当高锰酸盐染色背景过暗, 很难焦距或者保持焦距时, 用此染液比较好, 关键是用用的显微镜系统。

染色步骤

染色时, 玻片放在染色架上, 痰膜面朝上, 玻片之间保持一定距离。

- 1) 将新过滤的金胺 O 溶液加到玻片上, 使之铺满全片。
- 2) 保持 20 分钟。
- 3) 每张玻片上加盐酸溶液。
- 4) 保持 2 分钟。
- 5) 用水轻柔地冲洗每张玻片, 直至全部染液被洗去。
- 6) 用高锰酸钾或墨水蓝溶液加到玻片上保持 1 分钟。
- 7) 清水冲洗。
- 8) 将玻片竖直放在干燥架上, 晾干。

染色后的涂片通常是浅棕色或蓝色, 如果颜色过暗, 说明涂片太厚。

表 II .3涂片抗酸菌数分级的标准 (萋-尼法和荧光法)

Union/WHO 标准	明视野 (1000 倍放大)	荧光 (200-250 倍放大)	荧光 (400 倍放大)
1000 倍视野=1 高视野	1 个痰膜横向长度=2cm=100 个高视野	1 个痰膜横向长度=30 视野=300 个高视野	1 个痰膜横向长度=40 视野=200 个高视野
结果			
阴性	未找到抗酸菌 /1 长度	未找到抗酸菌 /1 长度	未找到抗酸菌 /1 长度
极少	1~9 抗酸菌 /1 长度或 100 高视野	1~29 抗酸菌 /1 长度	1~19 抗酸菌 /1 长度
+	10~99 条抗酸菌/1 长度或 100 高视野	30~299 条抗酸菌/1 长度	20~199 条抗酸菌/1 长度
++	1~10 条抗酸菌/平均 1 个高视野	10~100 条抗酸菌/1 视野	5~50 条抗酸菌/1 视野
+++	平均 多于 10 条抗酸菌 /1 个高视野	多于 100 条抗酸菌/1 视野	多于 50 条抗酸菌/1 视野

D. 痰涂片显微镜检查

应使用双目显微镜检查, 显微镜要有油浸物镜(放大倍数100)和中等放大倍数(8倍或10倍)的目镜。在电力供应不规律的国家, 使用的显微镜最好既能用电光源也能用自然光源, 即能通过聚光镜聚光, 当用聚光镜时, 应选择光线好的区域, 并且去掉蓝滤光片以便取得好的光效果。

在检查涂片时, 在痰膜左边缘滴一滴镜油。注意滴管不要接触玻片, 避免镜油被污染以及抗酸菌污染到另一张玻片。在复染的蓝色背景下, 抗酸菌呈现鲜红色, 它们形态各异: 包括短的片段、伸长的类型; 可能染色均匀一致, 可能带有一条或更多的裂痕, 甚至颗粒; 有时出现单个菌体, 有时成一小团, 但很少聚成大团块。典型的菌体为细长、略带弯曲的棒状。若颜色正确、菌体形态符合标准, 可以认定它们是抗酸菌并报告。环境中的分枝杆菌、某些奴卡氏菌、棒状杆菌属孢子也呈相似的形状, 很难将它们区分开, 因此没有必要区分。奴卡氏菌可能会表现明显的不同, 如分枝的长丝。一些细菌或真菌的芽孢是抗酸的, 但是很容易和结核分枝杆菌区分出来。

多年来一直提议有不同的涂片抗酸菌数分级的标准, 世界防痨联盟建议涂片报告结果分为五组, 报告记录如下:

发现	结果
至少100个视野未找到抗酸菌	阴性
每100个视野找到1~9条抗酸菌	实际菌数/100个视野
每100个视野找到10~99条抗酸菌	+
至少50个视野中每个视野找到 1~10条抗酸菌	++
至少20个视野中每个视野找到10条以上抗酸菌	+++

作为标准，检查20mm长痰膜的一个长度报告阴性结果足够（相当于1000倍放大时的100个视野）。然而，如果是荧光显微镜下200-400倍放大镜检20mm长痰膜的，要检查的区域也要相应改变。如果仔细的观察，则100个高视野已足够，因为很少能在另外多看的几个视野里再发现阳性菌。常规的做就可以了，否则检查更多领域的收获不足以补偿由此带来的劳累。

菌量非常少的涂片(每100视野1~3条菌)与培养结果符合得不是很好，这种情况下要另查一份标本来证实。另一方面，对于4~9条菌/100个视野的情况，和培养结果的符合性是很好的。在运转良好的实验室网络，结果都是可以通过另一送检的标本证实的。每100视野发现1~3条菌是否重要由国家控制规划来确定而非实验室技术人员，这种结果必须记录下来，而且一旦在登记本和报告单上记录，就不能再更改。

E. 痰涂片检查结果的登记与报告

结核实验室检查专用的登记本已被证明是非常有效的(附件2)。IUATLD推荐实验室登记本要有两个基本的特征：1)区分可疑者和随访者的检查；2)在每一个受检者下而不是每次检查下划线，这易于统计可疑者中病例的比例，也便于根据所报告的阳性病例数，计算所需的实验室材料。另外，区分随访和可疑者的检查，清楚地记录病人的几个实验结果使得研究镜检质量的各项指标变得较为容易，以下将详述。

实验室登记本上的结果可能并不可靠，通常将一个痰标本的检查结果抄袭到第二个、第三个痰标本结果处。有时所有的随访者结果都是阴性（表明没有仔细检查标本，就认为它们应该都是阴性）。另外，缺少或偶尔报实际菌数的结果（又说明没有认真检查标本），这对病人管理很不利，无法正确评价规划，实验室质量评估也没有意义。对规划和目标过分的强调会导致虚假记载。例如，规划管理者要求每人三份标本，或要求过高的2月末阴转率，这就会导致作假。实验室技术员应该如实汇报和记录他们所见到的，管理者也应尊重真实准确数据，这也是实验室的质量指标之一。

参考文献：

1. Aber V R, Allen B W, Mitchison D A, Ayuma P, Edwards E A, Keyes A B. Quality control in tuberculosis bacteriology. 1. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. *Tubercle* 1980; 61: 123-133.

2. Allen J L. A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci* 1992; 49:99-102.
3. Bennedsen J, Larsen S O. Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Scand J Respir Dis* 1966; 47: 114-120.
4. Bishop P J, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970; 51: 196-206.
5. Engbaek H C, Bennedsen J, Olesen Larsen S. Comparison of various staining methods for demonstration of tubercle bacilli in sputum by direct microscopy. *Bull Int Union Tuberc* 1969; 42: 94-110.
6. Hagemann P K H. Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. *Münch Med Wschr* 1938; 85: 1066-1068.
7. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
8. Ipuge Y A I, Rieder H L, Enarson D A. The yield of acid-fast bacilli from serial smears in routine microscopy laboratories in rural Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 258-261.
9. Kubica G P. Correlation of acid-fast staining methods with culture results for Mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc* 1980; 55: 117-124.
10. Lawson L, Yassin M A, Ramsay A, Oladjide I, Thacher T D, Davies P D O, et al. Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; a step closer to a onestop diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 34-40.
11. Rieder H L, Arnadottir T, Tardencilla Gutierrez A A, Kasalika A C, Salaniponi F L M, Ba F, et al. Evaluation of a standardized recording tool for sputum smear microscopy for acidfast bacilli under routine conditions in low income countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1: 339-345.
12. Smithwick R W. Laboratory manual for acid-fast microscopy. Atlanta, GA, USA: US Public Health Service, 1976.

第三章

痰涂片镜检的培训和质量保证

A. 痰检人员的培训

国家结核病参比实验室的一项基本职责是实验室人员的标准化培训。要有一个总的考虑到人员周转和规划发展需要的培训计划，国家参比实验室负责培训的水平 and 频度，经常提供在有经验的实验室人员直接监督下的培训。中级实验室也应参与实验室人员标准化课程的制定，以及培训和再培训活动中，以促进这些活动的分散，包括撰写培训课程和标准化操作程序。

必须强调抗酸镜检并不难学，关键在于保持高质量的染色和读片。因此，在培训中只需花几小时学习理论，重要的是一周的实习，最好能现场监督下完成阳性标本的确认，通过核对质控样本来确认阴性片的能力也很重要。要保证有足够的时间准备和读片，可以设定目标，例如，要求100张不同级别的阳性及相当数目的阴性片子。

培训应该包括大致的理解国家结核病防治规划和DOTS策略，使实验员彻底理解并提高他们为结核病规划服务的积极性，也知道他们在其中发挥的作用。

通过讲授和深入的实践，学员们必须熟悉如下抗酸菌涂片镜检的技术和知识：

- 抗酸菌镜检和培养标本的收集，存放，运送。
- 粘液脓性痰涂片的准备。
- 固定、染色、脱色、复染。
- 显微镜的使用和读片。
- 向临床报告结果并在登记本上记录。
- 显微镜的简单维修和维护。
- 为室间质量评估而存放的玻片。
- 消毒、灭菌、废弃物的处理。
- 处理痰标本过程中的生物安全措施。
- 痰涂片镜检过程中出现问题的解决。

强化培训的价值是个引起争论问题，当政策有变化时，它们起到关键作

用（例如，当染色技术有变化时）。否则，那些常规作涂片而且室内质量评估很好的技术员可能不需要那些强化课程。偶尔，强化培训可作为额外的激励因素。

B. 痰涂片镜检的质量保证

质量保证项目的目的是提高痰检工作的效率和可信性。质量保证项目包括三个主要部分：

质量控制 (QC)：系统的工作内部的监督，技术过程，设备和材料，染液质量。

室内质量评估(EQA)：通过外部机构来评价实验操作，EQA包括现场评估实验室，评价质量，现场读最近的几张片子，以及通过批量测试和复检将其实验结果与其它实验室比如中间级、国家级参比室得到的结果相比，来评价参与考核的实验室。

质量提高(QI)：通过分析涂片镜检工作中的各环节，寻求永久地排除工作中障碍的方法。数据收集、数据分析、研究解决办法是此过程的关键。它包括持续的监督，发现问题，为了防止问题再次出现而提出的纠正办法，常常只有在现场督导时能有效实施纠正办法。

1. 痰涂片镜检质量控制

保持技术熟练度

为保持痰涂片镜检和结果解释技术方面的熟练度，根据结核病可疑者的发现率和卫生工作的开展状况，这个涂片量覆盖人口量为5~15万，假设连续的质量监测能够发现更多的错误，那么这些都能顺利开展。

染色

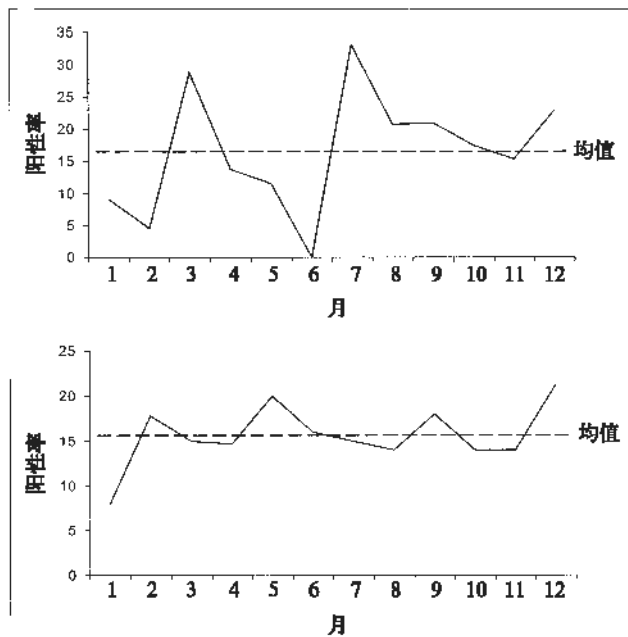
理想的情况，室内质量控制包括染液质量和染色步骤的监测，在常规的检测中加入至少有一个已知阳性片，阳性对照可以帮助区分抗酸菌和人为假象的结果。如果有可能，要有另外一个人对所有的阳性片子进行复检。

每批染色液下发或应用之前，至少要进行染色液检查，并保留记录(准备的日期，批号，目的地，质控结果)。每批染液的每次质控可用3个阳性涂片和3个阴性涂片。考虑到准确计数抗酸菌，阳性的片子应该是1+的，由此，应该使用蒸馏水，以排除用自来水可能产生的污染，以增加阴性质控片发现的异常污染物都是缘于质量不好（污染的）的染液的可能性。为了增加可能出现的污

染物能够黏附在痰膜上并抗酸的可能性，从而鉴别质量不好的染液，阴性质控片需要进行三次完整的染色过程。

病例发现的内部监督

把可疑者中阳性患者的比率根据月份做一曲线图，这是一个相对简单的工具(图III-1)，可用于了解实验室的工作收效。即使没有对一年的标本计算标准差，该结果提示临床医生病例发现不足或实验室工作有缺陷，或者两者均存在问题。如果可疑者中病例比例升高，高于一定的临界值(例如高于年均值两倍标准误)，说明送标本中有不可接受的限制性的策略，或存在阻碍病人去医疗单位的因素。提示实验室检查标本过于仔细，或者报告抗酸菌出现错误。另一方面，可疑者中阳性病例比例低于一定的临界值(例如，低于年均值两倍标准误)，临床医生可能让并不具备结核病可疑者条件的病人送标本。另一个原因，染液可能变质，或者实验室可能不够认真，漏检了真正的病人。



图III.1 示例，结核可疑者中病人的比例，以每月实验室检查为横坐标。数据来源于孟加拉国达米恩基金会项目。

2. 涂片镜检的室内质量评估 (EQA)

涂片镜检结果室内质量评估包括三个主要方法：

- 批量测试（中央到基层）
- 现场督导时监测痰涂片镜检的质量
- 玻片的盲法复检（基层到中央）

每个方法都有自己的优缺点，因此建议同时采用几种方法，细化每一个目标（见表Ⅲ.1），对于这些方法的指标、要求、技术指导可见参考文献2。

除了这些通常的室内质量评估方法，通过定期向高一级的单位报告实验室结果也可以作为外部监督的一些方面。尽管这些报告没有普遍地开展，但可以作为EQA的补充，或者当EQA没有不可能时可以提供一些基本信息。除了提供关于主要耗材的信息，附件3中我们推荐一个简单的表格用来分析工作量和一些主要的质量指标（见附件3）。为使效率最大化，应由实验员来完成这些表格并寄出，这样国家结核病防治规划里也就有了实验室痰涂片镜检的信息。另外，完成这些报告的同时也就提供了内部监测、便于复检时的随机抽样，简化了督导员的工作。

通过从中央到基层寄送批量测试片进行的EQA

评估基层实验室工作最简单的办法，是对目标实验室定期进行批量测试，通过定期收集高质量的涂片并保存在七个玻片盒里来完成。盒子应放在低温干燥的地方，以免复红褪色。三个玻片盒放阴性片，一个玻片盒放等级为实际菌数的涂片，一个放等级为1+的涂片，一个放等级为2+的，一个放等级为3+的。每隔六个月，同时向所有目标实验室发放每套包含六张涂片（3张阴性，一张实际菌数，一张1+，一张2+，）的测试片，这些测试片装在封好的预先贴好邮票的、写明回寄地址的信封里，并要求基层实验室将带有玻片登记号的表(附件4)填好寄回。

这种方法没有评价染色的质量，有很大的缺陷。原始的阴性结果不必怀疑，阳性的涂片尽管小心翼翼也会发生褪色，所以有必要在参比实验室复查报告错误的涂片。为评估染色的能力，发放染色的以及专门的未染色已知结果的涂片是个有效的途径。

然而，这种方法要求参比室用匀化痰标本此类更精细的准备，完全确认制备的批量片。详见参考文献2。

批量测试的优点是从参比实验室和基层实验室有效地获得对目标地区读片技术能力进行快速评估的能力。如果与预期结果有很大差距，可能不是检验人员的能力问题，而是设备太差，比如显微镜的条件太差或光源不足。此方法通常对的是刚刚培训完的新员工，或者是又上了提高课程的员工，以评估最佳成绩。在富裕的发病率低的国家批量测试是EQA唯一最合理的方法，因为复检常规的痰涂片变得非常昂贵。

表III.1 痰涂片镜检的室内质量评估 (EQA)

方 法	优 点	缺 点	应 用
现场督导	<ul style="list-style-type: none"> ● 直接接触 ● 能观察实际工作 ● 激励工作人员 ● 能查明错误的原因 ● 能检验设备、耗材的质量 	<ul style="list-style-type: none"> ● 有选择性, 如果仅由参比室来做, 难以覆盖全国 ● 增加劳动量 ● 花费大 	<ul style="list-style-type: none"> ● 总是在督导时应用
盲法复检 (基层至中央)	<ul style="list-style-type: none"> ● 反映日常工作 ● 有激励作用 ● 基层实验室的工作负担轻 	<ul style="list-style-type: none"> ● 中央实验室工作负担重 ● 不精确是不可避免的 ● 需要非常仔细的技术已得到正确的结果 ● 必须有工作人员 	<ul style="list-style-type: none"> ● 监测标准方法
批量测试 (中央至基层)	<ul style="list-style-type: none"> ● 中央实验室工作负担轻 ● 全国范围的快速反馈 ● 可能间接地发现仪器方面的错误 	<ul style="list-style-type: none"> ● 能力测试, 不一定是常规表现 ● 好的批量测试片不易制备 	<ul style="list-style-type: none"> ● 培训之后 ● 培训需要的快速评价和设备的需要 ● 发现/证实复检中可疑的问题

此方法的主要缺点是, 实际上技术人员有无限的时间来看质控片 (除非测试是在督导时或是在培训班上进行), 而且他们知道正在被测试。当然此方法不能评价在日常工作条件下的读片质量; 只能衡量技术人员正确读片 (和染片) 的能力。尽管存在这些缺点, 当合理安排时, 结果证明能够在质量上有很大的提高。

整个结果可以制成三级表:

- 分析单张玻片
- 分析阳性片和阴性片两个亚类
- 分析整套玻片

通过分析单个玻片可以排除那些多数受测试人员报告的不一致结果的特定

的测试片，这些片子缺乏批量间的一致性。以表III.2为例，技术人员的表现很差，他们之中只有一半的人能正确确认六张玻片中所有的阳性片和阴性片。与预期结果有如此大的偏离并不是技术人员的能力造成的，而是设备的质量。并且很明显地说明实验室急需现场督导。

评价单个技术员需要一个详细的评分系统，每张片子被分配一个相同的分数，如果报告一个严重的错误，得零分，如果报告一个低级别的错误给一半的评分。获得的总分与最低分数线相比，这个最低分数线可以预先设定也可以从获得的结果中推算（参考文献2）。

染色或未染色的批量测试片可以用来评价培训前和培训后学员读片正确性和染色、读片的能力。

表III.2 举例分析用3张阴性片、3张不同级别的阳性片进行的批量测试结果。测试片从中央下发到42个实验室。以单个玻片和每套玻片分析。

Data courtesy of Dr Fatoumata Ba, Programme National de lutte contre la tuberculosis, Senegal.

以玻片分析				
基层实验室	参比实验室结果			
	阳性	阴性	合计	
阳性	115	15	130	
阴性	11	111	122	
合计	126	126	252	
阳性片不一致率 (11/126):	0.087			
阴性片不一致率 (15/126):	0.119			
总不一致率 ((11+15)/252):	0.103			
以每套的阳性片和阴性片分析				
正确读出每套三张阳性片的数目:	42个实验室中有32个			
正确读出每套三张阳性片的率:	0.762			
正确读出每套三张阴性片的数目:	42个实验室中有29个			
正确读出每套三张阴性片的率:	0.690			
以全套六张玻片分析				
正确读出每套三张阴性片的数目:	42个实验室中有21个			
正确读出每套三张阴性片的率:	0.500			

在现场督导痰片镜检的质量

参比实验室人员参与督导基层实验室重要的原因如下：只有现场督导才能对技术人员的工作条件有真实的印象。并可以检查实验室整体布局、设备情况、耗材供应是否充足。因为这是在实验室人员自己的地方，他们会更自由的提出关心的事和实验室操作方面遇到的问题。可是在大多数国家，国家参比室只能督导有限数量的基层实验室。常规督导基层实验室成为中级实验室的主要任务。

理想状况下，督导应安排观察整个工作日的工作情况。包括标本的收集登记、染色、检查、报告和登记。只有这样一天的督导才能深入地讨论观察到的所有与国家推荐的程序相背离的地方。然而，如果不能把一整天都放在一个实验室上，这样的督导对于了解仍然是有用的，询问一些问题、选一个标本或者对复检给与反馈，核实耗材是否充分，激励实验室人员使他们感觉到是国结核病控制规划的一部分技术员。显然这种短期的督导可以由而且最好由非实验人员进行，例如结核病规划督导员。他们必须知道抗酸菌镜检方面的一些督导的原则，例如登记和复检的抽片等。但是，解决观察到的问题必须有专业的实验人员督导。

在督导时应注意的细节总结为一下四个标题：

- 人员、基础设施、安全和设备
- 耗材和消耗品的储存
- 登记和报告结果
- 工作表现

包括这些领域的详细的清单在参考文献2中，一般督导员都可以用这些。

人员、基础设施、安全和设备

人员

萋-尼染色镜检的主要挑战在于人的因素：此项技术并不难掌握，困难的是坚持日复一日的做下去。因为这些原因，发现资历较差的人员的表现如实验室辅助人员比资历高的人员表现好并不是偶然，那些资历高的人员更有兴趣做那些技术复杂的实验。

对实验室人员的要求和管理根据所处位置不同而异。在许多低收入国家，国家结核病控制规划诊断工作大部分在农村进行。在这些机构中，结核病控制的工作是由多职责实验室人员来完成的，这些职责中仅有一项是负责结核病。

结核病相关的工作越来越多地在市区开展，这里的工作量很大但是人员需求往往被低估。在这些地区，人员的工作仅仅与结核病相关可能发生（尽管不是经常）。在这样的机构中，必须注意工作量并考虑在日常操作应用荧光显微

镜。

在督导期间，应估计每个技术人员平均的日工作量。随之尽一切可能纠正实验室人员负担过重的状况。如果日常工作每人每个工作日做30张玻片，就意味着某些天可能超过30张或者更多，虽然计算所花费的时间看起来很容易，但认为在如此大的工作量仍能完成工作并且结果可信的则是一个错觉。在工作量过大时，如果方法上与基础设施允许(通常只是区域实验室或大医院的检验科)，最好进行荧光显微镜检查，可以使工作量提高大约5倍。经过一段认真的练习期，获得的结果可能比配备5个技术人员，每人用一台普通显微镜(实际上也是不现实的办法)更可靠。

基础设施

督导要评估设施是否能够开展常规工作，如果是经常督导，那么除非在最近的督导时基础设施有了很大变化，否则没必要每次都要检查基础设施。督导主要是指考核设施和人员是否足以胜任工作。房间要足够大以便至少分成两个区域(一个用于登记和镜检，一个用于处理痰标本和涂片)，有安全处理废弃物的地方。要观察布局是否使所有人在工作时便于走动。在安全方面良好的通风是必不可少的。充足的光线也有利于工作人员的防护，除此之外当没有电力供应时也可能进行镜检。如同有电力供应一样，最好是供水充足和又有排水管道，尽管有时也有供应不上的时候。如果从附近的井中能取得洁净的水，并且没有电力时显微镜和光照条件也允许能镜检，那么没有流水和电力供应时，也能令人满意地完成痰检工作。

基层实验室的安全

可以通过查看现有的设备和处理标本的过程对安全进行评估。安全防护最重要的是看病人如何收集痰标本：必须在开放的环境里进行。通过诱导或支气管镜收集标本需要特殊的严谨的防护措施。

实验服在许多国家花费是很少的，并且在供应方面不应成为问题。虽然是推荐使用一次性的物品(竹签)，但也可使用接种环，必须在燃烧灭菌前在装有沙子/酒精的瓶里将环洗净。必须仔细检查传染性废弃物的处理方法，例如痰盒，竹签。此类废弃物不应简单地扔到一个坑里或倾倒在放杂物的角落里。尽管一个简单的焚烧桶并不能用很长时间，但可能它是最令人满意的装置。在很多情况下用浸泡或煮沸的方法灭菌是最简单的，但可能很快因其缺点而弃之不用。应用高压灭菌的可能性很小。必要的设备必须有最近使用过的证据才能确认其正常运转过。

不推荐用生物安全柜作涂片工作，因为如果实验室通风和安全措施良好，这个工作对技术员的危害不是很大，昂贵的生物安全柜需要专业人员来定期维

护，这基本不太可能。如果安全柜得不到这种维护会使得安全柜错误运行，更增加了技术人员感染的可能。当地生产的生物安全柜通常制造工艺差，所以通常是没用的或者更增加危险。如果具体情况严重，如实验室通风不好，那么一个连续外排的风扇可能是最好的解决办法。紫外线灯不会比良好的通风有效，不仅仅是因为不好的装置，更换，维修，它们提供的保护也不够，只能在工作结束后运行，或者在半遮盖的状态下运作等，所以技术员周边的空气通常不能直接消毒。

以痰标本作为工作对象时，不提倡用手套（除非配制染液）。它们起的作用很小，考虑到结核病的传播途径，实验员总是不更换手套，所以造成实验室的污染，花费在质量好的手套上的经费一般来说是禁止的。外科口罩不能保护实验工作人员，能过滤掉<5毫米微粒的呼吸装置是很昂贵的，而且在通风良好的镜检实验室里几乎没有什么价值。

设备

作为基本的设备，最少要有足够的桌子和椅子，以及用于染色的塑料盆、放传染性废弃物的有盖的桶（见表V.1）。督导员有责任帮助实验室得到这些物品。如果没有蒸馏水而染液的配制又在诊断中心进行，就至少要准备一个蜡烛状的滤水器。在实验室内或附近必须有用于传染性废弃物焚化和灭菌的设施。

良好的显微镜对可信的结果是绝对必要的。所选的显微镜必须坚固而且有高质量的光学部分。规划官员应尽一切可能保证获得这种显微镜，必须保证买什么样的显微镜的主要决定因素是质量而不只是基于钱。必须有空余的灯泡储存在每个镜检中心，其他的备存零件和库存的显微镜应放置在区域实验室或国家参比实验室的安全、最好有空调的储藏室。当一个中心显微镜发生问题，要求能够立即反应。结核用显微镜的最低要求包括：机械平台，8-10倍目镜和好的100倍物镜，选择平镜或者半平镜式的100倍物镜是个好主意，因为这不仅能方便工作而且能够保证高质量。应订购有电光源的显微镜，尽管电有时能够供应上，但很多地方也需要有聚光镜。推荐使用双目显微镜，在涂片很少的情况下，可以用单筒显微镜，有些时候甚至推荐使用，因为用聚光镜时，其亮度高。在一些大的中心，应该有个荧光显微镜，一个空闲的灯泡随时备用，并且检验人员因该懂得如何正确安装、维护。最后，因为质量好的显微镜很难替换，因此必须使显微镜处于良好的状态。这在很多国家意味着首先要小心防盗，放在一个坚固的带锁的柜橱中。在干旱的国家里显微镜不使用时应防尘遮盖或放在专用的盒子里。所有未接物镜、目镜的接口应封闭上（用一片透镜、塑料帽或一片胶带）。气候潮湿时，真菌会威胁到显微镜的光学系统。要预防

真菌就应每天以加强通风和加温的方法使镜头保持干燥，如果在夜间有电力供应，最好的方法是在保存显微镜的柜橱里的分隔处安装一只20—40瓦的灯泡于柜橱的底部，以及与分隔处上部相应的对角位置都应开一些洞以利空气流通。该处不应用防尘罩遮盖。如果根本没有电力供应，一个可行的方法是用硅胶或其它干燥剂。可是即使干燥剂能通过烤箱加热而重复利用，此方法也需要大量的干燥剂。少量干燥剂放在载物台上开放的空槽里，把显微镜和硅胶放于密封好的罩子或显微镜的匣子里，保持要求干燥的空间尽可能小。通常硅胶仅在一夜就吸潮浸透，必须每天有一定量的新的干燥剂换用。

如果染液配制在诊断中心进行，则应具备一些必需设备。应装备灵敏度为0.1g的托盘天平、量筒。为了防止染液被环境分枝杆菌污染应使用蒸馏水。过滤水是第二个选择，应加倍小心防止过滤器被分枝杆菌污染。不推荐使用去离子水，因为在安装及准备过程中会被环境中的分枝杆菌污染。

耗材和消耗品的储存

每次督导必须检查储藏室的状况。实验室物品的储藏室应比药品储藏的地方大一些，这是由于某些器材难于运输而且一般情况下保存期长。因此推荐正常情况下除了储备3个月的流量外，还应有6个月的储备量，即使更多的储备（例如痰瓶、化学试剂、甲醇和镜油）可能也不成问题，可是对于玻片则应限制储存量，因为玻片要求保持干燥。现用染液保存不应过多，任意水平的实验室染液保存不应超过12个月的消耗量。较大的诊断中心需要大量的染液，为他们提供全部的化学试剂以便供他们自己配制可能更实际些。可是，在实施此项规定之前，实验室人员应清楚地知道如何配好染液。这包括如何检验每一批新染色液和保存检验记录。这也依赖必要设备的可及性。

玻片盒从一地寄往另一地会造成丢失、非金刚石标记笔会磨损，这些都应看做是消耗以确保持续的供应。涂片盒应有非常合适的盖子，以防昆虫进入破坏痰片。

结果登记与报告

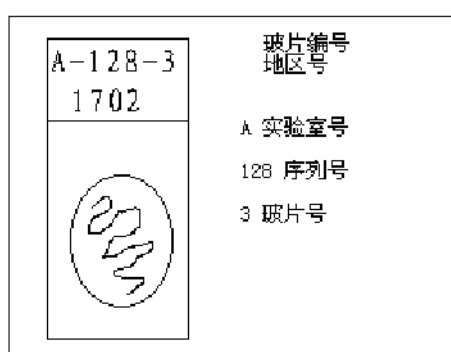
登记在任何实验室都是基本工作之一，许多实验室的错误是因错误的登记而引起的。只要仔细而系统化地工作，就会避免此类错误，这对任何实验室人员都是最基本的要求。

必须仔细检查痰检申请单确保正确的使用。痰标本一来应立即在痰盒上标记以明确病人的情况，标记必须在盒体上，而不是盒盖上（图II.1）。可使用防水的记号笔、中国画图笔或不干胶标签标记。标号来源于实验室登记本的序号，同时登记本应记录病人的全部信息，而且编号要清晰地记录在痰检申请单上。随后玻片必须明确标记是哪份痰，用铅笔在磨砂面标记（当磨砂面不可

用的时候，用不易擦掉的记号笔、金刚笔或其他替代品）。用其它笔标记可能不起作用，因为在染色期间标记会消失。玻片的标记包括登记本的横行（序列号）、竖行数字（玻片号）。诊断中心的代码只是在上一级挑选玻片复查的时候需要，可以在质控时玻片挑选后再添上（如图III.2所示）。要仔细注意避免将痰涂在错误的玻片上。检查完毕应及时将结果登记在实验室登记本上。在督导时需检查前一天检查的结果是否登记在登记本上。如果所有这些都连续的做，那么一定有混淆的危险，导致错误的治疗或者没有接受治疗，有时也可以解释复检时发生的所有错误。

申请单和登记本上应标明病人正确的地址，检查的类型（初诊或随访）。如果临床医生没有提供，试验人员应通过询问病人来获得。这项信息对于追踪没有去领阳性结果的病人很有必要。而对初诊、随访病人的区分有助于更深层次的分析操作，这在下文将有描述。

在较大的诊断中心，结果的报告有可能产生问题。为发现这一问题，有必要双向核对病人登记本和实验室登记本上每个病人的信息。所有实验室检查阳性的病例必须在病人登记本上登记。虽然实验室登记本上没有专门一栏，但如果在病例登记本上发现阳性可疑者，就有助于找出这方面的问题，因为结核病管理单位的病人序号已永久登记在实验室登记本上（例如在备注的这一栏）。相反，痰片的实验室编号应记录在结核病管理单位的登记本上。两者对比才能产生完整的印象。所有阳性病人应立即开始治疗。应确认没有登记治疗病人的比例。得到检验结果滞后会导致病人到别处就诊治疗。更坏的情况是，病人未受治疗而回到社会上，这必须立即查访。如果此类问题出现，必须查询为病人提供的资料是否完整。制定以下政策有助于减少这样的缺陷：要求所有涂片阳性的病人都应该自动登记治疗，如果治疗从未开始可视为丢失。



图III.2 玻片的正确标记，地区号在玻片上用斜体写，因为在室间质量评估的时候需要登记此数字。

实验室人员必须负责在第一份标本送来时向病人解释清楚检验的全过程，并鼓励病人将所有要求送的标本送到。解释的结果可通过计算登记的可疑患者只送一份痰标本的比例来进行评价。目前推荐病人至少有两份阳性标本才能认为是涂阳结核病人，这样做是为了防止误诊，因为在一个工作量很大的中心容易犯这样的错误。定期的进行评估将很少发生这种情况。当使用更复杂的技术如培养时由于实验室混淆、污染造成的假阳性结果更常见。

至少一份标本阳性的病例的几个标本结果的量化的偏移程度可以作为检查几个涂片时勤奋度的指标。如果三个（或者两个）结果经常是同样级别，那么可以假设只看了一个标本，其他结果是抄来的。一项在四个国家进行的研究中，以三个涂片至少有一张是阳性的可疑者为分母。其中三个国家结果存在一定差异的几率非常一致，大约60%，而在第四个国家，差异的几率仅仅为14%。

工作表现

检查工作表现开始于环顾四周。在一个凌乱、脏的或杂乱的实验室做出的工作不可能可信。可做一些简单的率的统计（尽管这最好由本地实验室人员在内部质控时来做）以便提供一个更进一步的方向。

复查实验室登记本

实验室登记本提供了大量的信息，应和实验员一起仔细广泛地复查登记本。可疑者中的阳性率随国家不同变化很大，同时也与诊断中心的种类有关（例如，初诊或转诊机构）。大多数情况下，阳性率大约为5%（在拉丁美洲一些国家）到20%（在非洲亚撒哈拉地区）之间，在有大量病人和/或医生的延误或者医疗服务可及性差（距离、经济）的地区有更高的比率。偶尔，可疑者中阳性病人比率较高还由于假阳性或不正常的活动，诸如有市场存在就有贩卖阳性结果。过低的比例在相反的情况下发生，如大量滥选可疑者，或有较高的慢性咳嗽发病率，或有大量假阴性结果。主动发现病人的策略同样导致低阳性率。只有实验室中存在严重的问题才会引起这个比例明显不同于同一地区同级别实验室的平均水平。

随访病人检查的阳性率（包括实际菌数的情况）偏离的原因很少令人怀疑。国际防痨与肺部疾病联盟（IUATLD）和世界卫生组织（WHO）推荐的痰检频率和测定时间，一定有一些阳性（低级别）结果，常常是死菌。在实验室服务有质量保证的国家，10%的随访检查是实际菌数或者阳性结果。尽管随访病人的阳性率可能有变化，尤其取决于病人诊断时的平均阳性级别（例如HIV感染者平均阳性级别可能要低些），但随访病人中完全缺失阳性结果是不可能的。特别低的阳性比例尤其是在2个月末的随访检查（估计应有约15%的痰

涂片阳性病人仍保持阳性)，应怀疑显微镜镜检技术差或染色不好，或者不正常的活动引起的。

同时检查低级别阳性结果（实际菌数或者1+）占有初诊病人阳性结果的比例，这会对问题有更好的了解。疑似患者阳性片级别遵照正态分布，没有HIV感染或者结核病人就诊不是非常晚的情况下大约三分之一结果是低级别阳性。3+的结果检出显然没有问题，但低阳性级别阳性检出需要不断努力和高质量的工作，包括好的染色方法和染液。在条件已经足够好的地方，过于少的低阳性级别结果提示工作不深入，如果在随访的检查中没有阳性结果则支持了这种假设。高比例的低阳性结果在一些地方是真实的，但是更多情况下提示存在染色的问题，如果在随访病例中缺少阳性结果，则更加证实。极少的情况下由于染色时环境分枝杆菌污染或者是对抗酸菌的鉴定不够熟练造成假阳性结果。

熟读登记本会对结果的可信性有一个印象。很少发生可疑患者的3个标本中仅有一个结果是阳性或者1~3条，如果这种现象经常发生，说明收集标本质量不好，玻片标记错误，染色技术不好，读片不熟练或者染液发生污染。

阳性病例多个结果的一致性也反映了实验室的工作质量。采用即时痰-晨痰-即时痰策略时，至少80%最终为阳性病例在第一次检查时都应该是阳性的，如果比例低说明没有读足够的视野或者染色、标本收集质量不好，所有的这些因素（细菌浓度低）影响即时痰要多于影响晨痰。

在登记本上找到一些可疑的地方之后，再深入地检查有时能找到问题的起因，例如深入地检查染液和染色的过程。否则下一步应是肉眼检查准备好的涂片。保存的用来复检的片子应该再查看一下，可以对平均的涂片和染色的质量有一个印象。已经染色的涂片可以同时用来评估痰膜的肉眼观结果和染色的质量，两者是相关的。检查的重点是玻片的标记和涂抹两方面。痰膜的大小仅在标准化时是重要的。尽管当实验员知道单位长度含有多少个视野时痰膜的大小允许有变化，但标准化更可取。标准的长度约为2cm，油镜下相当于100个视野。痰膜宽度保证不达到玻片的边缘。质量不好痰标本（唾液）的比例某种程度上可以用肉眼检查估计，此类痰片非常薄或者很难看到并且经常有小气泡。实验员刚开始操作时最易出问题的是，涂片太厚，或其中部分痰膜太厚。痰膜厚度应该是透过痰片能看清下面的报纸。一张看上去呈紫色或红色，甚至是黑色的痰片，通常表明痰膜太厚，很难彻底脱色。另一个原因是实验员不敢用酸脱色时间太长或进行二次脱色。应告诉他们仅用水溶酸几乎不可能将抗酸菌脱色。没有必要寻求浓颜色的复染液；相反，痰片应仅仅是淡蓝色的。尤其在厚涂片和光线较暗时，复染过强可能掩盖抗酸菌，甚至高级别阳性标本可能完全漏掉。

检查显微镜

显微镜下看片子可以评估 1) 显微镜的状态, 2) 技术员鉴定抗酸菌的能力, 3) 染液的质量。要对现有的片子进行检查。检查需要一张或更多的阳性片(包括分级为实际菌数的痰片), 最好是近一周的痰片, 以避免存放久的阳性片褪色的可能。如果结果为实际菌数的涂片比例非常高, 则需要进行检查最近的此类涂片。检查时必须用日常工作使用的显微镜。

镜台或夹子松动很容易看出来, 尤其是当浏览痰片时。如果显微镜保持聚焦状态很困难, 而玻片又能正确的固定上, 则问题可能是导轨松动或镜台太紧。必须检查镜头视野光线强弱, 尤其是在用反光镜时, 应建议实验员镜检时将反光镜摆正。如果视野是全黑的, 或光线充足并且所有设置都正确仍不能完全看清抗酸菌, 应检查镜头或反光镜是否有灰尘或被真菌污染。卸下 100×油镜头和目镜, 应在光线下通过镜筒观察所有镜头接口, 可能检查到镜筒内的透镜有真菌团块或其它尘埃。如果是非常干净的, 必须将物镜和目镜翻过来在阳光下检查, 如果没有明显的脏物, 再安装上物镜通过镜筒可以清楚地看到尘埃, 外部的灰尘能被清除掉, 必要时可以蘸二甲苯来擦。然后等到彻底干燥。如果因为没有遮掩的漏洞导致灰尘进入、质量不好的镜油、二甲苯对镜头的损害导致内表面脏, 清洁工作必须在显微镜维护车间里进行。如果有备用的配件可用, 应换上新镜头以保证显微镜的使用。如果镜头有划痕、成为裂片、损害, 那么只有更换镜头。

检查染色的阳性片

如果检查未发现错误, 则应注意检查阳性片。这不仅是确定是否为抗酸菌, 而且要检查菌体是否有明显的红色, 相对于背景是否易于辨认。具有所要求的形态和颜色的任何物体都应认为是抗酸菌, 即使是督导者可能认为这不是分枝杆菌。一个好的阳性片, 抗酸菌的红色应足够强, 不应被复染染料轻易地掩盖。如果不是这样, 可能石炭酸复红染色液作用弱, 或没有充分的加热、加热时间不够, 由此阴性结果就令人怀疑。酒精脱色时间太长也导致上述的现象, 但水溶性酸则不会有这样的效果。阳性片应检查是否有复红结晶, 如果有, 一种可能是染液没有过滤, 这种影响将持续到这一瓶染液全用完; 另一种可能是试剂瓶重新装染色剂时未洗净。

只有几条菌的涂片并不好确定, 如果这种情况总发生, 提示可能与假象混淆, 那么在上级督导的时候需要重新检查, 在那种情况下, 需要核查最近的几条菌数的涂片以克服重复性差的缺点和复红褪色的可能。

在督导参观时检查阴性片和分级为“实际菌数”的涂片是不可行的, 因此不推荐这种检查。即使复查阴性片对于准确描述工作表现是必须的, 但因为检查大量的阴性涂片所以需要

花费太多的时间。这应该通过对基层常规工作的系统性复检来完成。督导不仅要盲法复检结果给与反馈，还要发现错误的原因，这两个过程是互补的。

建立有代表性抽片方法

如果有盲法复检的质控系统，那么必须检查它的可信性和操作。对这样的系统，首要的是保存所有检查的用于诊断和随访的涂片，保存涂片的方法要易于寻找还要能够盲法复检结果。但实际做起来不像听起来那么容易，因为技术人员往往只想留“漂亮”的阳性片子。无论如何，这是选有代表性片子的关键和必要因素。

只有所有的涂片都保存才能保证代表性。但在工作量很大的实验室却不容易，这种情况下允许抽片只覆盖一个时间段，例如每个月只一周。当用旧报纸、纸巾等将玻片上的镜油吸走后，所有的片子都应该尽快保存在玻片盒里（黑暗，干燥的环境，尤其是荧光染色的片子重要）。这些涂片依据登记本的编号顺序保存，不管结果如何，这样方便盲法复检。玻片盒按顺序用直至全放满，然后第一个片盒的片子弃去，为确保不间断的连续收集片子腾出空间。盲法复检抽片后，所有剩余的涂片都可以丢弃。

保证EQA盲法复检的有效性

必须保证抽片的代表性，因为盲法复检的有效性取决于它。从实验室登记本开始抽取复检片子可以确保代表性。从实验室登记本上随机抽取10张片子足够，这10张片包括阴性片和阳性片，初诊片和随访片，然后让实验员在相应的玻片盒中抽出这10张片。如果所要抽取的10张涂片中实际取出的玻片少于9张，则抽片的完整性受到质疑。涂片上标记与实验室登记本比较确保准确。玻片本身不应该标记检查结果。所有这些方面缺陷提示盲法复检结果可能无效。

盲法复检（基层到中央）

通过在上级机构复查基层实验室的日常工作涂片的室间质量评估是一种评估和持续激励基层的方法。虽然这看上去很简单直接，但需要严格遵守技术原则，以提供有效的、可以解释的结果。如果国家结核病规划建立不好，也没有准备足够的资源来运转这个系统，那么，很难可靠有效地完成此工作。在一些有高度分散化的实验室网络的中等流行或低流行国家，可疑者中阳性率很低，工资水平较高，需要的资源通常很多，则必须用另外一种方法。从基层实验室向上一级实验室送痰片，需要运行良好的实验室网络以及各级实验室之间的合作。为了成功地运作，中级实验室扮演着重要角色，因为只有他们常规与基层实验室直接相关。

盲法复检EQA的目的

盲法复检EQA的主要目的是通过发现有不可接受错误的实验室而提高它

们的工作能力。这种方式与现场督导是互补的，现场督导虽不能系统地发现问题，但是能找出发生率高的错误的原因，并最终解决问题。基层实验员知道他们正在被检查，同时也对他们存在的问题感兴趣。所有这些都鼓励工作人员的积极性。

通常，通过复检来修正诊断和患者管理是不太可行的，这也不是复检的主要目的。整个复检工作周期需要太长的时间，对于个别病人作用不大，主要应用于维护工作质量。而且，样本只代表了所有检查的标本中的一小部分。对单个技术员的评估也不是可行的；排除其他因素，样本量小，短期的结果并不总是精确的，因此需要小心解释。

EQA盲法复检概述

从各镜检单位收集来的有代表性的常规检查的涂片在中级实验室来复检（第一复检）。抽片样本大小由规划和国家参比室预先决定，所以可以由任何督导员来进行。督导员保存有涂片原始结果的清单（附件5展示了推荐的复检抽片表格，也可以用来对常规工作反馈）确保第一复检者盲法。督导员对原始结果和复检结果进行比较，以发现不一致的片子（阳性/阴性或者严重的量化误差）。只有结果不一致的片子需要第三者复检，最好是更高一级的实验室，更全面的阅读（第二复检）。对于那些结果不一致的片子，最后这个结果认为是金标准（尽管可能存在错误），因为错误可以在基层实验室也可以在第一复检者上。尽管在第二复检之前进行复染也可行，但某些时候，要想在复检时发现所有可能的错误，则要求在第一复检者复检之前对所有抽出的涂片进行复染。必须对复检的有效性进行确认：第一复检者应较镜检单位犯假阴性错误少，而第二复检者应对明显的阳性涂片很少出现判断上的失误。应定期反馈复检的结果，但最终的分析应在整个周期（一年）完成后。任何一个镜检单位，相对于一定的样本量出现至少一次假阳性错误或出现的假阴性错误超过可接受的数量，即认为盲法复检不合格，他们可能在显微镜、染色液、涂片或染色技能方面存在问题，或镜检不够仔细、熟练度不够。然而，复检不合格也可能是由于偶然（抽片中出现错误，虽然出现错误没有超越抽片总数许可的水平）或管理上的差错（复制结果）。在专业实验室技术人员进行督导期间，应指出该实验室存在的问题和根源。如果是由于偶然因素导致复检结果出现了问题，则在后续的抽样中这些问题不应继续存在。复检者对涂片和染色等也应进行定性检查。然而，在没有错误时涂片、染色也经常发生问题，但只有发现错误并用于寻找错误原因时才会注意这些方面。否则，只需在常规的反馈报告中简单的评价这些方面。如果没有进行复染，对抗酸杆菌的染色深浅应多凭主观评估。

技术要求

技术要求和可能的缺陷在别处有详尽的说明（文献中）。不应低估复检技术的难度，不应看成是与示例一样简单。在许多国家的结核病防治规划中存在的主要问题是力求统计上的精确性，送来需要复检的涂片数量太多，这可能导致复检者的负担过重因此不能对涂片进行认真复核，有时，在盲法做得不充分的地方，可能会变成简单抄写结果。在大多数的情况下统计不可能和技术一样精确，因此通常应抽尽可能最小的样本含量。批量质量保证抽样系统（LQAS）常用于阴性涂片的抽样（后续详述），通过单一样本的抽样，阳性和实际菌数的涂片根据出现的频率就自动包括在样本中，不需考虑涂片的结果。这种随意的抽取阳性和实际菌数的涂片数目足够（非常小的单位可能不够）用来发现假阳性问题。假阳性问题少见，但通常呈系统性，因此在复检几张阳性涂片后，假阳性问题将会较明显。同时，若样本中阳性片比例与单位日常工作中阳性片的比例大体相等，这可直接为复检者和被复检单位比较样本中发现的假阴性结果，增加了复检的合理性。如有疑问，如单位出现较多的低假阳性，可以容易的专门抽取阳性和实际菌数的涂片以确认。如果单位每年只有少数的几例阳性涂片，应将所有的阳性涂片和实际菌数的涂片补充在随机样本中。

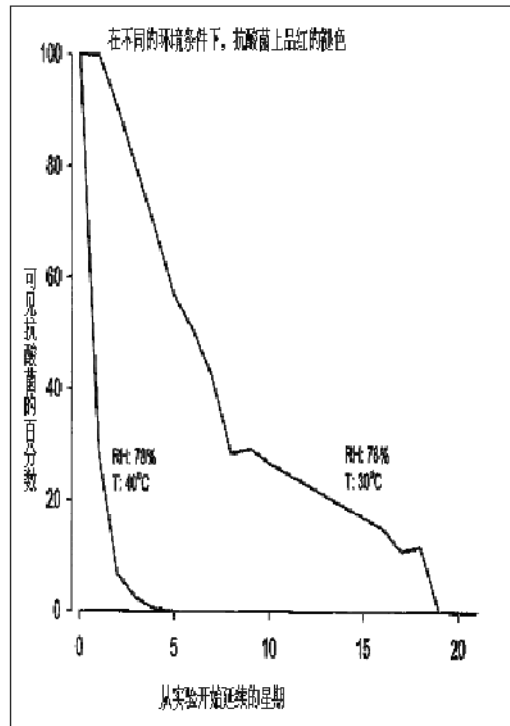
从技术上来讲，要想在复检中发现所有较为严重的错误，需要在第一复检者读片之前复染所有涂片，因为如果不进行复染，复检者也无法看到抗酸杆菌。在国家结核病规划不能够取得高质量的试剂和正确制备石碳酸-复红染液时，或者在采用不适宜的染色方法（如冷染）时，必须在复检前对涂片进行复染。因为在这些情况下，弱染的抗酸杆菌将很快完全褪色，这造成不能够识别大多数的假阴性结果，导致对这类错误总的低估。在湿热气候条件下对于染色质量较好的涂片也会出现同样的情况（图Ⅲ.3）。湿热可使涂片在一周内褪色。褪色也可以解释观察到的一些假阳性问题，通常建议在宣布假阳性结果之前进行复染以避免对这一可能是严重错误作出不适宜的评价。然而这仍不能保证确定的假阴性水平就是正确的。对结果不一致的涂片的复染就不能对第一复检者的工作进行评价，因他可能漏掉许多褪色的真阳性涂片。如果复染结果不同的涂片能使涂片再次出现阳性（因此证实了基层实验室的检查结果，第一复检者则出现许多假阴性错误），这时应将涂片复染，甚至包括对结果一致的涂片复染后，重新进行复检工作，这对从基层实验室产生的假阴性错误提供一个公平的机会。

方法的局限性

即使是第二复检者也会漏掉一些抗酸杆菌很少或分布很不均匀的涂片，但只要“低假阳性”率较低并且第一复检者和受检实验室的发生频率相近，作为

方法固有的局限性，这是可以接受的。另一方面，第一和第二复检者结果一致的涂片就不用进行再次检查，虽然在结果一致的涂片中仍会出现错误。这些情况均可接受，因为第一复检者只是作为在遵从指引的理想状态下的对照。由于这一原因，相对于第二复检者，第一复检者不应通过阅读比受检单位更多的视野去设法发现每一错误，相对于第一复检者，第二复检不得不证实尽可能多的阳性结果。没有可能的实际的方法去建立金标准，只要复检者的工作质量能够保证（不是不可以犯错误），现有的方法是足够的。这就需要定期的通过按照预先设定错误级别来评价复检者，并且要将出现严重错误的片子返回发生错误的试验人员。这个试验人员应该有机会同第二复检者及督导员交流知道遗漏的抗酸杆菌，以便于金标准的价值能够连续的发挥作用。

检出假阴性所需的样本量是用于确保受检单位不要超过可接受的数量或者高于要求的最低敏感度。然而，这并不是意味着发现过多假阴性错误的镜检单位没有达到最低要求，只是说明没有足够的统计学数据保证良好的工作质量。如果超出了可接受范围，对于错误的数量以及严重程度的解释是必要的，接下来还要现场督导那些最有可能真正存在问题的实验室。其他复检中不达标的单位应该等待进一步的抽样证实确实出现了不可接受的错误才进行督导。对于一个服务质量应该很好的地方，这意味着对于大部分的镜检单位来说，督导人员不需要马上去现场督导。



图III.3 在相对湿度和温度下，随着时间的延长复红会褪色。(孟加拉国达米恩基金会项目提供数据,RH:相对湿度; T:温度)

抽样相关事宜

WHO推荐的LQAS抽样方法作为最适宜的抽样方法，因为这种方法可以简单明了地回答复检相关的问题，如是否能够保证在最小的样本量的情况下具有可以接受的敏感性（或者说是假阴性），这样也可以使得整个复检在技术上可行。这仅适用于阴性，因为方法本身误差仅仅存在于这个类别中。正如在表III.3所示，任何从事镜检的工作人员都不可避免的偶尔漏掉一个低阳性，即使他很出色。这有可能在不同的人员之间造成一定的误差，即使它们都具有同等高水平的敏感性和特异性。因此需要一个统计系统来区分正常的偏倚与高假阴性借以提示某些问题的存在。

由于这种抽样方法很难理解，因此决定样本量时不应该将这项工作留给基层人员。相反，国家级应该收集相关的信息，决定合适的样本量，然后告诉抽片人员每月或者每个季度抽片的数量。每个镜检单位需要获得的信息包括每年的阴性和阳性的涂片数量。还需要计算实验室中涂片阳性检出率，因为这

些因素直接影响着假阴性的比例（假定敏感度是一定的）。尽管每个国家可以根据情况自己选择最低敏感度，但是与最低敏感度相应地允许出现假阴性的几率却直接与阳性率相关。这也就意味着基层镜检单位、区域性或者国家级实验室的镜检结果没有直接的可比性，除非他们的阳性率是相同的。举例说明，一个实验室报告可疑病人中有25%的阳性病人，在敏感度相同的情况下，出现假阴性的几率将是阳性率为5%的国家的6倍。LQAS抽样表没有提供假阴性的可接受程度，替代而之的是在一定的敏感度下的阳性率。推荐通过选择一个固定的样本量简化抽样工作，当然这个样本量能够满足各个条件（阳性率和阴性总数），只要这个国家和地区的变化不是特别的大。

表III.3 示例，不同实验员在涂片镜检之间的比较的结果显示在极少菌数的阳性片子存在很大差异。通过示例表明涂片镜检本身固有的局限性。

摘自：Toman K. Toman结核：.病例发现、治疗、监测。问题与答案日内瓦 瑞士 世界卫生组织 2004.

一位实验员的报告	其他三位实验员的报告					总计
	阴性	+/-	1+	2+	3+	
阴性	233	25	8	2	0	268
+/-	24	5	1	7	4	41
1+	8	2	11	18	4	43
2+	2	8	16	39	50	115
3+	0	4	4	49	120	177
总计	267	44	40	115	178	644

最好选择一个适中的最低目标敏感度，如75%或者80%。事实上，如果设目标敏感度为75%，那么必须明白，低于这个敏感度的镜检单位参加测试会出现不合格，同样稍高于这个敏感度（80%—85%）的一些单位也可能出现不合格。对于那些工作不够好的单位在第一年测试合格，但在第二年可能就不合格了，所以选择一个相对较低的敏感度会将注意力转移到迫切需要关注的单位。推荐的可接受的假阴性的数目是0。这并不意味着常规工作中一个假阴性都不允许出现，只是因为抽样的样本量很小所以发现假阴性错误的几率非常小。如果选择一个高一点的可接受的数量，如允许出现一个假阴性，那么需要的样本量可

能会增加1倍。偶尔检出这些很少发生假阴性的结果的可能性也会大幅增加，但是却不能更多地提高统计学上的精确度，复检在技术上的操作性也会受到影响。NTP往往爱选择很大的样本量，但带来的后果是给质量控制的人很重的工作负担，并产生没有价值的结果。对于患病率高的国家，每个镜检单位每年总的抽片量40–60张对于发现问题已经足够。

行动界限

表Ⅲ.4总结了读片时可能出现的错误。严重的错误包括“高假阳性”和“高假阴性”错误，这类错误从根本上改变了病人管理的策略，并表明实验室存在严重问题。复检的主要目的是发现“高假阴性”涂片的比例并确认没有“高假阳性”错误。如果有良好的显微镜且基本的知识技能都能达到要求，高假阳性错误非常少见。这种错误是不能接受的，出现这种错误时必须注意进行认真调查。如果孤立的出现这种错误通常认为是管理上的错误。如上所述，对于假阴性，按照抽样的最低敏感度，假阴性结果的涂片总数量不高于临界水平。出现较多错误的受检单位可能有不可接受的假阴性率，当出现高假阴性或较多数量的假阴性（高和低的）时可能性更大。在没有发生高水平的错误时，出现少数的“低假阳性”和“低假阴性”错误可以不算是十分严重的，因为即使实验室不存在严重问题，这些错误也会看到。“低假阳性”通常是由于这类结果的可重复性差：复检者没有看到少数的抗酸杆菌，而镜检单位偶然发现了这些少数的抗酸杆菌。“低假阴性”通常是由于方法的“过检”。

表Ⅲ.4质控中通过上级对下级实验室复检发现的错误分类的交叉表格

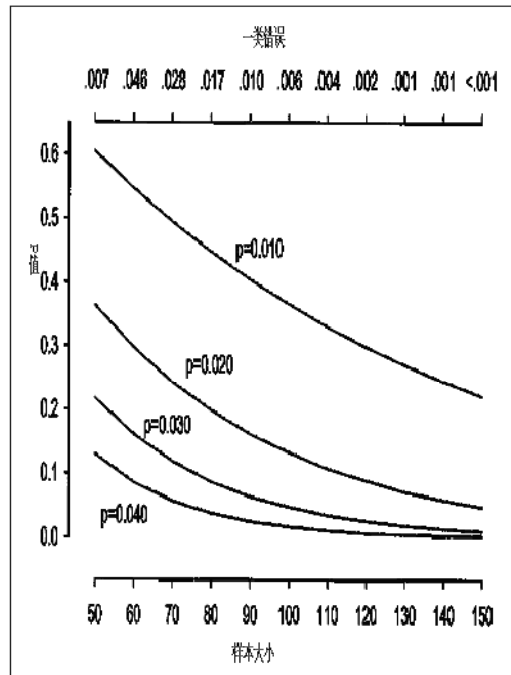
原始结果	复检者结果				
	阴性	1-9/100	1+	2+	3+
阴性	正确	LFN	HFN	HFN	HFN
1-9/100	LFP	正确	正确	QE	QE
1+	HFP	正确	正确	正确	QE
2+	HFP	QE	正确	正确	正确
3+	HFP	QE	QE	正确	正确

正确：没有任何错误，包括没有定量误差

QE：量化误差，非严重错误但可能提示严重问题

LFN：低假阴性，非严重错误，发生率应该较低

LFP: 低假阳性, 非严重错误, 发生率应该较低
 HFN: 高假阴性, 严重错误, 丢失一个明显的阳性片
 HFP: 高假阳性, 严重错误, 错将非结核病人划分为结核病人



图III.4 阴性片的抽样。样本量大小满足可信度为96%并没有发现错误, 说明真正错误发生的几率不超过5%。数据由 Beat Neuenschwander 提供。

“量化误差”显得并不重要, 因为它并不影响病人的治疗。但它有助于发现染色液和染色过程出现的问题。假如在复检前复染所有的涂片, 镜检单位质量差的染色液将使涂片的结果呈现系统地向低值端偏移。相反, 如不进行复染, 意味着镜检结果向高值端偏移并发现假阳性提示阳性涂片褪色。

发现的问题的举例

如果抽样复检发现令人不可思议的结果 (如大量的高假阳性和高假阴性结果) 一定是由于实验员根本就不认识抗酸杆菌的形状或者是由于显微镜的功能不行 (如严重损坏, 真菌污染或没有光源) 或者涂片根本就没有进行镜检。

单个高假阳性错误通常是由于笔误, 这是可以容忍的。如果出现一个以上这种错误, 显然是由于管理和登记过程的质量太差, 通常是不能容忍的。

非常少数量的低假阳性错误可以忽略, 因为这很可能与复检系统本身的局限性有关, 通常这种错误发生的频率与其它中心以及第一复检者的发生水平相

似。

定期发现高假阳性错误和几个低假阳性错误说明实验员不能清楚地识别抗酸杆菌，另一个可能的解释是所用溶液被环境中的抗酸杆菌污染，这些分枝杆菌并未固定在涂片上，在进行复检之前玻片上的分枝杆菌可能被冲洗掉。

高假阴性结果同时伴有许多低假阴性结果，通常是由于石碳酸-复红染液的质量较差或染色技能欠佳（除非进行复染，否则只有在阳性涂片中发现弱染色的抗酸杆菌才能提示这一问题）。其它的可能性包括读片不认真，甚至在工作忙碌时根本就没有对标本进行检查。偶尔，由于涂片被自来水污染，可发现较高频率的低假阴性和1+阳性看为阴性的假阴性涂片，这些涂片只有通过复染才能看到抗酸杆菌。

以低假阴性结果为主的低频率假阴性结果，通常是由于镜检不够仔细。这反过来也说明工作负荷过重。否则，这可能是由于显微镜不清晰或光线不足或涂片质量差。

复检结果的分析 and 报告

附件6显示的是可送达上级或国家级的复检报告的推荐格式。表中汇总了每个实验室复检的涂片的数量，发现不同类别错误的数量，可用于分析复检的覆盖范围，平均的操作水平和复检不合格的实验室的数目。同时应列出第一复检者的结果，便于比较他们的总假阴性错误与基层实验室的总假阴性错误，以便评价复检的质量。

如果采用统一的样本含量，并已知日常检查的涂片数量，就可以进行更为客观的分析，将假阴性数转变为受检单位相对于复检者的敏感性，这将更准确地发现可能存在不合格工作的实验室。

确保登记病人细菌学分类的质量

目前涂片镜检的室内质量评估方法只是针对实验室的工作质量，而非为关键问题提供答案，如登记的结核病人分类及开始抗结核化疗的准确性。

涉及实验室的病人分类的质量评价的方法基于结核病人登记本，这一程序较为复杂，在日常工作中不易实施。只有基于实验室常规登记复检完全实施，这一程序才能实施。那么可以利用这一程序做定期监测。

首先要求实验室正确标记所有的涂片（图Ⅲ.2）并根据系统要求进行保存。报告镜检结果时，必须小心报告实验室的识别码、实验室序列号和玻片号（如A-128-2）。对于每个新登记的病人，负责病人登记的人员要保证新登记的病人除了检查结果，也要将实验室的代码和实验室序列号录入到相应的列（结核病人登记本参见世界防痨联盟结核病指南）。显然没有痰检结果的病人是不能登记的，这包括开始诊断为肺外结核但排除伴随涂阳结核病人，此类

病人的登记和报告层次要优先于肺外结核进行。

从项目的角度看，这一系统在实际工作中并未证明可行性，因而此后不再讨论。

3. 提高质量

在室间质量评估及质量控制过程中仅简单发现实验室服务存在的错误和不足是不够的，应采取补救措施以求永久消除错误。这包括通过室间质量评估、质量控制和直接督导持续监测操作过程。实验室的功能也并不是独立的，从实验室活动所得到的信息和结果应有助于提高整个结核病控制规划的水平。

任何对基层实验室的督导目的在于加强实验室服务以及与当地规划管理者的联系和合作，这一点非常重要。这说明实验室技术专家应熟悉国家规划的政策，规划技术专家也应该对实验室的工作产生浓厚兴趣。

如果复检发现涂片镜检结果的一致性水平较预期的要低，如果技能差是主要原因，则应进行包括对实验室人员涂片镜检的技能进行复训的补救措施。其它情况下，应更换显微镜或染液。如果督导发现实验室登记存在严重的缺陷，补救措施应包括对实验室诊断服务管理人员进行复训。

如果发现大量只有一份涂片阴性标本的病例（与目前推荐的三份痰标本相悖），补救措施包括与负责接诊呼吸病人的医师进行讨论。

尽管以上的举例并不详尽，但说明实验室服务监测系统如何持续的帮助提高国家结核病控制规划的质量。

总之，包括室间质量评估的质量保证必须深化、持续地实施。首先可以选择一个从中央到基层实验室的方法来发现知识技能的不足或质量差的设备，随后要有标准的从基层到中央的实验室室间质量评估方法来发现操作的不足和其他问题。建议将病例占可疑者的比例相对于时间作图。最后，应开展定期监测以确保登记病人的细菌学分类的质量。

参考文献：

1. Allen J L. A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci* 1992; 49: 99-102.
2. Aziz M A, Ba F, Becx-Bleumink M, Bretzel G, Humes R, Iademarco M F, et al. External quality assessment for AFB smear microscopy. Ridderhof J, Humes R, Boulahbal F, ed. Washington, DC, USA: Association of Public Health Laboratories, 2002.

3. Buzingo T, Sanders M, Masabo J P, Nyandwi S, Van Deun A. Systematic restaining of sputum smears for quality control is useful in Burundi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 439-444.
4. Enarson D A, Rieder H L, Arnadottir T, Trébucq A. Management of tuberculosis. A guide for low income countries. 5th ed. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
5. Lwanga S K, Lemeshow S. Sample size determination in health studies. A practical manual. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1991; 1-80.
6. Toman K. Toman's tuberculosis. Case detection, treatment, and monitoring. Questions and answers. Frieden T R, ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.
7. Petersen K F. Methods for internal quality control in the mycobacteriology laboratory. *Zbl Bakt I Abt Orig* 1983; A 255: 503-510.
8. Urbanczik R. Present position of microscopy and of culture in diagnostic mycobacteriology. *Zbl Bakt Hyg A* 1985; 260: 81-87.

第四章

抗结核药物耐药监测

本章分为四个部分：

- A 监测系统目的以及培养的作用：培养的一般考虑因素和监测系统的目的。
- B 实验室特别方面的一般考虑因素：开展耐药监测具体实施的建议。
- C 耐药监测中特殊的技术程序：详尽的关于正确抽样的说明及如何实施的步骤。
- D 耐药监测中伦理学考虑。

A. 监测系统的目的和培养的作用

1. 监测的目的

耐药监测能提供：i 当前流行菌株的耐药谱资料。ii 客观评价规划实施质量。未进行任何治疗的病人中耐药流行情况可以量化一个耐药病人多大程度上由于感染耐药菌。接受治疗过的病人中耐药情况是规划实施中累积失误的反映。耐药监测的目的是以尽可能无偏倚的方法量化两个指标。

成功实施耐药监测主要依靠三个因素：获得准确的治疗史（分类错误最小化），尽可能从标本中分离出结核分枝杆菌复合群菌株（较低污染率和培养阴性率），高质量的药物敏感性试验（具有可接受的重复性和可信性）。

在进行耐药监测时，病人被分为以下两类：从未接受过治疗或者接受治疗小于1个月，接受治疗大于等于1个月。这在病人管理方面具有重要的现实意义，因为对两组病人推荐的治疗方法是不同的。所以，耐药监测必须提供在两类病人中耐药率的量化信息。

在耐药监测中，只有痰涂片阳性肺结核病人的分离株可以用来做药敏试验，如此限定有以下几个原因：第一，涂阳病人的耐药谱可以直接反映出在社会中传播的菌株的耐药谱情况，因为非涂阳肺结核病人的传染性要比涂阳病人低得多；第二，涂阳病人可以很快被基层实验室发现，在诊断之后可以立即获得另外的标本用于进一步试验，而可以确定这样的标本来自于已经证实的肺结核病人；第三，涂片阳性的痰标本中含有大量的结核菌，可以允许在标本运输

过程中结核菌有一定程度的损失，从而保证了培养的高阳性率。

对新发现的肺结核病人应该仔细地询问病史，以确定他们已往是否接受过抗结核治疗。如果对病史的询问不够重视，往往会造成病人分类的错误，在分析结果时就会发生严重偏差。事实上总有一些病人不承认既往治疗史，或者他们确实不知道以前曾治疗过，或者由于某种原因隐瞒既往治疗史。深入询问病史的目的就是使这种分类的错误尽可能减少到最低限度。

如果规划执行的好，有既往治疗史的病人的耐药很大程度上在治疗前已经存在，较小程度上反映治疗不充分（真正的获得性耐药）。而过去无治疗史病人的耐药性（原发性耐药）反映了耐药结核菌在社会上由耐药病人继发传染给另一个病人的情况。计算接受过治疗和未接受过治疗两者有代表性的样本（总耐药率）时也要考虑到两类病人的比例，这个数字也可以提示整个调查区域病人耐药状况。两类病人中的耐药率可以用来评价结核病控制规划质量。

耐药监测应该是国家结核病控制规划中一项持续性的工作。以流行病学为目的，每隔五年进行一次重复调查以便获得耐药性的准确趋势。重复进行耐药调查和持续性监测相比，可以节省一些经费，但是这样就间断了常规工作，其节省的开支被所产生的问题所抵消。由于人员周转，需要进行重新培训，这将成为选择定期进行调查的阻碍，同时调查工作组织的复杂性应予以充分考虑。所以，如果条件可能，持续性监测和定期调查相比，更倾向于前者。在资源允许的地区，在两次定期的耐药调查期间保留一些重要的调查点对于减小费用和避免间断性很有帮助。每次调查后增加一些点对于实验室的能力加强是一种很好的方法。

所有一切主要是为了监测耐药的趋势而不是得到某一时间的耐药水平。

多耐药（Poly resistance）在这里定义为对任意二种或二种以上抗结核药物耐药。单耐药定义为只对一种药物耐药。对异烟肼和利福平同时耐药尤为重要，此种耐药的高度流行表明含利福平的强有力的化疗方案无效。多耐药中的对异烟肼和利福平都耐药的菌株被一致定义为“耐多药”（multidrug resistance）。

2. 耐药监测中的培养

对于发现肺结核病人来说，分离培养结核分枝杆菌比痰涂片显微镜检查更敏感：1毫升标本中有1000个细菌时用涂片镜检方法只有50%的机率检出抗酸菌，而高质量的培养技术只需每毫升标本中有10~100个抗酸菌。

如果为了结核病诊断，相对于涂片镜检增加的敏感性在决定培养在病人管

理方面的作用非常重要：如果培养结果不能明确区别患者是否需要治疗，那么不能认为是有效的方法。相反，如果只是为了耐药监测，仅处理从阳性病人获得的含大量菌的标本，因此对检测敏感性的要求就不那么严格。

下文中将重点放在以耐药监测为目的培养和药敏试验发挥的作用。此处不再讨论培养在提高诊断敏感性的作用，这将在其他地方阐述相关问题的复杂性。不加区分的提倡开展培养来增加病人的发现率是会有问题的，此类的计划如果没有相应的基础设施和技术人员，大多数会以失败告终。这也就不能建立并保持有足够的覆盖面和高质量的检测服务。即使是达到了基本要求，培养的作用也不会达到与工业化国家的相似结果，因为在高低收入的国家结核病病人的管理存在差异。在低收入国家里结核病人常常不会早期就诊，因此在涂片阴性的病例中即使使用了正确的技术方法，也只能发现少数培养阳性的病人。培养的诊断滞后导致不可能对病人进行追踪，即使应用快速培养方法（涂片阴性的标本约2~3周报告结果）也太慢。而且，在这些国家里，医生的鉴别诊断中结核病较多，在免费诊断和治疗结核病的国家里更是如此。通过临床表现或者是胸片（如果可能并能负担）进行结核病诊断（正确或不正确）不会有太多的延误。在此类情况下，只有当实验室对报告结果的准确性有足够的信心条件下，培养的作用是事后证明诊断正确与否。结核病规划可以采取某种限制措施来寻求改变这种状况，比如一些国家要求提供细菌学作为诊断依据。从病人个体的角度出发这么做是不合理的（违反伦理），而且很可能也不是从结核病控制规划出发的。

B. 实验室特殊方面的考虑

在开展耐药监测时，要考虑以下四点实验室特殊方面要求：

- 标本收集
- 标本运送
- 标本处理和培养
- 分枝杆菌的鉴定和药物敏感性试验

1. 标本收集

结核病是常在肺部发病的传染病。下呼吸道中痰标本检出结核分枝杆菌的几率最高。为了留取高质量的标本，要告知病人如何从肺深部咯出痰。标本一经留取，立刻进行处理，因为即使是冷藏保存，时间太长结核杆菌也会死亡。

2. 标本运送

要尽一切努力将新近留取的痰标本尽快送至实验室。这常常不易实施，常会出现标本收集和处理之间的延误。这种延误会导致污染菌大量繁殖并且多于结核杆菌。

降低污染率的一种方法是使用去污染剂或者保鲜剂。广泛使用的是氯化十六烷基吡啶或溴化十六烷基吡啶，一种季胺化合物。到达实验室后，培养前需要进行离心以从标本中去除十六烷基吡啶。

3. 标本处理和培养

痰标本中含有其它微生物，比结核杆菌生长速度快数倍。标本处理是杀灭污染杂菌，尽可能的保留结核杆菌的活性。

前处理的试剂和方法有很多。根据目的选择前处理试剂（要处理的污染菌，接触时间等）。最广泛应用的是氢氧化钠处理方法，由Petroff发明并以其名命名。

培养基可以是鸡蛋培养基，琼脂培养基或者液体培养基。每一种培养基各有优缺点。经济条件好的国家通常使用至少两种方法，因为这些国家主要是为了提高培养对于诊断的敏感性。在随后的讨论中仅涉及鸡蛋培养基，尽管在进行诊断时它的敏感性不是很高，但在耐药监测时，这个缺点可以忽略，特别是针对涂阳标本进行培养。

为了避免持续接触前处理试剂而导致结核杆菌死亡，通过加入水并离心，或者进行中和而除去碱。可以通过接种缓冲培养基上进行中和，也可以使用酸进行中和再接种到非缓冲培养基上。这里列出酸性培养基（比如改良小川培养基）和中性培养基（罗氏培养基或者IUAT培养基）的不同。

4. 分枝杆菌的鉴定和药物敏感性试验

痰标本中可能分离出环境分枝杆菌。因为这些分枝杆菌的耐药谱不同于结核分枝杆菌，因此没有流行病学意义。在培养基上生长的培养物必须经鉴定为结核分枝杆菌复合群。对主要药物异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇的耐药谱是针对结核分枝杆菌复合群而定。应用罗氏培养基做吡嗪酰胺的敏感性试验结果不可靠，因此耐药监测中省略了这种药。

C. 耐药监测中特殊的技术程序

以下所述，将介绍技术方面的信息以帮助国家结核病控制规划参与到WHO/IUATLD全球耐药监测项目中。

1. 有代表性的抽样

耐药监测的结果必须反映进行监测的国家或地区的耐药情况。以此为原则来确定一个有代表性样本的避免偏倚的抽样方案很重要。最常用的三种有代表性的抽样方法是：整群抽样、系统抽样和随机抽样。从可行性考虑，本手册先介绍整群抽样和系统抽样。

调查样本的大小取决于所要求的精确度。一般350至1000个病人对调查从未接受过治疗的新病人来说是足够了。随着结核病控制规划实施的改善，复治的病人会逐步减少。可是复治病人所需的样本量也较小，因为估计耐药率很高。而且，这部分病人是持续监测耐药趋势（时间长于调查的时限）的焦点。

考虑到污染或培养阴性造成的痰培养失败以及部分病人拒绝参与调查，应将样本量进行调整。预期培养失败率受运送延误时间和实验室痰培养熟练度影响，样本量必须相应放大。

整群抽样

整群抽样过去曾广泛应用于免疫扩展项目中疫苗接种覆盖率的评价，整群抽样的许多方法也在这方面得到很大发展。整群抽样对难以覆盖整个国家、无确切的人口普查数据、结核病人数量多的国家尤其有用。这种方法将一“群”病人，而不是一个病人，作为一个抽样单位。每一抽样单位应包括数量大致相同的连续的在该地诊断痰涂片阳性的肺结核病人。为满足统计学要求，至少要抽取30个点。整群抽样需要一个包括所有登记结核病人的医疗单位的名单作为抽样框，此名单还应记录这些单位每年涂片阳性的结核病人数。应从这个名单中确定抽样点，使抽样点的选择机率能与涂阳病人成比例。如果某个单位病人特别多，几个抽样点可能属于同一单位。整群抽样的详细过程由WHO/IUATLD的结核病耐药监测指南提供，在耐药调查实施前应参考。

系统抽样

每一个新诊断的痰涂片阳性病人，都是可留痰用于评价耐药流行情况的合格人选。如果一个国家每年有6000个以上的新发涂阳病人，一般从这样的病人中选取5~15%收集痰标本比较合适。

较好的方法是，中央根据每个基层结防机构的年报表编制一个总表，估算一个稳定的年病人发现趋势表（不考虑季节性变化），所有结防机构报告病例总数除以12，按需要把许多结防机构归在一起以得到一个接近的数字。这样将结防机构分组，每个组在年内特定月份按要求留取新发病人的痰标本进行培养和药物敏感性测试。由于有病例的丢失或拒绝参加，实际收取的标本会有所减少。所以要求结防机构适当延长接收标本的时间，以抵消病例丢失，得到满足药敏试验结果需要的标本数量。

由于复治的病人（治疗失败、复发、中断后返回的涂阳病人）数通常较新病人数少，所以对这些病人的选例时间需要长一些，而且可能需要100%选例，例如选全年的病人。推荐在调查后持续监测复治病人耐药情况，而且要尽可能多的监测病人以及尽可能多的调查点，这会提供更有效的监测。

尽管复治病人是一个复杂的组合，包括治疗失败、复发、再次感染，治疗中断任意时间后返回且涂阳，在治疗期间可能已经出现耐药，或者开始治疗前就耐药，他们在耐药趋势分析中很有用。耐药水平越高，越能够早期、清晰地反映变化，尤其是因不充分治疗而产生的耐药率升高的情况。但很难获得反映流行病例实际数字的相对频率，特别在那些大量病人在结核病控制规划管理之外的地区，此类病人中的患病率可能不是很精确。

随机抽样

从理论上讲，随机抽样是一种很好的取样方法。但在实际操作过程中，往往有难以克服的困难。所以对此方法仅做简要介绍。

最可行的方法是将每个结核病管理单位一年中报告的结核病例列出明细表，然后用OpenEpi (<http://www.openepi.com>) 软件在其中随机抽取20%或更多（取决于最终的样本量）的样本。这些样本的编号（上一年中从1到发现病例的数目）随后被发回结核病管理单位，如果这些编号的病例是新登记的涂阳病人，那么要求这些病例送一份或最好两份样本进行药敏实验。因为新登记的病人中大概只有一半是涂阳病人，所以最初的20%的抽样会被减半。另外，需要强调的是在这种情况下所有登记的复治病例都应留痰进行培养和药敏实验。

2. 标本采集

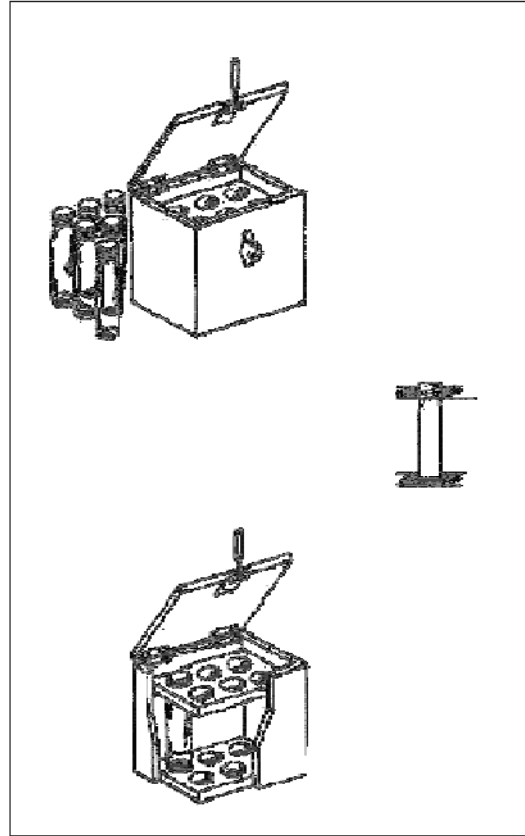
要获得有代表性的结核分枝杆菌菌株的样本，由于污染或者培养阴性造成的培养失败率必须低于预先设定的水平。所以，应该花大力气防止培养的失败。

耐药监测时，通常在病人被诊断为涂阳肺结核后决定留取痰标本。随时间延长结核分枝杆菌的抗酸特性会保持，但其活性却会很快丧失。因此培养标本处理方式与仅用于抗酸染色的标本是不同的（如用漂白液处理过的标本就完全不能用于培养）。结核杆菌的活性在高温环境中并随着时间的推移会很快降低。因此耐药监测只能采集涂阳病人的标本。这样即使经过了一段运输时间，也仍可能从标本中分离培养出结核杆菌来。一旦涂阳病人被诊断出来，就应该尽快留取一份晨痰标本。每个病人应该连续留两份标本。除非在标本中加入了十六烷基吡啶作为防腐剂，收集的标本应在尽可能的低温保藏。并且从收集到进行培养处理这期间的间隔不应超过3天。

3. 标本的运输

要求当地收集的标本在当地处理，因为新鲜的标本处理效果较好。但是菌种鉴定和药敏实验只能在国家参比实验室进行，除非一个实验室将药敏作为常规工作并具有必需的安全防护设施。耐药监测开始前在中央实验室和痰标本收集点实行试运行对于积累经验很重要。

如果痰标本要运送到参比实验室进行培养，那么简单的塑料痰盒就不合适了。此时要求使用统一的容器：有防泄漏的盖子（1.5圈的螺纹），由防碎的玻璃或塑料制成，即使在运输过程中承受一定的压力也不会碎裂。用于盛装标准痰盒的防泄漏的、干燥的特殊设计的盒子最好用合板制作，重量轻点较好。当将多个标准痰盒放入同一个盒子时，要保证所有痰盒都是同一规格且可以承受上层痰盒的压力。图IV.1所示是合适的玻璃痰盒和运输盒的示例图，另一种方法可以用合适的泡沫盒，这样可以进一步减轻重量和运输费用，但在运输途中可能更容易碎裂。



图IV.1用于运输培养和药敏试验痰标本的玻璃痰盒和运输盒的示例（标准痰盒，28ml）。

运输时需确定是否要加运输液，判断的标准是运输所需的时间（图IV.2）。如果90%或以上的标本可以在3天内到达参比实验室，那么就没必要加运输液。如果超过10%的标本需3天以上的时间，那么最好的方法是使用1%氯化十六烷基吡啶水溶液或0.6%溴化十六烷基吡啶水溶液（用2%的氯化钠水溶液而非纯水溶解）。随标本必须附有相应的文件说明是否含有这些溶液（因为必须经过离心处理），如果中央实验室不能有效的离心，那么就不能使用这些溶液。

4. 去污染和同质化

很多方法可以用来去污染，但没有一个是完美的。没有一种方法可以仅仅杀死污染的杂菌，并使标本完全液化。只能是尽量多的杀死杂菌，同时对分枝杆菌造成尽量少的伤害。此外，所有需要的试剂都应该是廉价而易得的。

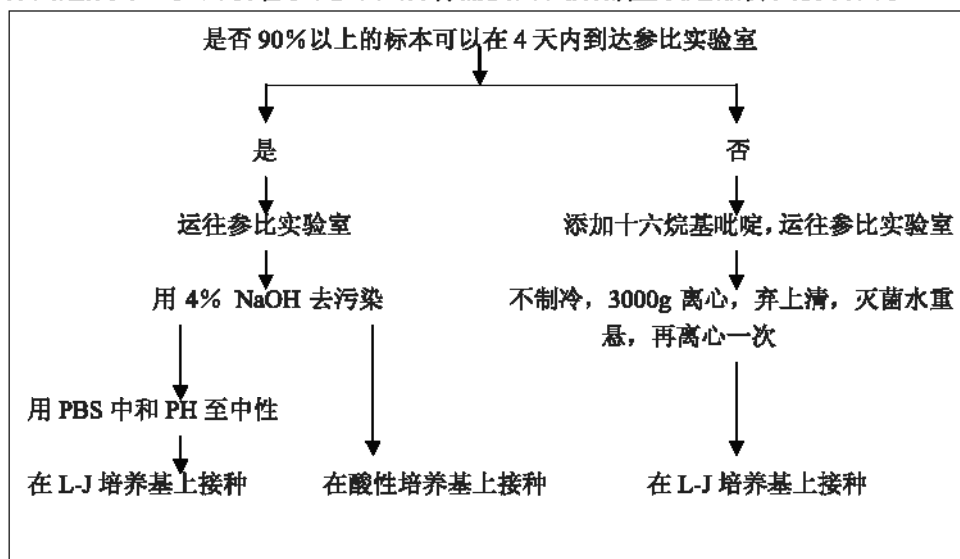


图 IV.2 怎样决定运输方式，去污染和离心的方法，以及培养基的选择

如果在基层实验室没有加入十六烷基吡啶，那么去污染的步骤在标本运抵参比实验室后进行。

培养过程中出现污染可能来自去污染不充分（处理的时间和/或浓度），处理的标本保存不当或保存时间过长而变质，或操作时疏忽大意使本已去污染了的标本或培养基重新被污染。如果没有结核分枝杆菌长出，可能是由于去污染的步骤过于剧烈，没有及时接种，离心不充分（时间和离心力不够），或对加入了氯化/溴化十六烷基吡啶的标本处理不当。

加入氯化/溴化十六烷基吡啶的标本的处理方法

氯化/溴化十六烷基吡啶是一种季胺化合物，用于在运输途中标本的消化和去污染。当经过这样处理的标本到达参比实验室时，需要离心以去除氯化/溴化十六烷基吡啶，并浓缩沉淀结核分枝杆菌。离心前先加满水，离心后去上清，再加入水离心一次（图 IV.2）。沉淀直接用于接种。加入了十六烷基吡啶的标本不能存放于冰箱或低温环境，因为氯化/溴化十六烷基吡啶会在低温时重新结晶，失去了保护标本的作用，并会抑制结核分枝杆菌在培养基上的生长。因此在离心时需要将离心机的制冷系统关闭，以避免十六烷基吡啶重新结晶的沉淀。

如果使用此法时污染率较高，可能是运输时间太长或方法不当，此时可以用4%氢氧化钠短时间的去污染（5~10分钟）代替纯水洗后离心。

4% NaOH方法用于未处理标本

用Petroff法去除污染的方法在世界范围内被广泛应用。此法主要应用于不能直接接种的标本，用终浓度2%（用等体积的4%的NaOH和标本）的NaOH处理15-30分钟。应用时有几点需要注意。

4%的浓度是NaOH的浓度上限（Petroff本人建议使用3%的浓度）。判断的标准是培养时污染的情况，如果使用2%的NaOH时，培养污染率低于5%，那么这个浓度就是合适的。也就是说使用的NaOH的浓度取决于污染率。计算污染率时的方法是用污染的管数除以接种的管数，注意使用的是管数而不是标本数。

在标准痰盒中装有3ml痰，相应的加入3ml4%的NaOH。NaOH的终浓度就变为2%。需要特别注意装NaOH的容器和吸取液体的滴管永远不能与痰盒接触，以避免交叉污染。

用NaOH的方法去除污染会对分枝杆菌的活性造成损伤。增加NaOH作用的时间，会杀死标本中更多的分枝杆菌。因此，如果需要可以增加NaOH的作用浓度（最高4%）但不要延长作用时间。

如果使用L-J培养基接种，那么Petroff技术需要一个中和或离心后用水重复洗涤。中和过程使处理后的标本由碱性变为中性。可用的方法有几个。很多实验室使用加有酸碱指示剂（如酚红）的酸，但这个方法如果操作不当可能使标本偏酸性，尤其是在处理离心沉淀的标本时。另一种方法是加入足够量的缓冲液（如pH6.8的PBS）。第三种方法是在NaOH处理15~30分钟后，加入水然后离心。这样可能会残留一些碱在标本里，但对后续操作应该影响不大。

除此之外，还可以使用酸性缓冲培养基。这种培养基不需将标本进行离心，经碱处理过的标本可以直接接种在培养基上，而且涂阳的标本其用于耐药监测的培养效果是很好的（图IV.2）。这种方法操作简便，可以防止一定的外源性污染，并因减少了操作时间和去污染步骤而提高了培养成功率。

5. 培养基的制备和接种

常用以分离培养为目的的培养基有含鸡蛋培养基、琼脂培养基和液体培养基。

用于诊断的目的时，快速得到结果是关键。因此较新的方法采用液体培养基和早期生长检测（early growth detection）的方法。这种方法检测的是分

枝杆菌生长过程中二氧化碳的产生、氧气的消耗、ATP的合成或者噬菌体裂解。

对于耐药监测而言，速度并不是重要的。推荐使用传统分离培养基。好处是可以减少污染率和成本。三种培养基中最常用于耐药监测的是含鸡蛋培养基。

不同的结核分枝杆菌偏爱不同的培养基。例如IUATLD推荐的不含马铃薯粉的罗氏（Lowenstein-Jensen）鸡蛋培养基（命名为IUTM培养基，见表IV.2），在病源体多为牛分枝杆菌、某些非洲分枝杆菌的情况下，可以用4.5g丙酮酸钠代替7.5ml丙三醇，其它地方没有修改。

如果培养的目的是用于耐药监测而不是用于诊断，推荐使用上述的简单方法进行分离（表IV.2）。用于药敏实验，应该使用IUTM培养基。

使用酸性培养基的简单方法

所谓简单法就是不需离心直接接种到培养基上的方法。在耐药监测中，分析涂阳病人的标本时，推荐使用这种方法。

有很多种都算是简单的培养方法，比较有名的如Marks, Ogawa, 和Kudoh（见参考文献）。在很多实验室内这些方法都被使用着，但由Kudoh推荐的Ogawa培养基应用最为广泛（表IV.2）。根本来说，简单法都是用含缓冲剂的培养基中和碱性的去污剂。因此可以称为酸性缓冲培养基。

在标本中加入碱性去污剂后（共约6ml，含2%~3%的NaOH），在涡旋振荡器上振荡混匀20秒，然后作用15分钟。

处理完的标本可以直接接种在酸性缓冲培养基上。接种量一般是两滴（大约0.1ml）已经去污染（但未中和）的标本，使用一次性巴斯的滴管。如果不能提供这种器材，可以用两大接种环的量代替。

每个标本至少接种2管。培养基中多余的水必须先倒掉。

对于用于耐药监测的菌株的初始分离培养，推荐使用上述的方法。接种后的培养基可以在培养箱中培养了。

表IV. 1. IUATL推荐的罗氏培养基的制备 (IUTM)

修改自 Jensen K A 的方法。达到实验室方法的标准化。国际防痨联盟实验室方法分会第二次报告。Bull Int Union Tuberc 1955, 25 (No 1-2); 89-104.

a) 盐溶液

L-天门冬素	3.6 克
无水磷酸氢二钾	2.4 克
枸橼酸镁	0.6 克
硫酸镁(7H ₂ O)	0.24 克
甘油.....	12ml
蒸馏水.....	600ml

按顺序用蒸馏水溶解上述成分并加热。121℃灭菌 30 分钟，冷却到室温。此溶液可以在冰箱内长期保存。

b) 孔雀绿溶液的制备:

孔雀绿: 购买孔雀绿结晶必须十分谨慎地选择, 许多批次产品对分枝杆菌有杀菌作用而并不合适, 应保证购买那些经过抗分枝杆菌活性测试的产品。

孔雀绿.....	2.0g
蒸馏水.....	100ml

无菌操作, 用蒸馏水溶解染料, 在培养箱内孵育 1~2 小时。此溶液不能长期保存, 如果有结晶析出, 或溶液颜色变浅, 则应废弃不用。

c) 准备鸡蛋

选取的鸡蛋要是新鲜的 (不超过 7 天), 由没有饲喂过抗生素的母鸡下的蛋。用温水和无色碱性肥皂彻底擦干净。然后在肥皂水中浸泡 30 分钟, 用流水冲干净, 在 70% 的酒精中浸泡 15 分钟。捞起鸡蛋前, 将手洗净。打鸡蛋使用的刀具、瓶子、打蛋器或搅拌机等都必须是灭过菌的。

制备培养基

将下列成分在一个灭菌的大容器中充分混匀。

盐溶液.....	600ml
孔雀绿溶液.....	20ml
打匀的鸡蛋 (20~25 个)	1000ml

85℃ 45 分钟凝固 (湿度 80%)。

表IV. 2. 酸性缓冲培养基的制备 (改良小川培养基)

Kudoh S, Kudoh T. 一种简单结核杆菌培养技术。Bull World Health Organ 1974, 51: 71-82.

成分	含量
无水磷酸二氢钾	2g
枸橼酸镁	0.1g
谷氨酸钠	0.5g
蒸馏水	100ml
甘油	4ml
打匀的鸡蛋	200ml
2%的孔雀绿	4ml

制备方法如下

推荐的培养基及其制备

改良小川培养基 (Kudoh)

盐溶液

无水磷酸二氢钾.....2.0g
 枸橼酸镁.....0.1g
 谷氨酸钠.....0.5g

用 100ml 蒸馏水溶解上述成分，加热帮助溶解。

甘油.....4.0ml

在上述盐溶液中加入 4ml 甘油。

鸡蛋

鸡蛋应是新鲜 (不超过 2 天) 且不含抗生素的。用 70% 酒精将鸡蛋彻底洗净。用灭菌过的打蛋器将蛋黄和蛋白打匀，用灭菌纱布过滤。每 100ml 盐溶液加入 200ml 过滤鸡蛋液。

孔雀绿溶液

许多商业产品对分枝杆菌有杀菌作用所以并不合适。应保证购买经过抗菌活性测试的产品。

孔雀绿溶液 (2%)4.0ml

将孔雀绿溶液加入含甘油和鸡蛋的盐溶液。

分装

混合均匀后分装。85℃ 灭菌凝固 45 分钟 (80% 湿度)。

离心浓缩结核杆菌

离心可以增加培养的敏感性。但与用于诊断目的相比，在耐药监测中对于涂阳肺结核病人这一点不是那么重要，因为前者会引起更多其他问题（本章节不详述）。去除有毒物质如氯化/溴化十六烷基吡啶（用于运输和去污染）也需要用离心。重复离心去除去污剂，有助于进一步降低污染。

运用离心方法时，需要重复在管内加满水，然后离心，直到去污剂被完全去除或中和为止。中和可以在离心之前或之后，但限于去污剂作用的严格时间限制，最好在离心前中和。此法的好处是结核分枝杆菌在沉淀里被富集。缺点是增加了去污剂作用的时间，增加了步骤（离心），更高的设备费用（高离心力的离心机，封闭装置防气溶胶扩散到环境中）。

分枝杆菌含有复杂的脂质，占细胞壁重的60%。脂质使分枝杆菌在离心时不易下沉，所以需要更有力的工具，至少可以产生3000g的离心力。此种离心费用昂贵，并需要额外的制冷设备以防温度过高杀死结核杆菌。使用离心机的实验室应该经常检查离心机的转速是否能达到3000g。必须制定定期维护的计划和突发事故应对方法，如离心时离心管碎裂时的处理办法。离心力(RCF)是由每分钟转速(RPM)、转子的半径和一个常量决定的。计算公式如下：

$$(RCF)离心力 = 1.118 \times 10^{-5} \times \text{最大半径 (cm)} \times \text{RPM}^2$$

一般约定计算是使用转子的最大半径，即当转子旋转时，从转子的中轴量到离心管的底部。因此可以算出达到3000g至少需要的转速：

$$\text{转速} = \sqrt{3000 / [1.118 \times 10^{-5} \times \text{最大半径 (cm)}]}$$

与分枝杆菌沉淀相关的两个因素是离心力和离心时间。延长离心时间，可以在较低转速时沉淀分枝杆菌，但会使温度升得较高，因此会杀死较多的分枝杆菌。离心前必须将离心管拧紧并配平。在转子完全停止前不要打开离心机。去污剂作用的时间总共不要超过30分钟，如离心前已经作用15分钟，离心用15分钟。

将上清倒入防飞溅的容器，内盛5%的石碳酸。如果管口有液体流出，用吸水纸吸干。在容器上放一个漏斗，下端伸入消毒剂内可以防止飞溅的发生。沉淀用1ml蒸馏水重悬，混匀后就可以接种了。

剩下的沉淀部分需要至少保留2天，在确定培养基没有污染后再丢弃。如果发现有污染，在剩余的沉淀中加入少许5%的草酸作用20-30分钟以去除抗碱性的污染物，然后加满蒸馏水离心，用沉淀接种。

6. 孵育和结果判读

并非所有国家都可以提供持续的电力，因此有必要对培养的温度进行监控。温箱内温度仪的读数可能是不准确的，因此需要在培养箱内长期放入温度计以确保温度的记录是准确的。

用移液器接种时要保证接种液铺满在培养基的全表面，可以将培养管倾斜放置。然后拧上管盖，但不要太紧，这样可以使多余的水份蒸发出来。第一天培养管在37℃水平放置过夜。之后进行检查时，如果发现还有多余的水份，那么应该让管盖再保持松弛状态一段时间。如果所有水份都蒸发了，那么就拧紧管盖并直到开始药敏实验前不再打开。拧紧管盖后，培养基可以在直立状态下培养约9周时间。如果使用塑料的培养管或瓶，这期间培养基的多余的水份可能会蒸发，也可能不会。这取决于培养管或瓶的塑料的质量，以及盖子的类型。如果在运往其他实验室的途中，管内多余的液体可能造成污染。

接种后的培养基应该每周检查一次。大多数污染的杂菌和快速生长的分枝杆菌在接种后一周内就可以看出来。牛分枝杆菌和生长缓慢的结核分枝杆菌可能在5~9周时出现。

大多数的基层实验室的工作仅限与此。他们不应该尝试进行任何菌种鉴定或药敏的实验。在菌株长出来后，*无论如何都不要打开培养管盖*，而应送往上一级的实验室。如果他们严格按照这个原则操作，就不需要有生物安全柜。如果要打开有分枝杆菌培养物的培养管，就必须在生物安全柜中操作。如果严格按照此条例进行，那么似乎不允许在运输前打开管盖将多余的水倒出。最安全和可行解决的办法是当培养接种完后，使管盖呈松弛状态在培养箱内一段时间，以去除多余的水份此后应拧紧盖子，绝不能再次打开。

在处理阳性培养物的实验室，所有的结核分枝杆菌阳性培养物在跨国实验室抽样检查并报告了熟练度测试结果之间，都应拧紧管盖在冰箱里避光保存。

长期保存菌株可以将大菌量的菌液放入脱脂乳 (skim-milk) 或者其他的液体培养基内。另一方法是使用2ml的装有L-J培养基的聚乙烯小管，-20℃冻存效果较好。如果在-70℃保存，可以在很多种培养基内保存很多年而不会有活力的明显降低。

7. 结核分枝杆菌复合群的鉴定

鉴定分枝杆菌的程序很复杂，需要多种生化检测（或昂贵的分子生物学检测）对其属于哪种致病分枝杆菌进行鉴别。在耐药性调查中，只需要知道分枝

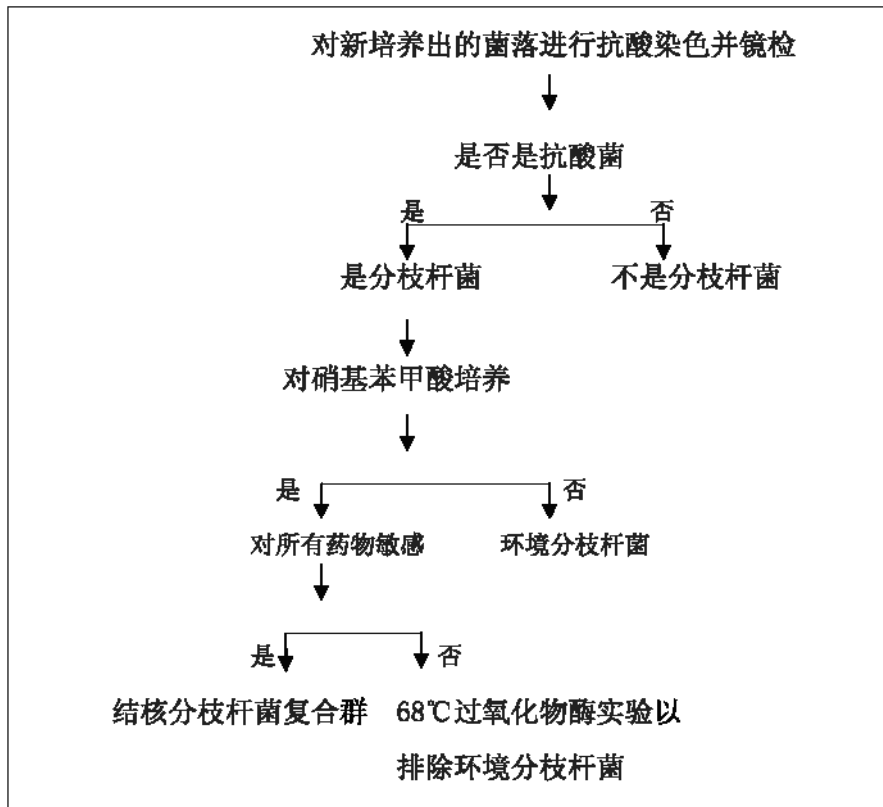
杆菌是否是属于结核分枝复合体，因而可以大大简化这些步骤。这里推荐一种可以在药敏试验中同时操作的非常简单的鉴定方法（图IV.3）。培养物如果发生了污染必须马上处理掉，反之，如果培养物形似分枝杆菌（如类似的菌落形态、颜色和菌落形成时间），则需先进行萋尼染色以初步鉴定并确定其是否被杂菌污染。纯的培养物将进行药敏试验，同时在对硝基苯甲酸培养基中进行传代培养（PNB，表IV.3）。只有当培养物在PNB培养基中生长并表现出药物抗性时，需要进一步通过生化检测进行鉴定。如果培养物形似结核分枝杆菌，生长特性像结核分枝杆菌，并且药物敏感性也与大多数结核分枝杆菌菌株类似，这样就不需要进一步的确认了，尤其是在结核高流行的环境中。

当需要进一步验证时，如果菌量足够，可以进行生化检测。68℃变性过氧化氢酶试验（见表IV.3）可以将结核分枝杆菌复合群和其他分枝杆菌区分开来，但是不包括胃分枝杆菌，嗜血分枝杆菌及海分枝杆菌（这三种在痰标本中很少分离到）。用烟酸试验、硝酸还原试验、噻吩-2-羧基酰胺（TCH）试验可以区分结核分枝杆菌和牛分枝杆菌以及其他一些分枝杆菌。需要注意的是，某些结核分枝杆菌与牛分枝杆菌一样对烟酸呈阴性反应。而且由于烟酸的毒性，现在烟酸的运输受到了限制，这也为工作带来了不便。由于烟酸测试条昂贵而且产生的结果不可信，在很多实验室已不再使用。几乎所有结核分枝杆菌复合体都对PNB敏感，牛分枝杆菌同时对PNB和TCH敏感。但是要确定是牛分枝杆菌必须经过硝酸还原实验阴性结果的证实。在非洲分枝杆菌和结核分枝杆菌TCH敏感性突变株流行的区域包括在亚洲的大部分地区，因为对其进行恰当的鉴定是比较困难的，所以不推荐。因此有关的烟酸、TCH和硝酸试验在此没有介绍。

8. 药敏实验

耐药的产生过程是通过暴露于药物从而对菌群中的少量已经存在突变的细菌进行选择的结果。因此，在药敏实验中接种量的标准化是很重要的一点。几十年前研究发现，约1mg湿重/ml结核杆菌菌悬液的集落形成单位（Colony forming units, CFU）菌内和菌间的变异估计在 $10^6 \sim 10^8$ 范围内。因此，采用这种方法检测耐药性时，可能由于在含药培养基上的过量接种，而对结果造成误判，将药物敏感株判为耐药株。

改良小川（Kudoh）培养基推荐只作为初始分离使用，但如果要进行药敏实验则必须使用IUTM罗氏培养基。



图IV.3 结核分枝杆菌复合体的鉴定

药敏实验的方法、优点和缺点

分枝杆菌生物学家较多采用的药敏实验方法有三种，即抗性比率法、绝对浓度法和比例法。这些方法解决不同问题：易于操作，药物浓度误差，以及接种量的不确定。简而言之，抗性比率法注重减少药物浓度误差造成的影响。但是如果药物敏感株和抗性株的最小抑菌浓度相差不大，则这种方法用处不大。绝对浓度法从技术上来说是三者中最简单的。但它却无法顾及接种量、某些菌株在含药培养基生长缓慢或不好、以及可能存在的药物浓度误差等问题。比例法不考虑药物浓度的问题，但可以很好的解决接种量的问题。而后者恰恰是很多分枝杆菌生物学家关注的焦点，所以比例法获得了更广泛的认同。但是，由于结核杆菌的聚集特性，可能给比例法造成较大的误差，尤其当使用的培养物是来自干菌落时。要解决这一问题，就需要制备分散良好的菌悬液在以干菌落作为实验材料时要特别注意。在使用干培养物时，需要增加磨菌的时间以得到均匀的菌悬液，或是在药敏实验前再次进行接种传代。从这个方面来看，绝对

浓度法也有其优越性，因为它用湿菌重量来进行度量的。

表IV.3 基本鉴定实验：对硝基苯甲酸（PNB）培养基和68℃热变性过氧化物酶实验

在对硝基苯甲酸（PNB）培养基上的生长

结核分枝杆菌复合群的成员一般不在PNB培养基上生长，而其他种类的分枝杆菌却可以。据此可以将环境分枝杆菌，或其与结核分枝杆菌复合体的混合物与单纯的分枝杆菌区分开来。这个实验可以与药敏实验同时进行，在一个培养管中加入终浓度500ug/ml的PNB，然后接种大约1000个的结核分枝杆菌。比如，用10 μ l按照100倍稀释的菌液给对照和含药培养基接种。

制备含PNB500ug/ml的培养基，将250mgPNB溶于10ml二甲基亚砷或甲醇中。将2ml贮存液加入到100mlL-J培养基中，然后分装。将培养基置于凝固器中凝固85℃，45min。

耐热触酶实验（pH7.0，68℃）

方法：

（1）在16×125mm的螺口盖管中加入0.5ml的0.06TMPBS（pH7.0），从培养基上取2~3接种环的培养物在PBS中重悬。依样准备两管。

（2）其中一管在68℃水浴20分钟，另一管室温放置。

（3）当水浴的管温度降到室温后，分别在两管中加入0.5ml吐温/过氧化氢混合物，将管盖拧松。

（4）如果加热的管没有产生气泡，而不加热的管产生了气泡，则可将培养物视为结核杆菌复合体（当培养物来自痰时）。如果不加热的管20分钟后仍未产生气泡，则报阴性结果。

大多数的环境分枝杆菌都可以产生热稳定的过氧化物酶，不论加不加热都可以产生气泡。如果两管都没有产生气泡则说明实验失败，或说明这是一株不产生过氧化物酶的菌株（如某些对异烟肼耐药的结核分枝杆菌株）。

磷酸缓冲液 pH7.0

—储存液1：磷酸氢二钠0.067M

将9.47克无水Na₂HPO₄溶于1升蒸馏水中

—储存液2：磷酸二氢钾0.067M

将9.07克KH₂PO₄溶于1升水中

—将61.1ml储存液1与38.9ml储存液2混合，调节pH值

10%的吐温80

将10ml的吐温80与90ml蒸馏水混匀，121℃高压灭菌10分钟。灭菌后漩涡振荡冷却，以保证吐温80与水均匀互溶，在冰箱里保存。

吐温—过氧化物酶混合物

需用现配。将30%的过氧化氢和10%的吐温80按照1:1混合。

如果菌株表现出结核杆菌复合群的性质（如菌落形态和缓慢生长），接下来就对其进行异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇的耐药性检测。IUTM罗氏培养基一般用常见的28ml容积的容器或试管盛装，其中加入或不加入相应浓度的药物（见表IV.4和IV.5）。

经过校准的用24号接种环其内径为3mm，其每次的接种量为0.01ml。初次分离培养物须记录其生长出的菌量：如果菌落数5个或少于5个那么药敏的结果就不太可靠，因此不推荐对其进行药敏实验。在初次分离培养物或次机级分离培养物观察到菌落出现1~2周后，用接种环从培养物中挑取有代表性的菌落5~10mg，置于含1ml水和10颗直径3mm的玻璃珠的已灭菌McCartney瓶（一种容积为14ml的螺口盖瓶）中。然后在漩涡振荡器上间歇性振荡1分钟左右以混匀。如有必要，混匀后可以通过加入灭菌蒸馏水调节其浊度，使其与1mg/ml的BCG或McFarland 1号标准比浊管的浑浊度相当（具体操作步骤参见：Kent P T, Kubica G P. Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory, US Department of Health & Human Service, Center of Disease Control, Georgia, USA, 1985;p 168）。

将原始浓度的菌悬液稀释出 10^{-2} 和 10^{-4} 两个浓度梯度，具体做法是在McCartney瓶中装入1.0ml的蒸馏水，灭菌，然后接种一接种环的菌液。操作时要注意避免搅动悬液，以免将大块的菌块带入稀释液。接种时，在对照管和每个含药培养管中接种一接种环（0.01ml）的各稀释度菌液。

如果操作得当，比例法可以将接种量的误差对药敏结果的影响程度减少至最小。

表IV.4 药物浓度和比例

药物	浓度	临界比例
异烟肼	0.2mg/L	1%
利福平	40.0mg/L	1%
二氢链霉素	4.0mg/L	1%
乙胺丁醇	2.0mg/L	1%

含药培养基

IUTM改良的罗氏培养基中每种药物浓度是：异烟肼0.2mg/L，二氢链霉素4mg/L，利福平40mg/L，乙胺丁醇2mg/L。制备好的培养基在4℃最多可保存一个月。

所有药品的生产批号都必须进行记录（参见质量控制相关章节）。对某些药品来说，需要按照其生物效价对实际要求的药量进行转换。而每批号药品的盐成分和纯度不同，因此需要根据厂商提供的特定的效价因子来计算（见表IV.5）。在使用二氢链霉素（通常是硫酸盐）和利福平时就要按照这种方法进行处理。乙胺丁醇常以二氢氯化物的形式提供，大多数实验室都会对效价进行校正。异烟肼按照1:1的盐对基成分比例使用。

整个过程中很重要的是保证培养基凝固时的温度和时间，确保在85℃维持50分钟，或是达到鸡蛋刚好凝固所需的时间，并且要保证每个管或瓶都均匀受热。要达到这样的要求，需要配备使用蒸汽或水浴的专用凝固器。温度或时间的超标都可能导致培养基中药效的降低。

判读、解释和报告

接种后的培养基应该在37℃孵育一周后检查污染情况。接种4周（28天）后可以开始第一次判读药敏的结果。此时如果接种的菌株都耐药可以报告为耐药。因为某些耐多药的菌株生长非常缓慢，所以即使在28天时对照培养基上已经生长出很多菌而含药培养基上仍没有菌长出，也不能马上报药敏结果，而应该在接种后第六周（42天）时再观察一次。如果第六周时连对照培养基上也很少有菌长出（如在 10^{-4} 稀释度的培养基上基本没有克隆长出），那么应该重新做这个实验。此时可以考虑加大接种浓度，如接种 10^{-1} 和 10^{-3} 的菌，这样可以增加结果的准确性，但要保证不会接种过量。同样，如果 10^{-4} （或 10^{-3} ）稀释度的空白培养基上长出大量的菌而同时又表现出某些药物耐药性，这时应该重新做这个实验，因为这可能是由于接种量过大造成的。

是否耐药是通过将在含药培养基上与在对照培养基上的菌落数比来判断的，这里的含药培养基指的是含临界药物浓度培养基，如异烟肼的临界浓度是0.2mg/L，利福平是40mg/L，链霉素是4mg/L，乙胺丁醇是2mg/L。如果菌落在任一含药培养基上的生长超过在对照上的1%，那么就可以判断为对这种药具有耐药性。如果难以作出判断，这个实验就应该重做。

表IV.5 药敏实验比例法中药物的准备

1. 称量并配置抗结核药的储液
2. 稀释储液到一定浓度并按所要求的比例加入培养基
3. 药品和储存液的保存

1. 称量并配制抗结核药的储液
使用的药粉必须是有资质的厂家的纯粉。最好将药粉保存在干燥器中以防止从环境中吸潮。同时通过厂商的网站了解每批药粉的活性，定期更换干燥剂。如果没办法做到上述要求，那么最好每一到两年重新购买一次药粉。只有利福平可能例外，大多数实验室可以在每次购买一小瓶。

购买的药粉首先要考虑的是其效价。在不同生产厂家和不同批次之间的药粉其效价都可能存在差异。效价主要取决于：1) 药粉的纯度；2) 含水量；3) 盐/平衡离子含量。

$$\text{效价} = \text{纯度} \times \text{活性成分} \times (1 - \text{水份含量})$$

举例：假设某个批次的利福平的纯度是0.998(仅为示例，请咨询厂商获得具体数据)，活性成分的比例是0.950(仅为示例，具体数据请咨询厂商)，含水量为零。则：

$$\begin{aligned} \text{效价} &= 0.998 \times 0.950 \times (1 - 0) \\ &= 0.948 \end{aligned}$$

由于上述原因，在药瓶上一般不标示效价，而可以通过上述公式或从厂商的网站得到。如果查不到效价因子的值，这时可以用平均效价乘以称取药粉的重量来计算有效物质的量。各种药粉的平均效价为：异烟肼1.0，利福平0.95，二氢链霉素0.80，乙胺丁醇0.75。

储液的浓度较高保存的效果较好。每一种药都应该配置出10mg/ml的储液，即将100mg活性物质溶解在10ml溶剂中，然后按1ml的量进行分装、冷冻。这样做非常方便，因为仅须将100除以效价因子(或是平均效价因子)就可以得到所应称量的值，如称取异烟肼时为100mg(100/1)，或是133mg(100/0.75)的二氢氯化乙胺丁醇。操作时记录下所称取药粉的确切重量(而不是所计算出的量)，然后乘以效价因子(或平均效价因子)就可以得到实际活性物质的量。用这个值除以10就可以得到配置10mg/ml的储液所需溶剂的体积。

举例：需要称取133mg二氢氯化乙胺丁醇，但实际称取的量为121mg。通过计算： $121 \times 0.75 = 90.75$ ，此为实际活性物质的量。所以我们需要9.075ml(大约是9.1ml)的溶剂将其配置成10mg/ml的储液。

溶剂一般是灭菌的蒸馏水。但是利福平需要二甲基亚砜(DMSO)或分析纯甲醇作为溶剂。

药品溶液已是自然无菌状态，所以不需(也不能)进行高压灭菌或进行超滤。

表IV.5 药敏实验比例法中药物的准备(续)

<p>2. 准备配培养基时使用的稀释液</p> <p>利福平在培养基中的终浓度是$40\mu\text{g/ml}$，所以配置100ml培养基时需要$4000\mu\text{g}$或是4mg的药粉。利福平储液的浓度是10mg/ml，这时不需要进一步对储液进行稀释而只需在100ml的L-J培养基中加入0.4ml的储液摇匀就可以了。</p> <p>其他几种药则需进行一步或多步的稀释，具体步骤参见下表。</p>					
药物储液浓度	培养基中活性物质终浓度	100ml培养基中需要的总量	从储液到培养基所需的稀释比	稀释步骤	250ml培养基所需最终稀释度溶液量
异烟肼 (10mg/ml)	$0.2\mu\text{g/ml}$	$20\mu\text{g}=0.02\text{mg}$	$10/0.02=500$	$10\times$ $/10\times$ $/5\times$	2.5ml
乙胺丁醇 (10mg/ml)	$2\mu\text{g/ml}$	$200\mu\text{g}=0.2\text{mg}$	$10/0.2=50$	$10\times/5$ \times	2.5ml
二氢链霉素 (10mg/ml)	$4\mu\text{g/ml}$	$400\mu\text{g}=0.4\text{mg}$	$10/0.4=25$	$10\times$ $/2.5\times$	2.5ml
<p>所有移液器（或可换枪头）和管子都必须经过高压灭菌，吸取液体时应该使用精确定量的移液器作为10倍稀释度。第一步稀释时从储液中量取0.5ml的储存液体，加入4.5ml灭菌蒸馏水中，混匀。接下来的稀释步骤中，分别将1ml前一步混匀的稀释液加到9ml（异烟肼稀释第二步）或4ml（异烟肼第三步和乙胺丁醇第二步）或1.5ml（链霉素第二步）的灭菌蒸馏水中，并混匀。</p> <p>将最后一步的稀释液1ml加入100ml培养基中并混匀。当需制备大量的培养基时可以简化最后的稀释步骤。比如配置500ml含$4\mu\text{g/ml}$链霉素的培养基时，可以直接将10mg/ml的储液稀释10倍，然后加2ml稀释液到500ml培养基中（活性物质含量=$500\times 4\mu\text{g}=2\text{mg}$）。</p>					
<p>3. 药品及储液的储存</p> <p>在合适的温度下，药粉可以保存1~2年。</p> <ul style="list-style-type: none"> - 异烟肼和乙胺丁醇可以在室温保存，最好与硅胶一起存放在干燥器中（氢氟乙醇是吸水性的）。 - 二氢链霉素必须在4°C保存。 - 利福平必须在-20°C保存。 					

表IV.5 药敏实验比例法中药物的准备(续)

药品和PNB的储液可以按照1ml / 管进行分装，在管上标识清楚，在密封良好的情况下可以冻存最多达12个月。解冻后稀释所剩余的部分必须丢弃。每瓶药品的量往往大大超过一两年所需消耗的量，所以如果保存中途由于断电等原因而难以保证药品的冻存状态，储液就不能继续使用了。

稀释后其他浓度的药液也不能够保存以继续使用。

含药培养基应拧紧管口并在冰箱中保存，并最好在3个月内使用。

9. 培养和药敏实验结果的记录

有一个重要的差别必须给予注意，那就是公共卫生监测和监督实验室工作所关注的信息是不同的。

如果是监督实验室工作，相关信息应记录得尽量详细，以便发现培养和药敏的问题所在，每个标本都应有单独的卡片，或做成一个专门的记录本（参见附件7和附件8）。记录的项目可以由每个实验室根据自己的侧重点进行编写，主要包括各类实验的数目、辨读结果的频度等。

提交标本进行培养的服务单位必须在专门设计的申请单上提供病人信息（附件9）。

药敏实验的结果必须是详尽无遗漏的。比如说，只有全部四种药物的药敏实验都做了的病例才可以报药敏结果，而所有的可能的组合都应该列出。这可以为将来做比较提供便利。结果还应根据病例类型报告，这是为了对耐药菌株在初治和复治病人中出现的频率进行评估。报告的表格见附件10。

10. 培养和药敏的室内质控

室内质控涵盖了参比实验室管理的各个层面，目的是为了检测结果的准确性和可重复性。

负责每一项检验的每个人员应该人手一本操作手册和流程图，流程图应逐步详细描述在质控时当遇到不符合质控要求的情况时应该怎样处理。对关键的指标，如培养的污染率，初治病例的涂阳培阳率，耐药率和耐药谱等，可以制成图表的形式，以便于监测。

对不含药的培养基进行质量控制可以接种一些快速生长分枝杆菌，如偶发

分枝杆菌。在接种偶发分枝杆菌后，如果5天后仍未长出菌落，则这批培养基并未达到要求的质量。

对每一批新制作的用于药敏试验的培养基应该用H37Ra标准株作质控检测药敏试验，另外一种替代方法是在每次药敏实验中，都同时做一个H37Ra和两株结核分枝杆菌的对照，这两株结核分枝杆菌对部分药物具有中度耐药性。这样所有对照加在一起就可以显示对四种药物的耐药性了。

11. 药敏实验的熟练度测试

为了使药敏实验的结果可靠且在不同实验室间具有可比性，世界卫生组织和世界防痨和肺部疾病联盟在1994年组建了跨国结核病参比实验室工作网络。这个网络组建的首要目的是使世界各地取得的药敏结果具有可比性。当国家参比实验室进行耐药监测时，由跨国参比实验室对其进行药敏实验熟练度测试。具体内容是在跨国参比实验室和国家参比实验室间交换菌株并进行药敏实验，将实验结果与现行跨国参比实验室的金标准进行比较，以对其实验结果进行检测。

测试的第二步包括两部分，即由相关的跨国参比实验室对耐药调查中的菌株进行系统的（耐药株）或随机的（敏感株）抽查，并采用双盲法进行比较。

这里推荐在开展耐药性调查时，国家参比实验室如果能与最合适的跨国参比实验室合作，可以将其工作更好的整合到全球网络工作中来。

12. 对药敏实验结果进行分析

清楚菌株来自什么样的人群是很重要的。如前所述，调查人群理想情况是能代表整个国家的结核病人群的特点。但如果这种代表性难以保证，那么必须清楚的界定潜在的偏倚。

必须清晰的区分初、复治病例，并分别报告。之所以这样做有两个原因，首先，有无治疗史的病人采取的抽样可能存在着差异，在调查中往往需要较多的有治疗史病例，如果对二者不加以区分，就可能对整体的分析造成混乱。但是，当样本量足够大并且两组的比例关系能代表在整个人口中两种病人的比例时，比如是在所有新登记的病例中进行系统抽样得到的结果，那么将二组联合起来进行分析是可行的，对此结果进行分析可以对当时整个人口的结核耐药株流行情况给出一个大体的描述。对一组复治病例进行持续的抽样，当抽样结果是全面而具有代表性时，分析得到的结果应该与点调查时相似，但即使这样这

个结果也不能作为分析流行性的依据，但却可以作为分析趋势的资料，只要逐年样本能代表所有发生的复治病例类型并符合在人群中相应的比例。

在一个实施良好的规划中，从复治病人分离的耐药菌株常常代表感染的菌株本身就是耐药株，也就是说在治疗开始时的菌株已经耐药，这也是以前发生治疗失败或者复发的原因。在经过一段时间的治疗后，菌株的抗性由于药物的筛选作用变得更强了。在治疗过程中，某部分的病人可能由于错误的治疗而导致耐药菌的产生，这不应该算做是规划的缺陷。这种情况只能通过与治疗前的耐药资料进行比较才能发现，但这往往缺乏可操作性。所以要对规划的实施进行评估，只能通过复治病人组的流行趋势进行监测才能作出。在实施状况不佳的规划中，耐药比率会（很快的）上升，这是因为获得性耐药的病例快速增加。如果规划充分开展后，这种情况会逐渐好转。

对复治病例的调查可以帮助分析规划实施过程中最新出现的问题。但在初治病人中耐药的出现却常常是滞后的，这跟结核分枝杆菌在体内从潜伏状态到形成明显的临床病症的时间有关。相比之下，初治病人的耐药率进行耐药监测在监督整个规划的实施中所起的作用较小。重要的一点是收集病人年龄分布与耐药流行的关系。要知道目前流行的究竟是哪些耐药株，可以分析从5岁以下的儿童分离得到的菌株，他们反映最近几年中流行的菌株，这些菌株最有可能来源于初治病人。但是由于从儿童病人往往很少能获得痰阳性标本，这种方法在实际操作中可能有困难。替代的方法是将初治病人按照不同年龄组分类，检测不同年龄组的耐药流行的趋势，从而获得整体流行趋势的大体框架。如果在不同年龄组之间，耐药率随着年龄的增长呈下降趋势，那么说明这一段时间以来耐药率呈上升趋势。反之，如果随着年龄增长耐药率呈上升，那么说明情况在好转，或者可能是错误的病人分类造成的（比如将复治病例划为初治病例）。这种判断的依据是，病人年龄越大，总的来讲病人感染结核杆菌的平均时间也越长，而年轻的病人时间则较短。在结核发病率及再感染率低的时候，这种推断更可靠，如果再感染率高，可能就不那么可靠了。

要估计初治病人中耐药水平，通过计算耐药株的比率就足够了。而在复治病人中计算耐药株的比率意义就不是很大。对复治病人来讲，记录报告一年发现的所有耐药病例更有意义。在一个国家的耐药监测中，应当尽量精确的确定纳入调查的复治病人进行过药敏实验的比例。这种计算越精确，在估计耐药株绝对数量上做的额外工作就越少。

在结核病参比实验室登记培养的病例信息应定期存入电脑中的数据库。为了进行有效的分析，需要配备一套合适的分析软件。最低的要求是一套EpiData和开放办公系统（如OpenOffice），以便进行文字处理和使用电子表

格。这两款软件都可以从以下网址免费下载：www.epidata.dk 和 www.openoffice.org。

13. 展望未来

全球结核病耐药监测项目 (Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance) 在技术操作的标准化上已经取得了一定的成就，但是对结核耐药性的整体框架认识还远远不够，因为项目涵盖的病人仅是结核病人一小部分。不能获得具有全国代表性的样本，培养和药敏实验对技术的要求较高是造成这种情况的部分原因，另外在某些国家由于运送不及时而难以得到存活的菌株。

国家参比实验室实施准确的耐药性调查的复杂性往往被低估。耐药监测基本的要求是一个简单的监测利福平耐药的系统，这可作为六种药物治疗方案有效与否的很好的预测指标。用分子生物学的方法可以检测利福平抗药性基因 *rpoB* 的突变。以标准表型学方法作为金标准，现在商业化分子生物学技术检测利福平的抗药性其敏感性可以达到95%。依据 *rpoB* 基因各个特定突变位点的流行性，检测的特异性可能也与此相关。整个检测首先是对结核杆菌目的DNA片段扩增，DNA来自痰涂片阳性的标本，标本中的菌不要求是活菌。然后通过杂交或测序对突变进行检测。

用于分子检测的标本可以在基层机构采集然后运输到中心结防机构，而不用担心菌失活的问题。在具有相应资质的国家参比实验室或研究实验室，可以在本室进行利福平的药敏或抗性鉴定。如果不具有相应资质，可以将灭菌的标本交由跨国参比实验室进行检测，此实验由国际团体支付相关费用。这种前景可能有助于走出目前令人失望的境况。

D 耐药监测的伦理学方面的考虑

根据世界医学会 (World Medical Association) 的赫尔辛基宣言 (Declaration of Helsinki)，研究的对象必须是自愿的、知情的，研究结果可能对受研究的人群有益。当本项研究结束时，应该保证参与了此研究的每个病人能够使用到此研究确认的最好的预防病性、诊断性和治疗性的方法。在制定研究计划的过程中，有必要注意如何确保在试验完成后参与者的利益把包括与预防性、诊断性、治疗性的方法或者转到合适的机构得到保障。具体的安排及措施必须写入研究计划中，以便于伦理审查委员会评审时考察。

除了耐多药病人以外，其他耐药病人可由可用的药物得到较好的治疗效果。但是对同时耐异烟肼和利福平的病人，要治愈他们往往不能只依靠标准化的治疗方案，而需要借助二线药物。并不是所有的国家都可以得到二线药物，也不是所有国家都有能力组织及实施对耐多药病人的复杂的治疗方案。

当有条件对耐多药病人实施治疗时，要竭尽全力追踪耐多药病人，询问临床症状。当病人对治疗反应不好时，要为病人提供药品以使其可以得到治愈的机会。这些应该在研究计划中列出，并要考虑到得出药敏结果会需要一段滞后时间。

参考文献

1. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mitchison D A, Rist N, Smelev N A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 21-43.
2. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler H T, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ* 1963; 29: 565-578.
3. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. Second edition. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997.
4. Henderson R H, Davis H, Eddins D L, Foege W H. Assessment of vaccination coverage, vaccination scar rates, and smallpox scarring in five areas of West Africa. *Bull World Health Organ* 1973; 48: 183-194.
5. Jensen K A. Towards a standardisation of laboratory methods. Second report of the Sub-Committee of Laboratory Methods of the International Union Against Tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1955; 25(No 1-2): 89-104.
6. Khomenko A G. The variability of Mycobacterium tuberculosis in patients with cavitory tuberculosis in the course of chemotherapy. *Tubercle* 1987; 68: 243-253.
7. Kubica G P, Gross W M, Hawkins J E, Sommers H M, Vestal A L, Wayne L G. Laboratory services for mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1975; 112: 773-787.
8. Kubica G P, Pool G L. Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. I. An attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH. *Am Rev Respir Dis* 1960; 81: 387-391.
9. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ* 1974; 51: 71-82.

10. Laszlo A, Eidus L. Test for differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* from other mycobacteria. *Can J Microbiol* 1978; 24: 754-756.
11. Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 748-756.
12. Marks J. A simple method for the cultivation of tubercle bacilli. *Monthly Bull Min Health PHLS* 1959; 18: 81-86.
13. Marks J. A system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria. *Tubercle* 1976; 57: 207-225.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. Wayne, PA: NCCLS 2003; 23(No 18): 1-71.
15. Ogawa T, Saito N, Sawai T, Nakajima K, Toyama K, Honda A, et al. The comparative studies between NaOH method and neutralization method for isolation of tubercle bacilli. *Kitasato Arch Exp Med* 1960; 23: 9-24.
16. Paramasivan C N, Narayana A S L, Prabhakar R, Rajagopal M S, Somasundaram P R, Tripathy S P. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. *Tubercle* 1983; 64: 119-124.
17. Petroff S A. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med* 1915; 21: 38-42.
18. Stonebrink B. Tubercle bacilli and pyruvic acid. *The Hague Proc Tub Res Council*, 1957; 44: 67-74.
19. World Health Organization. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world. Report No. 3. WHO/ CDS/TB/2004.343: 1-129. Geneva, Switzerland: WHO, 2004.
20. World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, 1997. WHO/TB/96.216: 1-36. Geneva, Switzerland: WHO, 1997.

第五章

全国结核病实验室网络中需要的方法、材料、 仪器和设施环境

A. 基层痰涂片镜检实验室的设计

基层痰涂片镜检实验室的设计细节可能差别很大。这主要取决于i) 是否还进行其他工作；ii) 可使用空间的格局和大小；iii) 镜检采用的是日光还是电源。举例来说，一个镜检实验室可以包括以下三个独立的部分（附件11）：

- 一个采光良好的痰片准备和染色区
- 一个采光良好的镜检区
- 一个登记和储存区

一个要进行多种工作的实验室，其中包括研究分枝杆菌的工作，则至少应该有一个水槽和三个实验台：

- 一个用于涂片的实验台
- 一个用于染色的水槽
- 一个用于镜检的实验台
- 一个用于文字记录等工作的实验台（或桌子）。

同时实验室还应配备椅子，或最好是可调节高度的凳子。表V.1列出了部分在镜检实验室中需要的设备。

为了使工作人员免于受感染性气溶胶的感染，良好的通风是必需的。最好的方法是利用门窗使空气对流到外部环境中（但是反过来则不行）。在封闭型的环境中还需配备一个抽风扇帮助通风。

实验室还应有可以达到当地技术的焚化装置以便对污染性物质进行安全处理。

表V.1 基层实验室需要的设备

物品	单位	在欧洲的价格（欧元）	
		单价	总价
双目显微镜，电源/反光镜 备用物镜，灯泡	1	800	800
有下水道的水槽，或塑料盆	1	以当地实价为准	
自来水或有盖的大桶	1	以当地实价为准	
垃圾焚化筒，有盖有锁	1	以当地实价为准	
用于染色的金属架	1	以当地实价为准	
木质干燥架	1	以当地实价为准	
金属的酒精灯	1	20	20
载片盒	5	4	20
1L的试剂瓶，防碎，棕色	4	15	60
250mL染液瓶，塑料有喷嘴	3	4	12
镜油滴瓶，塑料	1	2	2
1L的大口杯，塑料，有把手	1	10	10
小漏斗，塑料	3	<1	2
小桌子	3	以当地实价为准	
椅子	1	以当地实价为准	
实验室凳	2	以当地实价为准	
搁物架	1	以当地实价为准	
放显微镜的橱柜	1	以当地实价为准	

B 国家结核病参比实验室的设计

1. 实验室选址

实验室的选址必须由国家最高公共卫生机构决定，并咨询国家结核病规划的意见。有很多因素要考虑到。国家实验室一般会选在国家的首都，因为这里的基础设施比较完善，可以较满意的方式进行运作。

从组织结构上来说，实验室处于公共卫生行政部门的管理下是很重要的。如果位置可以与其他的公共卫生研究所和公共卫生实验室靠近，可以给工作带来便利。

一些基础的设施，如公路、供水、下水道、电力可能还有天然气，都应该

给予配备。后几项可以通过建筑内部的装备获得。在某些地区，需要配备应急电源发电机。此外，如果可以配备瓶装气体（推荐丁烷），是有其益处的。实验室应该有独立的水库和水净化系统。

当选定了特定的地点后，应该请一位建筑师进行评估。重要的一点是应该考虑选点的大小是否满足预定的空间要求。其他的一些因素，如地形、便利性、视野、公路噪音、阳光照射、风、浮尘等，这些都会影响建筑的设计。

如果选址不适于初始的目的，在开始计划之前必须重新选定一个地址。在最终确定地址时，必须向有关部门证实所有的一切都已准备就绪（如产权、其他可能与建筑商的关系冲突、技术细节等）。而一旦计划已经开始，那么选址就不能轻易更改了。这种变更并不少见，可能造成工程的延误和多样矛盾，以及超支预算所引起的麻烦。

2. 空间设计的标准

表V.2显示的是一个参比实验室所需的房间及适宜的面积大小，并对每间房间的功能进行了简单的解释。对大小的评估应看作一个近似的数字，会随房间不同的格局及仪器家具来决定。图中所示尺寸是最小的要求。

实验室的功能区不要分散于两层以上的空间。所有的技术工作都应位于同一层。

3. 空间设计的关系

表V.3显示的是不同功能区之间大致关系。不必要太拘泥于细节的精确。对功能区的描述应该看作是“为某种特定的目的/功能而设计的区域”，而不一定是由墙和可闭门组成的一个空间。相关联的功能区最好位于同一房间内。但是有些功能区必须与其它分离，如培养基准备室由于对洁净的要求而需单独用一间房间，同样荧光镜检室也需要一间单独的暗室。

表V.2 空间设计的标准

实验室技术功能区		
功能区	面积 (m ²)	进行的工作
标本接收区	8	打开并对标本进行登记
培养基准备区	12	制备培养基和蒸馏水
储存区	15	储存玻璃仪器和耗材、设备等
气体储存区	3	存放气体容器 (需要向外的通道)
镜检区	25	光学镜检
培养操作区	30	鉴定和药敏实验
灭菌区	12	清洁和消毒物品
荧光镜检室	4	进行荧光镜检的暗室
冷藏室 (4℃)	6	储存培养基和化学品的房间或冰箱
孵育室 (37℃)	8	孵育
管理区		
秘书室	20	一般行政工作, 保存相关记录
会议室	25	会议, 休息, 聚餐, 培训
经理室	12	参比实验室主任办公室
文献室	12	
储藏室	12	
更衣室	10	男更衣室及男员工的淋浴
更衣室	10	女更衣室及女员工的淋浴

位于塞内加尔达喀尔的参比实验室 (附件12), 其设计时考虑到所有的实验室工作都是相关联的一个整体, 所以整个实验室的设计使工作人员们可以在各个区域之间穿移而不需穿越门的限制。这样实验室任意区域工作的人可以看见并同其他工作的人交流。标准化操作程序可以保证卫生的要求, 这也是决定污染是否发生的关键做法。

表V.3 不同功能区之间的大致关系

	标本接收	镜检	培养	灭菌	培养基制备	荧光镜检	冷藏室	孵育室	气体储存	储藏室
标本接收		DA	SF		SF					
镜检	DA		DA	CL		DA		CL		CL
培养	SF	DA		DA	DA	DA	CL	DA	CL	CL
灭菌		CL	DA		DA			CL	DA	CL
培养基制备	SF		DA	DA			DA		CL	CL
荧光镜检		DA	DA							
冷藏室4℃			CL		DA					
孵育室37℃		CL	DA	CL						
储藏室			CL	DA	CL					
气体储存室		CL	CL	CL	CL					

DA=直接连接, CL=相邻, SF=相隔离

对实验室进行装配其实就是对实验室的再划分,以使每个功能区都有各自的区域。但放入家具和设备时,要从整体上进行考虑。如果某些功能或者活动在一些时候需要比初始设计更大的空间,那么可以在同一个房间内适当的扩大。这样增加了灵活性并使工作人员更便于及时沟通。

实验室的支持职能位于辅助房间内,可以直接通向实验区。并不需要一个走廊连接,这样可以缩短距离并节省建筑费用。从灭菌室可以直接通储藏室。这样,所有物品在从储藏室进入实验区之前都可以先进行清洗或灭菌。建议在生物安全柜旁再安置一个灭菌锅,这样可以有效降低意外泄漏的风险。培养基准备室需要洁净的环境,所以需要单独的一间房。与此房间相连的是一个储藏室,放置有储存化学品和其他物质的冰箱、冷藏箱。这间储藏室也可以用一个4℃的冷库代替。如果打算建造一间这样的冷库,需要采取措施避免建筑物墙壁结构压缩,尤其是在温暖潮湿的地区。只有预制并与建筑物的承重结构分离的冷库才是可以使用的。同时,如有需要冷库应该可以很快得到快捷的维护服务,而且应该有几台冰箱作为备用。

这种设计(附件12)的缺点是,如果想要进入冷库,一个人就必须先穿过培养基准备室。在这个设计中,培养基准备室是与其他区域分开的。这个区域还可以作为已灭菌玻璃器皿和物件的储存室。在灭菌区设计一个窗口可以方便

从此处传递已灭菌物品。比邻灭菌区的储藏室是存放未灭菌物品和从外运入的未拆封物品的区域。这些物品在进入实验区前需要经过灭菌处理。灭菌后的物品在实验区再打开。

如果建筑条件允许，比较理想的设计是将不同房间或区域之间的隔断上部设计成坚固但透明的样子。这样工作人员可以互相看见。当发生紧急情况时，可以迅速作出反应实行救助。

设计实验室时还可以空出一间备用的房间，可以为将来的发展提供空间。还可以准备一间专门用来存放清洁用品的房间，防止实验区的清洁用品被用到以外的区域。在实验区的入口，应该有工作人员清洁和更衣的地方，提供洗手池、干手机和衣橱。

4 通风

为了避免高温可能造成的影响，达喀尔的实验室将附属的房间，如储藏室，设计在建筑物外并且窗口较小；而所有的工作区以及工作人员所在区域，都设计在建筑物内部，并且窗口开得很大。这时需要提供遮阳物，以免由于阳光直射而造成屋内温度过高。如果设计双层的屋顶（外层屋顶加一个天花板），可以形成一个通风层，也可以防止房内过热。房间内仍然安装了空调以使工作人员尽量舒适，但这可能意味着难以负担的另一笔开销。并且在实验室空气流动是要受严格控制的，要保证空调的气流是从洁净区往污染区流动。

理想的工作环境应该配有一套气流平衡系统。洁净的空气从外界进入洁净区，从生物安全柜或其他污染区排除。这样可以保证从洁净区往污染区持续稳定的气流。

但是这种复杂的技术在很多国家可能难以获得。这需要生物安全柜的持续运作，而在热带地区将外面的空气冷却也是较大的开销。反之，在低温地区将外界空气加热也一样。将过滤后的空气进行循环可以很好的解决这个问题，但是这又可能增加实验室感染的风险。因此安全柜内的空气最好经过屋顶排出。如果降温是必须的，注意将空调扇安放在远离敏感的工作区域的地方，如生物安全柜。在灭菌锅上方，可以安装玻璃或钢质的排气管道，将灭菌产生的蒸汽和气味排除室外。

5. 安装和仪器的要求

在开始施工的时候，建筑师对整个实验室内容纳的设备应该心里有数，是否需要电源和水源。有些设备是很大的，如生物安全柜和高压灭菌锅，所以必须让建筑师了解以便设计施工时留出足够的空间。因此应该尽快联系供货商，了解相应设备的尺寸、电源要求及其他的相关参数。

应该优先考虑有本地代理商并可以提供维护服务的厂商。在决定购买某件设备前，必须确定其是有质量保证的。

表V.4列出了实验室的一些参数，以便于在实验室最重要的地方安装一些最关键的仪器设备。

表V.4 参比实验室最低技术要求参数

区域	最低技术要求参数
标本接收区	实验台，自来水，水池，数个220V/单相电源
镜检区	实验台，自来水，水池，数个220V/单相电源，丁烷
培养区	实验台，自来水，水池，数个220V/单相电源，丁烷
灭菌区	实验台，自来水，两个大水池，排气管道，数个220V/单相电源，380V/三相电源（灭菌锅），丁烷
培养基准备室	实验台，自来水，水池，数个220V/单相电源，丁烷，加热炉
荧光镜检室	避光，实验台，220V/单相电源
冷库 4℃	冰箱配备的数个220V/单相电源，或是温度可控的单独房间，架子
孵育室 37℃	温度控制，室外读温度和记录，架子
储藏区	架子
气体储存室	通向外面的通道

C. 国家结核病参比实验室的建筑

1. 与公共卫生部门的协作

让国家参比实验室处于国家公共卫生行政部门的管理下是很重要的。在最高管理层之间应建立经常的联系。应该由公共卫生服务的一位高级官员负责与公共服务行政部门的联络，当有重大问题发生时，能够及时得到反馈和解决。

负责公共卫生的政治机构应该很清楚的了解国家参比实验室的必要性，并在实验室建设的初期就参与讨论并赞同对其职责和功能的设定。还必须认识到实验室基本宗旨的设立可能存在专业的不同反对意见，但无论如何不能偏离参比实验室的基本职责。

一旦决定了实验室的选址，在详细计划前，必须从最高当局获得这块土地的使用方法作出书面担保。当施工已经开始后，这个决定就不能再做任何修改了。

同时应该清楚有关法规上需要上缴的关税和其他费用。如果这个项目的某些费用可以得到豁免，那么应该有书面证明。从国外进口仪器设备也应考虑相同的问题。如果可以通过其他的方式付与税款（如部门间的转帐），从而得到免税，那么相关的操作机制和相应的职责必须清楚的列出。在开始预算整体造价时就将税钱考虑进去会更加简便且提高效率。

2. 建立项目工作小组

建立项目工作小组对整个项目的实施起决定性作用，无论这个项目是全由国家负担或有其他的资助者。但是要给出组建工作小组的指南及成员构成是比较困难的，这要视当地的特定情况而定。任何情况下，都应清楚需要哪些当地的专家，而又需要从其他地方请来哪些专家参与。在某些项目中请一个或多个国际组织的参与也是可以的。如果项目接收了外部捐助，那么请求捐助方派遣捐助国家的建筑专家参与应该能发挥很好的作用。

在达喀尔的参比实验室，一位来自捐助国的建筑师和国际防务联盟派遣的专家，联合起草了实验室的建筑方案。塞内加尔当局和当地的私人公司也派遣了一些专家参与。在这个例子中，各方合作愉快，但仍然需要再强调一次，组建项目小组时必须考虑项目整体的框架结构。

当地的监督人员，应该是一个技术娴熟的人（建筑师，工程师或有经验的建筑工人），他由建筑商雇佣，在整个施工过程中起关键作用。监督人员的职责是监督整个施工的进程，并保证施工是按照设计图纸进行的。

3. 项目文件

最开始时应咨询当地的专业建筑商通常需要准备哪些文件。文件包括建筑施工计划、技术参数和数量测量。在很大程度上，文件覆盖范围取决于合同的形式和企业的策略选择。

无论是选择公开招标或封闭投标，征求报价或其他运作模式，对文件的一般要求是：

- 选址草图 比例1：200
- 各层平面图 比例1：50 (1：100)

横截图	比例1: 50 (1: 100)
立式图	比例1: 50 (1: 100)
重要细节	比例1: 20 (或其他合适比例)

要注意比例图不能太小，因为后面可能要做零星的修改。一般来说，设计图纸的人与要建实验室的地区在地理和文化上隔得越远，那么需要做出的图文越详细，说明也越多。

技术参数应该尽量详尽。整个施工中各个独立进行的部分应该文字表明。从初步价格预算和合同的角度考虑，对建筑和运输材料的各个方面最好都给出数量的描述。一张铺开式的电脑报表形式作为技术参数的基础，这样可以很方便的将物件与数量联系，并便于计算造价。当然，对于技术说明需要特殊的计划安排和程序规定，但可能每个国家都有自己的特殊的规定，因此并没有完全适用的方法。

建筑商与建筑经理和施工负责人详细讨论设计的每个细节是很关键的，这样双方都明白哪些参数是重要不能变更的，避免了产生误解。

4. 招标和合同

选择什么样的合同形式和企业合作方式与当地建筑业结合很重要。在市场经济的国家，应该采取招标的形式。将项目进行公示然后各个公司报出自己的价格，或以封闭形式在一选定的范围内再根据各公司的报价进行选择。在没有市场经济的国家，可以选择声誉较好的公司就特定的工作在价格上达成一致。在某些国家，政府有专门的公共的或半国营机构进行这类的项目。在这种情况下，造价变得不是那么重要。但仍要在合同中包括各种要求如工程质量及进展时间表，这与同私营企业协商合作时是一样的。

在与企业签订合同之前，要先确定其是否有相关书面资质。这同时是就技术质量及能力和经济实力而言，在公开招标中这点尤其重要。如果需要征求报价，那么应该由一名熟悉当地情况的人列出邀请参与的公司名单。

施工各项进度计划应该在签订合同前就已拟好。对于进度的详细要求及每一个参与者所负的职责都应注明。对进度的违约应该以日违约金的形式给予特定说明。对工程进度的要求不应仅仅给出最后的期限，而应给出清晰的阶段性目标。

已付款在任何时候都不应超过已完成工作应付款的85%。换言之，企业可以提出相应金额的银行保证。

5. 项目管理

前面已经强调了选择一位在当地有经验的建筑商的重要性，同样重要的在这个人 and 施工负责人/项目管理人员之间有良好的沟通。可以通过定期的书面报告已完成的任务量来监督施工的进展，并以百分比的形式呈现已完成的各项工程量。报告中至少每个月要有一次图片说明。施工负责人/项目管理人员在施工期间最好去施工现场进行几次视察，非正式的与直接施工负责人/项目管理人员电话联系也可以起到一定作用。

参与项目的各方应该每14天举行一次例会，以确认工程的进度及解决出现的问题。会议备忘录应该包括最后作出的结论，每个与会者人手一份。

当地的施工负责人应该保留一份简单的反映建筑进度的已付款的签署记录，并附在阶段性报告后一起上报。

重要的决定或重大问题应马上与施工负责人/项目管理人员一起协商。

额外的工作或变更应该先与建筑商及施工负责人说明，并在费用上事先取得一致。

6. 验收交接

将近验收日期时，建筑商必须及时安排一个初步的检查，必须将初步检查发现的偏差和缺陷登记记录。然后通过协商确定一个改正的最后期限，比如14天以内。在所有偏差和缺陷都改正了之后就可以进行交接了。需要注意的是在正式交接之前，整个建筑不要投入使用。如果某些缺陷无法进行改正了，那么应该得到经济补偿。

施工负责人在交接后必须将保险费取出。

如果国家没有法律明文规定，在签订合同时应该加入一个试运行保证期。试运行保证期至少为一年。

在不同国家建设实验室的费用可能差别很大，在表V.5中给出了建造一个独立参比实验室和两栋行政楼所需的大致费用。数据来源于1994年塞内加尔达喀尔建设实验室时数据。单是建设实验室的费用大概占总费用的33%。

表V.5 建造一个独立参比实验室和两栋行政楼所需的大致费用。1994年，塞内加尔达喀尔。单是建设实验室的费用大概占总费用的33%。

工程种类	欧元	欧元/m ²
建筑施工	147,500	218
孵育室	5,430	
电气装置	65,200	97
空调/制冷系统	15,500	
下水管道/管道系统	4,660	7
外部：栅栏，门，墙	12,420	
外部：公路，水泥地面，辅助设施	63,630	
电话/电力连线	5,660	
结构工程	10,090	15
总造价	330,090	487

D 基层痰涂片镜检实验室的物资管理

国家参比实验室必须紧密配合国家结核病规划的实施，保证基层痰检实验室每一段时间都有充足的物资使涂片镜检工作不间断。进口的物品通常经由海运故从发订单、组装、发货，到最后接收，往往需要超过6个月的时间。在下订单的时候，必须要记得将这个时间考虑进去。还有一点必需注意，不仅要保证各层实验室有足够的物品进行日常工作，还要有足够的储备物资。

国家参比实验室除了需要配有一般镜检所需物资外，还额外需要进行培养和药敏所需的物资。这些物品在采购时需要专业意见的指导。

1. 基层痰涂片实验室需要的物品

为了保障物资供应的顺畅，结核病控制规划必须合理的作出预算。如果不能得到所需做的抗酸菌涂片的准确数量，那么就只能参考病人数目作出决定。登记和报告系统必须及时的上报这些信息。

如果最近需做的抗酸菌涂片数量可以得到，那么就可以直接以此为基础做出预算。否则，需要根据以往观察到的在疑似患者中发现的结核病人所占的比例进行计算。这个比例可能在不同国家变化很大。从结核病实验室登记本可以相对容易地得到这个数据。如果这个数据也不能得到，那么国际防痨联盟推荐了一个使用的比例是10%。但是，在贝宁（32%）、马拉维（17%）、尼加拉瓜（5%）、塞内加尔（19%）和坦桑尼亚（19%）的研究表明，使用这个推荐比例时要慎重，如在尼加拉瓜对需求严重低估。

为了给这个实验室所需物资计算方法一个形象的说明，这里假设在疑似患者中发现的涂阳病人比例为15%。另一个前提假设是每个疑似患者要进行三次痰涂片检查，随访还需要三次检查。由此计算出每检查出一个涂阳病人需要的涂片数是： $(1/0.15) * 3 + 3 = 23$ 。因此登记报告一个涂阳结核病人所需的耗材和试剂相当于涂一张片所需的23倍。其他仪器设备的预算要简单一些，如显微镜、酒精灯、接种环、片盒等，可以参考痰检实验室的总数目来计算，计算时考虑其使用寿命及可能作为其他工作的需要就可以了。基于同样的考虑，在订购高质量镜油时，应该按照所需量的2~3倍订购。这样可以保证结核病控制规划中显微镜都是使用最好的镜油，可以延长显微镜使用时间。需要再次强调的是，当地如果可以提供现成的木质或竹质的涂抹棒，那么应该比接种环更优先考虑。

在上面的示例中，对应于每登记一个涂阳病例必须订购23张涂片和23个痰瓶。碱性品红、亚甲基蓝、甲醇和苯酚的量必须根据使用的方法来计算，预计每张涂片所需的试剂大约是每种5mL。硫酸和酒精只需要化学纯就可以得到理想的结果。但是碱性品红和苯酚需要较高的质量。

实施时比较有效的方法是要求最基层的实验室上交一份关于库存的物品和已进行了的涂片的平衡报告。这些信息可以存入统一的电子表格，作为分发物资时计算所需数量的依据。如果这些数据是由需求方人员计算出来的，那么分发人员无论如何应该进行一次核对，因为用于计算需求的表格填写往往是有误差的。附件3所示是一份基层实验室的报告表格，包括已经做了的涂片数，已配制的染液量和储存的必需物资。在中级实验室，因为需要配制染液，表格包括的内容更详细，包括准备染液所需的各种化学品。附件13所示是中级实验室使用耗材需求的表格，最好由国家结核病规划设计成电子表格的形式并分发。为了最好的保障各级实验室的物资储备供应，重要的是通过调查区域水平实验室的实际的所余物资储备情况来得出一个收支结余，此时不考虑加进更基层的实验室的物资储备情况。

E. 国家参比实验室的物资供应

参比实验室可以看作是五个部分组成的。这五个部分不需要在物理上隔成分割的房间，但在安排整个实验室的工作任务时需要基于这个概念。

参比实验室必须至少具备一些最基本的设备，否则无法正常进行工作。

必须的设备在这里做了简单介绍。一份更详备的清单及估计成本可以参考表V.6。

1. 镜检部分

亮视野双目显微镜至少需配备三台，与实验室网络中用的是同一品牌。这样人员接受培训可以很好的适应以后在现场时的使用，也可以方便参比实验室的技术员完全熟悉基层使用的设备。当学员们看到在参比实验室使用的显微镜跟他们使用的是一样的时候，在心理上也会产生积极的重要影响。

教学用多目显微镜的应用是有限的。刚开始展示高级别阳性涂片中的抗酸杆菌时不需要教学显微镜，而随后学员自己练习观察混杂的阴性阳性涂片时这样做对于教员来说又太耗费时间。比较可行的方法是当学员在一个标本中发现阳性结果时，由教员及时的进行鉴定；如果学员认为一个标本是阴性的，那么最后应该由教员根据已知的对照表判定。为了适应常规涂片工作量较大的实验室工作，进行荧光染色镜检也是必要的。

2. 培养基的制备部分

为减小被污染的风险，制备培养基可以在一个层流通风橱（不是生物安全柜因此不能够为操作者提供保护）中进行。

搅拌含鸡蛋培养基时可以使用搅拌器。但为了最大的减小气泡和泡沫的产生，可以用加入大块玻璃珠或石弹子然后振荡的方式代替。

为了称量所需的各种微量试剂，需要一个电子天平(量程300g,灵敏度1mg)。

表V.6 国家结核病参比实验室所需设备

仪器的价格可能会随不同的供应商和时间而变化，下表提供了建设一个国家参比实验室大致需要的首次投资。（单位：欧元）

工作内容	物品	单位	单价	总价
镜检	荧光显微镜	1	5,714	5714
	教学显微镜	1	2,571	2,571
	光学显微镜	3	1,905	5,714
	本生灯, 汽油	3	12	37
	60L的干燥箱	2	1,219	2,438
	汞灯	2	114	228
制备培养基	2速搅拌机	1	381	381
	凝固器, 可选	2	3,048	6,095
	层流通风橱	1	6,571	6,571
	电子天平	1	286	286
	可加热的磁力搅拌器	1	286	286
	涡旋振荡器	1	190	190

表V.6 国家结核病参比实验室所需设备 (续)

工作内容	物品	单位	单价	总价
	蒸馏器, 8L/小时	1	3,810	3,810
	移液注射器	5	194	969
	用于分装培养基的带夹虹吸管	3	5	14
储藏	大型冷库 (2.0m*0.6m*0.6m)	2	3,619	7,238
	冰箱, 3门	1	2,571	2,571
	麦氏瓶托盘	20	29	571
	广口瓶托盘	30	29	857
	存放接种环和标记笔	3	50	150
	干燥器	2	139	278
	温度计	2	5	10
培养	生物安全柜, ClassII, B2型, 备用HEPA滤膜, 气流仪	2	10,476	20,952
	冷冻离心机, 4个桶, 配有盖	2	4,762	9,524
	本生灯	3	12	37
	双臂天平, 210g	1	171	171
	60L 干燥箱	1	1,219	1,219
	涡旋振荡器	2	190	381
	计时器	2	20	40
	分装机	2	190	381
	滚轮推车	3	381	1,143
高压灭菌	垂直载入高压灭菌锅	2	23,810	47,619
	烤箱	1	1,714	1,714
	不锈钢桶	10	67	667
	枪头盒	5	20	100
	不锈钢弃物桶, 上方有通气空	4	5	19
	涡旋振荡器	1	190	190
	试管刷	1	11,429	11,429
	110L 烤箱	1	1,181	1,181
总计			88,585	143,750

推荐使用连续移液注射器设备定量分装培养基至统一的容器。为增加机器的使用寿命, 使用后系统的清洁维护是非常必要的。有些实验室使用容易

清洁，宽的玻璃量管，使每个刻度等级都为5ml，用柔韧的管形材料和摩式（Mohr）瓶口夹来分装培养基。如果实验室大量生产培养基，使用电动分装机较好。

制备培养基的各种试剂时需要准备热金属板磁性搅拌器和多种型号磁棒。

蒸馏水，在实验室必备，最好用蒸馏器制备，每小时可产生4L至8L。2到3个容量50L至60L聚乙烯的蓄水瓶可以储备蒸馏水，以备水源不足或电力不足。去离子水是决不能用的，它会导致腐生分枝杆菌生长并腐蚀所有装置。

另外用于普通容器中的培养基凝固并呈斜面的凝固器也是培养基制备所需的设备。当订购凝固器时，要注意适合它的培养瓶，因为某些型号可以用通用的瓶子或者麦氏瓶，而有些只能用培养瓶。作为凝固器的替代物，一个有精确温度控制的带有风扇运转的热烤箱也可以，尽管这可能造成批次间的不均一。

3. 存储部分

必要的装备应该包括：冷柜，冰箱，托盘，金属架子。多数化学物品不用冷藏储存，但新鲜配制的培养基需要冷藏保鲜。菌种和标准菌株至少需要在-40℃或以下冷冻保存。

应具备放置麦氏瓶（7ml和14ml）和广口瓶（28ml）的架子。

一些化学药品和抗生素需要储藏在干燥器中，无水硅酸凝胶体为可重复用干燥剂。

4. 培养处理部分

当参比实验室处理结核菌培养物时会增加结核菌传染危险性。尤其在混悬时，因为操作过程中有潜在产生气溶胶的危险。因此，处理培养物时必须在生物安全柜内进行（详见后续说明）。

为培养的标本准备一个高质量的离心机是最基本的。离心桶必须是安全类型，有独立的盖子，在安全柜里才可以打开。

需要一台机械双臂天平以称量制备培养基的各种组分。天平称量范围应不少于200克，灵敏度0.1克足够。

有两种方式孵育培养基，一种是使用一组孵育箱。这是当需要设定不同的温度来达到想要的孵育效果。国家结核病参比实验室对分离结核分枝杆菌复合群为主要关注。温度持续在37℃孵育已足够。如果有一个额外的兴趣鉴定37℃以外温度下生长较好的分枝杆菌。要各有一个高低温度的孵育器要具备大约

200L的容量。因此，最方便实际的解决办法就是在一个专用房间内保持恒温，在入口以外的三面墙摆放架子。这样可以方便工作，根据培养周期，每周按号码轻松挪动。用架子是其中一种方法，制造一种在折叠推车上适合放培养管的管架，足够放每周接种的培养管，这对工作量大的实验室很实用。

5. 灭菌部分

在培养基清洗和丢弃之前，必须要高压灭活培养基上生长的分枝杆菌，细菌，酵母。根据高压灭菌器装置的性能，至少要准备两个高压灭菌器，允许分“脏的”和“干净的”物质来灭菌。脏的东西包括需要消毒的分枝杆菌培养物。干净的东西包括试剂和没被污染的物质。用高压芽孢，随后在适当的培养基上接种，以此来定期检验高压灭菌器的灭菌性能。建议使用天然气或煤气炉加热的大的压力锅式灭菌器作为灭菌器出现问题或断电时的备用设备。一个具备适当的刷子的玻璃品清洗机使玻璃器具的清洁工作变的很容易。洗涤之前在浓的去污剂里浸泡三至四天，可以有效的去除培养瓶中普通罗氏培养基。

一个热烤箱对玻璃器具的清洁消毒是非常有益的。

参比实验室内的玻璃器具

玻璃器具广泛在医学实验室使用，因此必须熟悉国家参比实验室应用的常用和基本的玻璃器具。

实验室在常规工作中推荐使用硼硅酸盐玻璃(硬玻璃)的玻璃器具，因为它可以抵抗化学药品的腐蚀，抗热，还能经受反复高压。

玻璃器具在地方的医用商店可以采购到，但是更多时候是在海外专供实验室使用的公司购买。在此情况下，负责订购实验室耗材的人员应该：

- 正确的计划和采购
- 每隔六个月准备定期采购，这是维持实验室运转可靠性和平稳的基本条件。
- 使用正确的目录序号，并有采购产品的相应的说明和描述
- 确认这些玻璃器具确实是相关的，并适合结核病参比实验室使用
- 确保采购产品的花费在可利用的资源范围内。

表V.7总结了实验室基本玻璃器具清单。

表 V. 7. 国家结核病参比实验室推荐玻璃器皿的描述及使用

瓶子，通用的。广口的，非常结实的玻璃瓶，装有一个铝质螺旋盖和橡胶垫圈，容量 28mL。通用瓶用于收集和转送痰标本以及培养基的制备
McCarteny 瓶。玻璃的，带铝质螺旋盖和 3 mm 橡胶垫圈，7mL 和 14 mL 的容量，Bijou 瓶用于细菌悬液的匀浆以及当瓶中装有 L-J 培养基时储存分支杆菌的培养物，因为它们方便，节省空间以便长期保存。
Winchester 瓶。玻璃，窄口，带铝质螺旋盖和橡胶垫圈，装染料和化学试剂，容量 150mL-2500mL。Winchester 瓶主要用于装 L-J 培养基的盐类物质以及其它化学试剂。
烧杯，硼化硅。硼化硅大容量带嘴烧杯，厚边，一般实验室使用。
量筒，带刻度，带嘴。硼化硅玻璃，刻度容积从 10 mL 到 2000 mL。一般实验室使用。
烧瓶，硼化硅，大容量。大容量烧瓶，埃伦美厄，窄颈，容量从 50mL 到 5000mL，一般实验室使用。
烧瓶，测量体积的。刻度体积为 25mL，100mL，500mL，一般实验室使用。
漏斗，过滤用。从 50 mL 到 2000 mL 各种刻度，用于过滤染料，象金胺 O，石炭酸复红以及美兰。
移液管，测量体积的。1 mL 移液管按 1/100 mL 划分刻度，5 mL 移液管按 1/10mL 划分刻度，10 mL 移液管按 1/10 mL 划分刻度。在准备药敏试验以及接种细菌悬液时，这些移液管用于滴定含药溶液。
显微镜用载物玻片。双毛面（载物玻片的一端两面磨砂）超高级的 27×75 mm，厚 1.0 mm 到 1.2 mm，热压制，尽管存在其它种载物玻片（也许价钱便宜），但这是较好的，因为可用绘图铅笔而不需要价格昂贵的钻石刻刀标记载物玻片，热压（每个载物玻片之间放一章纸）防止载物玻片粘在一起。

表V.7.(续)

项目	包装	价格 (欧元)
瓶装 普通	144/pk	110
瓶装McCartney: 7 mL	144/pk	101
14ml	144/pk	103
玻璃珠	1Kg	21
瓶装Winchester		
烧杯	1 No	10
量筒	1 No	20
烧瓶, 大的	1 No	10
烧瓶, 测量体积的	1 No	5
试管	500/pk	48
漏斗	1 No	3
吸液管, 测定体积的: 1 mL	50/pk	16
5 mL	50/pk	25
10 mL	50/pk	26
吸液管, 一次性	500/pk	12
接种环 一次性	4,000/pk	63
玻片	72/盒	7
合计		579

参比实验室培养和药物敏感性试验的物品供应

参比实验室的需求不可能简单的根据所报告病例的数量计算需求, 因为所处理的标本的数量实验室之间差别很大。同样的, 对药敏试验供给的需求不能直接由报告的病例数计算。表V.8.提供了所需材料和试剂的小结和大概费用。

表V.8. 参比实验室使用的试剂

项目	单位数量	价格 (欧元)
荧光显微镜镜检		
金胺	50g	11
苯酚结晶	1000ml	38
95%乙醇	1000ml	2
高锰酸钾	100g	33
盐酸 (浓度37%)	1000ml	10
氯化钠	5000g	42
萋-尼式抗酸染色		
碱性复红	500g	267
95%乙醇	1000ml	2
苯酚结晶	1000ml	38
硫酸, 浓度至少为95%	2500ml	55
亚甲基兰	500g	225
过氧化氢酶试验		
过氧化氢 30% p. a	1000ml	50
吐温 80	500ml	30
去污染-petroff 方法		
氢氧化钠	2000g	18
磷酸盐缓冲液 0.067M PH 为 6.8 和 7.0		
无水磷酸氢二钠	2500g	90
磷酸二氢钾	1000g	60
IUTM 培养基		
磷酸二氢钾	2500g	43
硫酸镁	1000g	23
L-天门冬酰胺	1000g	167

表V.8.参比实验室使用的试剂 (续)

项目	单位数量	价格 (欧元)
柠檬酸镁	100g	15
孔雀绿	2500g	786
甘油	100ml	2
酸性缓冲培养基中的附加成分		
磷酸二氢钾	250g	可变
谷氨酸钠	1000g	可变
Stonebrink培养基的附加成分		
丙酮酸钠	250g	131
对硝基-苯酸培养基的附加成分		
对硝基苯酸	500g	38
盐酸溶液 1N	1000ml	1
氢氧化钠溶液 1N	1000ml	1
药敏试验药物		
利福平	5g	217
二氢链霉素	25g	19
异烟肼	100g	33
二氯化乙胺丁醇	25g	33
二甲基亚砷	1000ml	40
硝酸盐还原试验		
磷酸氢二钠	500g	8
磷酸氢二钾	1000g	19
硝酸钠	500g	29
盐酸 浓度 37%	1000ml	6
磺胺	100g	14
N-奈基-乙烯二胺盐酸盐	5g	15
锌粉	100g	17
清洁瓶子用去污剂	200kg	71
结核分枝杆菌消毒剂		
5%含苯酚消毒剂	5L	15

F. 实验室中特殊的生物安全考虑

结核分枝杆菌的传播主要由形成微小的浮游滴核造成，就是直径大于 $1\mu\text{m}$ 、小于 $10\mu\text{m}$ 的含有结核杆菌的滴核，微滴核很小足以达到支气管，同时又很大能够粘附到支气管细胞系，而不是无效地悬浮于支气管的气道中。

在实验室中，感染控制一定要针对降低空气传播。不同的处理步骤造成明显不同程度的空气传播危险性，该危险性的大小取决于气溶胶的程度及操作过程中产生感染微粒的数量。

1. 样本的收集

在很多国家，疑似结核病人直接到实验室并被告知如何留取痰标本以及随后的痰标本收集。这是一个合理的有效的办法，因为这样将指导留取标本的人员限制到最了解需要何种标本的人员。同时，这样亦使实验室技术人员暴露于一个潜在的较很多其他健康服务人员获得结核感染危险性高的环境。因为他们需要每天经常与未治疗的传染性结核病人进行交流。但是又因为实验室的工作人员知道结核可疑病人所留取的痰标本阳性的可能性是很高的（真实值可从实验室的记录计算出来），因此会格外地小心能够大大地降低危险性。首先，教病人如何留取标本前，实验室的技术人员必须要指导病人掩住嘴咳嗽。第二，一定要在实验室的建筑物外面留取痰标本，如果气候准许，最好完全在户外，允许微小浮滴经过必要的稀释同时直接暴露在阳光的紫外线照射下。

2. 涂片的准备

打开痰瓶，制备痰涂片也许会产生微小气浮滴，与未加保护的咳嗽所产生的相比，来自这个过程的传播危险性可小至忽略。流行病学未证实仅制备涂片与任何可评估的额外的获得性结核菌危险性相关。这样在基层实验室仅完成涂片镜检，生物安全柜不是必需的。

3. 处理结核分枝杆菌水溶性悬液

在对培养物作分枝杆菌鉴定实验和药物敏感试验中，参比实验室一定要处理结核分枝杆菌的水溶性悬液，生长在纯的培养基上的结核分枝杆菌的数量是

巨大的，当处理上述悬液时，所产生的微浮滴很可能包含大量的结核杆菌。因此，这样的工作一定要在生物安全柜中完成。生物安全柜可分成三级，I级，II级，III级。

I级生物安全柜提供人员和环境的保护，但是没有对实验物品的保护。未经过滤的空气流经工作台面，只要保持前开窗向内气流最低速度为每分钟 25 米即可提供人员的防护。I级生物安全柜通过硬质的导管联接于建筑物的排放系统，建筑物的排气扇产生负压抽吸房间的空气进入安全柜。安全柜的空气通过一个高效的颗粒空气滤器（HEPA）被抽吸进通风排放系统。HEPA过滤器有效地捕获颗粒和传染性物质，但对挥发性化学物质和气体无效。一台双层 HEPA过滤器可以被安装在排放系统的终端。基本上，I级生物安全柜足以处理参比实验室的结核分支杆菌水性悬液。

如果除了需要环境保护和试验人员的保护外，还需要对实验物品进行保护，则需要II级生物安全柜。B型II级生物安全柜可以将气体排到建筑物之外，在这个级别中是最好的。

低收入国家对安全柜进行定期的认证和维护，更换HEPA是最困难的，如果没有这些，滤膜会发生阻塞，早晚会将结核分支杆菌的颗粒吹向试验人员。正因为如此，如果不能保证定期的维护，采用无滤膜的I级生物安全柜，但要保证排气管道远高于建筑物，这或许是最安全的选择。

4. 传染性废物的处理

每个实验室，无论是基层实验室或国家实验室，应该有能力焚烧传染性废弃物（用过的痰瓶，涂片用的小棍等）。在参比实验室，使用过的培养瓶在清洗前应该高压灭菌。从参比实验室排出的传染性废物在焚烧前总是要高压消毒的。

G. 结核分枝杆菌复合群培养物安全运输的国际要求

在结核病参比实验室中，对于药物敏感试验的外部质量控制，培养物得与跨国参比实验室进行交换。结核分枝杆菌的培养物富含传染性物质，（包含了大量的活性微生物），能够引起人类的疾病。当运输耐药菌株时，危险性就复杂了。

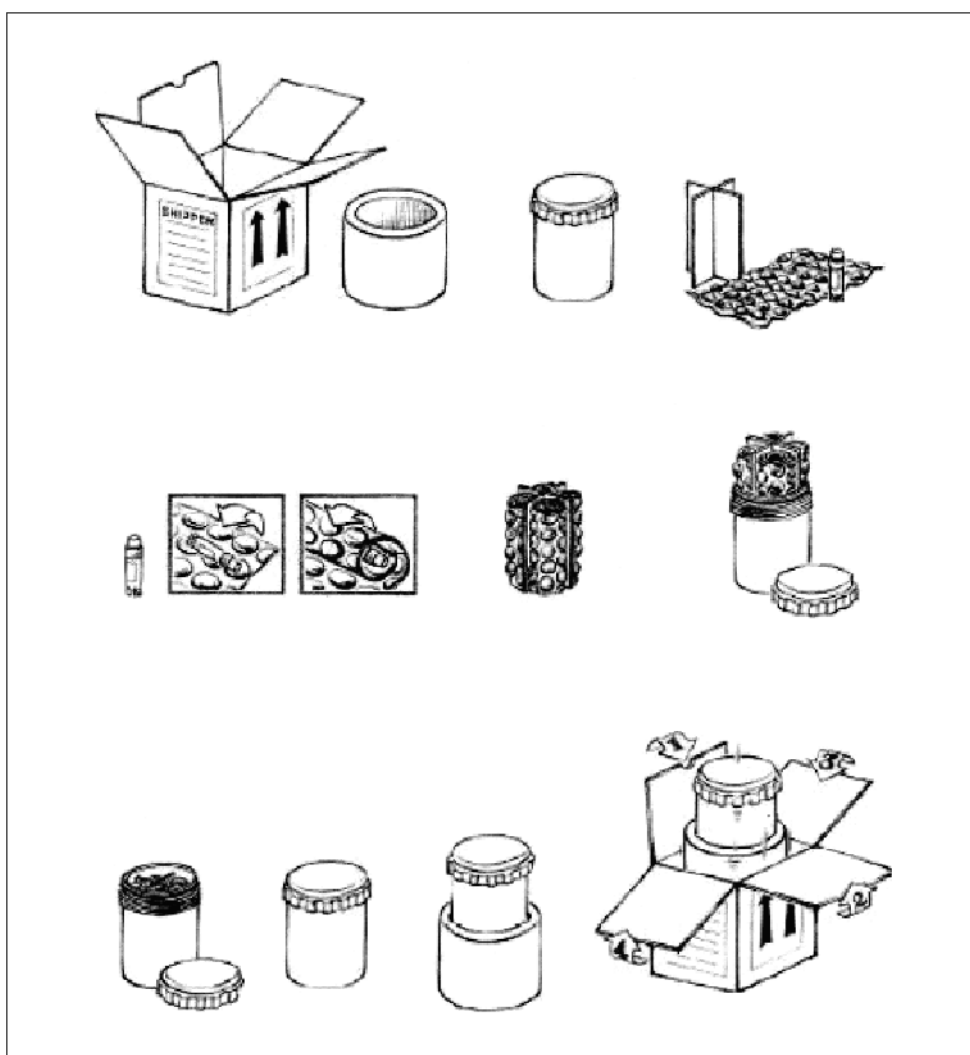
一些国际组织，例如：国际邮政联盟，国际民航组织，以及国际航空运输

协会，制定了安全运输感染性物质的规章制度，同时确保运输人和公众的安全性。这些组织还制定了一些概念以及包装和标记的要求。并同时从发送和接受国家的授权机构获得许可。

感染性物质和很可能包含感染性物质的诊断标本，要求根据联合国推荐的UN 6-2/02标准包装材料进行三层包装。不应该运输佩里特培养盘。分枝杆菌培养物应该在带螺旋盖的固体培养基试管中运输，或冻干在小瓶中作为第一层防水的包装。运输最方便的方式是用1.5ml液体培养基保存分枝杆菌悬液并装在2ml冷冻管中邮寄。第一层的包装应该完全由至少2cm厚的吸水材料包裹，并且密封于第二层的耐用防水容器中（图V.1）。薄棉纸或纤维素填塞在第二层包装中以充分吸收发生泄漏的液体。如果所有的第一层包装中的物质总容量不超过50ml，并且他们之间不互相接触，几个第一层包装也可装在一个第二层容器中。每一套一层和二层容器均应该承装在一个皱纤维板制成的外层运输箱中，纸板、木板或其他相同强度的材料也可。

申请表格的一份复印件，书信以及其它用以鉴定和描述样本信息的材料均应该贴附在二层容器的外面。另外一份复印件应该通过航空信件送到接收的实验室，第三份复印件应保留在发送者手里。除了发送者和接收者的地址，电话号码也应该写在外包装上。确保生物安全标志完好无损，清晰可见。

遵守运输的要求是托运人的责任，托运人一定要熟悉规则，不遵守规则会引起罚款或其它的惩罚。国际航空运输中严禁手提携带感染物质，比如外交邮袋。



图V.1 国际安全运输结核杆菌的包装标准

参考文献：

1. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Primary containment for biohazards: selection, installation and use of biological safety cabinets. U.S. Department of Health and Human Services, ed. Washington, DC, USA: US Government Printing Office, 2000.
2. Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. Second edition. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997.

3. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
4. World Health Organization. Guidelines for the surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/2003.320:1-21. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.

第六章

附件

- 附件1 痰涂片镜检申请和报告单
- 附件2 痰涂片镜检实验室登记本
- 附件3 基层实验室痰涂片镜检的报告表格、库存情况
- 附件4 痰涂片镜检批量测试表格（涂片由参比实验室下发到基层实验室）
- 附件5 痰涂片镜检盲法复检表格（涂片由基层实验室上送到参比实验室）
- 附件6 以区域为单位复检结果的汇总报告
- 附件7 原始培养实验室登记本
- 附件8 菌种鉴定和药敏试验登记本
- 附件9 痰培养实验室申请单及报告单
- 附件10 药敏试验结果汇总报告格式
- 附件11 基层痰检实验室设计
- 附件12 国家结核病参比实验室的设计和计划
 - 图1 计划A 地点和位置计划
 - 图2 计划B 结核病参比实验室四周图
 - 图3 计划C 结核病参比实验室详细布局
 - 图4 实验室气流控制示意图
- 附件13 以区域为单位痰涂片镜检耗材的报告和申请表格

附件1. 痰涂片镜检申请和报告单

痰涂片镜检申请

完成结果的化验单应及时送至送检单位（治疗机构）

送检单位*_____

病人管理单位：_____

日期：_____ 送检单位（人）：_____

病人姓名：_____ 年龄：_____ 性别：男____女____

详细地址：_____

检查原因： 诊断_____ 随访：_____

治疗月数：_____ 结核病人登记本号†：_____

患病部位：肺结核 肺外结核 （部位）_____

随此申请单运送的标本数量：_____

第一份标本留取时间：_____

收集标本的工作人员姓名及签名：_____

* 包括所有公立和私立医疗机构

†治疗期间的随访病人必须要填写结核病人登记本上的号

结果（由实验室人员负责填写）

实验室序号：_____

收集日期	标本	肉眼观标本性状†	结 果				
			阴性	低级别(+) (1-9)	(+)	(++)	(+++)
	1						
	2						
	3						

†(B):血痰; (M):脓性痰; (S)唾液

日期：_____ 检验员_____ 签名：_____

附件3. 基层实验室涂片镜检工作状况及耗材库存表

季度报表

季度/年份_____

抗酸菌实验室工作状况及库存

诊断中心_____ 地区_____ 区域_____

已检查的涂片	阳性	阴性	1—9/100 视野	合计
本季度检查的可疑者涂片张数				
本季度检查的随访涂片张数				
合计总涂片数				

本季度末库存量			
石碳酸复红溶液	_____毫升	脱色剂	_____毫升
亚甲基兰	_____毫升	加热用的酒精	_____毫升
镜油	_____毫升	玻片	_____片
		痰盒	_____个

附件4. 痰涂片镜检批量测试所用表格（参比实验室下发痰涂片至基层实验室）

区域*：_____ 地区：_____ 诊断中心实验室代号：_____

实验室镜检人员姓名：_____

参比实验室下发痰涂片日期：_____ / _____ / _____

基层实验室镜检痰涂片日期：_____ / _____ / _____

检查结果：

痰涂片编号	参比实验室镜检结果	基层实验室镜检结果
A		
B		
C		
D		
E		
F		
G		
H		
I		
K		

如何报告结果：

检查抗酸杆菌并按照以下方式报告结果

发现	报告（在上表中）
无抗酸杆菌 每 100 个油镜视野	阴性
1-9 条抗酸杆菌 每 100 个油镜视野	报告实际菌数，例如：4/100
10-99 条抗酸杆菌 每 100 个油镜视野	1+
1-9 条抗酸杆菌 50 个视野中平均每个视野	2+
>10 条抗酸杆菌 20 个视野中平均每个视野	3+

附件 5 . 痰涂片镜检盲法复检表格 (从基层实验室抽片至参比实验室)

抗酸染色痰涂片镜检盲法复检

基层实验室 _____

第二级实验员 _____

基层实验员 _____

实验室 _____

抽片日期 _____

第三级实验员 _____

此次抽片的日期范围 _____

实验室 _____

基层实验室		复检结果		标本性状	大小	厚薄	染色	备注
涂片号	结果	第二级	第三级					

基层实验室		复检结果		标本性状	大小	厚薄	染色	备注
涂片号	结果	第二级	第三级					

标本性状、大小、厚薄、染色适宜否: M=合格 (marginal) P=差 (poor)

初检结果	最终复检结果					
	阴性	1-9 条	1+	2+	3+	总计
阴性						
1-9 条						
1+						
2+						
3+						
总计						

错误汇总(数量)				
严重错误		非严重错误		
HFP	HFN	LFP	LFN	QE
小计		小计		

HFP:高假阳性; HFN:高假阴性
LFP:低假阳性; LFN:低假阴性
QE: 量化误差

第二级复检结果	最终复检结果					
	阴性	1-9 条	1+	2+	3+	总计
阴性						
1-9 条						
1+						
2+						
3+						
总计						

错误汇总				
严重错误		非严重错误		
HFP	HFN	LFP	LFN	QE
小计		小计		

测试是否合格: 是 _____ 否 _____

建议: _____

附件 9 . 痰培养检查申请及报告单

申请原因:

区县: _____ 区域: _____ 当地实验室: _____

标本收集日期: _____ / _____ / 20 ____ 当地实验室序号: _____

申请人: 姓名: _____ 职务: _____

病人情况:

病人姓名: _____ 年龄: _____ 性别: _____

结核病人登记号: _____

病人分类及病变部位:

新病人 (以前未接受过 ≥ 1 个月的治疗) 部位: 肺

复发 肺外 (说明部位): _____

治疗失败

中断后返回

慢性排菌

标本类型:

痰 当地实验室涂片结果: 第一份痰 _____ 第二份痰 _____ 第三份痰 _____

其他 (说明): _____

参比实验室结果:

参比实验室序号: _____

镜检结果:

标本	阴性	1-9	1+	2+	3+
1					
2					

培养结果:

标本	污染	阴性	1-9 个菌落 实际菌落数	10-100 个菌落 (1+)	>100-200 个菌 落 (2+)	>200 个菌 落 (3+)
1						
2						

药物敏感性试验结果:

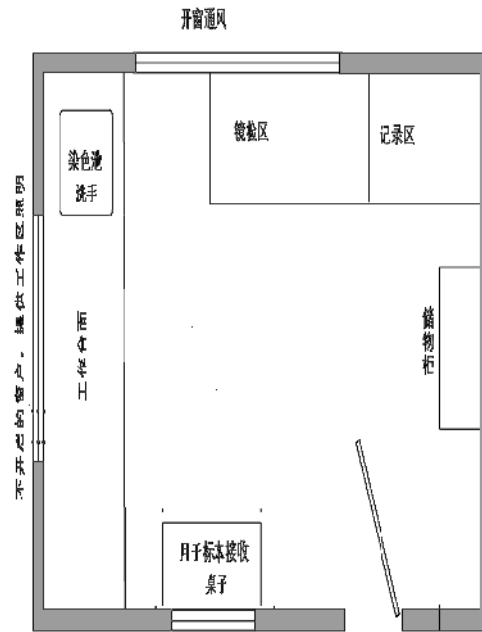
异烟肼	利福平	乙胺丁醇	链霉素

日期: _____ / _____ / 20 _____

签名: _____

附件11. 基层镜检实验室的布局设计

改编自：Collins C H, Grange J M, Yates M D. Tuberculosis bacteriology. Organization and practice. 2nd ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997



附件12 国家结核病参比实验室的设计和图纸

由于参比实验室通常是在已经存在的建筑物内，所以实验室规划的标准可能根据特殊的情况而有所不同。而在塞内加尔达喀尔的国家结核病控制中心和国家结核病参比实验室，则有机会在属于卫生部和社会事务部的地盘建立一个独立的建筑。建筑群必须包括一个参比实验室、作为结核病中心管理机构的二栋建筑，以及足够的贮存药品和实验室材料的空间，因为这样的空间在以前是没有的。建造这样一个完整的建筑群所需的经费预算最多不超过420,000美元。参比实验室的建设应满足国际上研究分支杆菌和公共卫生的专家所确定的最低要求。

图1 计划A 地点和位置计划

图2 计划B 结核病参比实验室四周图

图3 计划C 结核病参比实验室详细布局

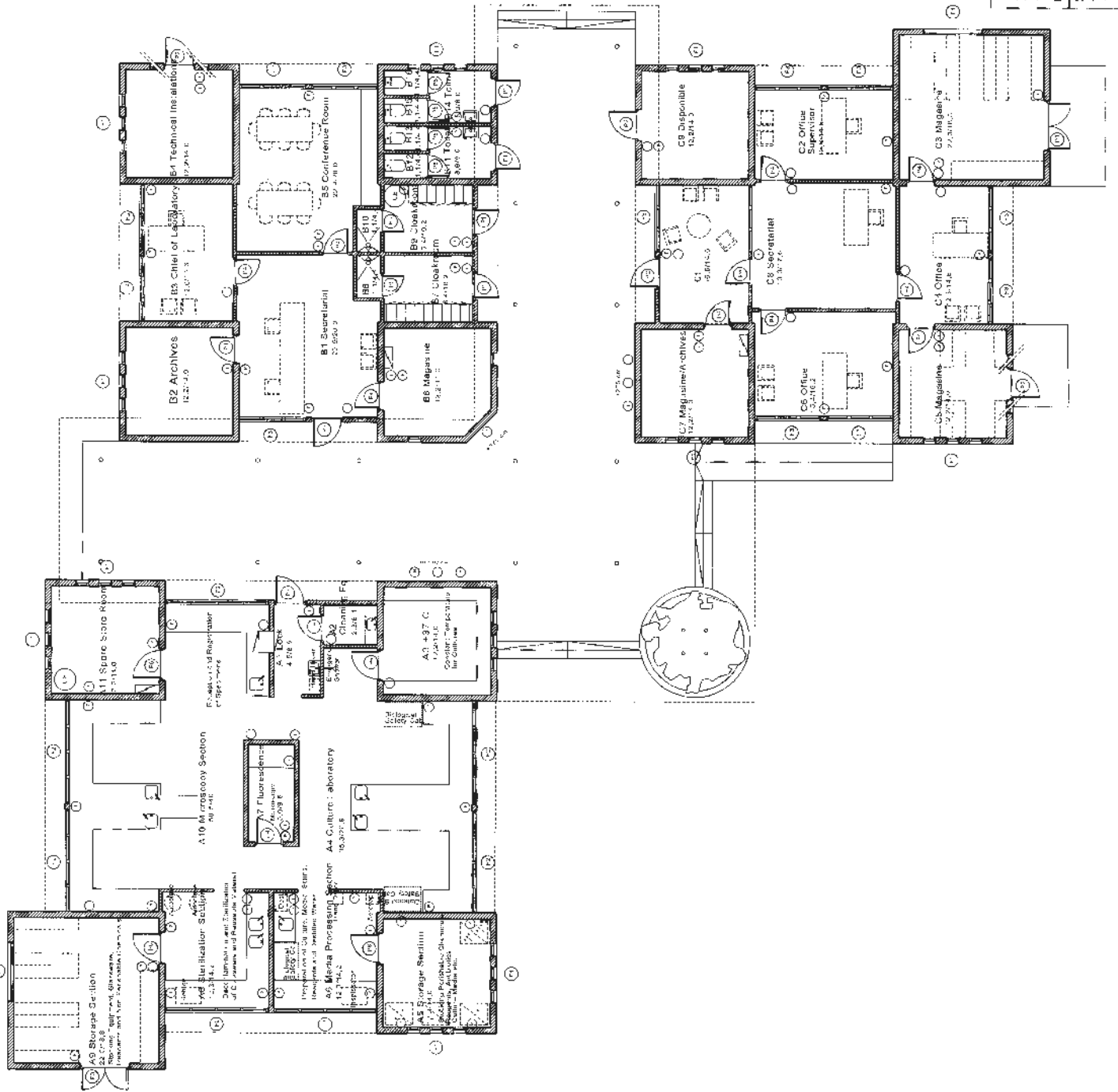
图4 实验室气流控制示意图

图1 计划A

- ① Switch
- ② EI outlet
- ③ Wall Light
- ④ Hot Water
- ⑤ EI. fuses

- ⑥ Window Aluminium 40X40 CM
- ⑦ Window Aluminium 332X180 CM
- ⑧ Window Aluminium 215X180 CM
- ⑨ Window Aluminium 190X60 CM

- ⑩ Steel Door 90X210 CM
- ⑪ Steel Door 100X210 CM
- ⑫ Steel Door 160X210 CM
- ⑬ Door Isoplane 90X210 CM
- ⑭ Door Isoplane 80X210 CM
- ⑮ Door Isoplane 100X210 CM

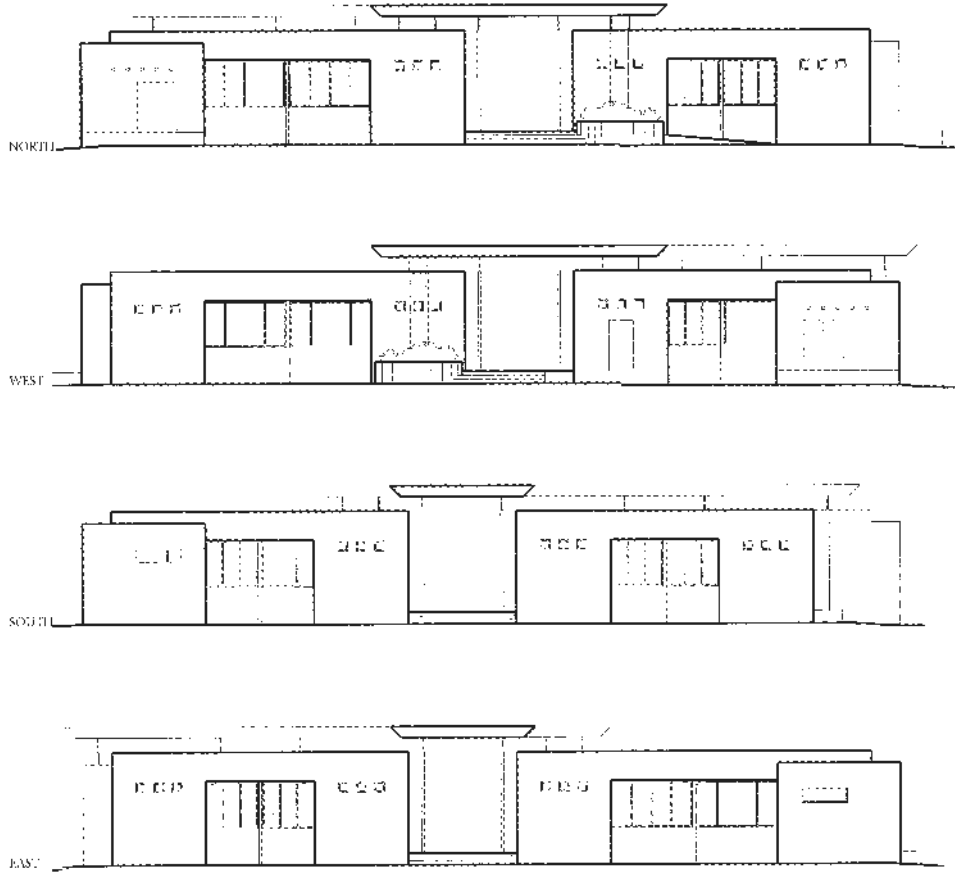


NATIONAL REFERENCE
LABORATORY - SENEGAL

PLAN
MADE BY UHL FOR
TUATLD

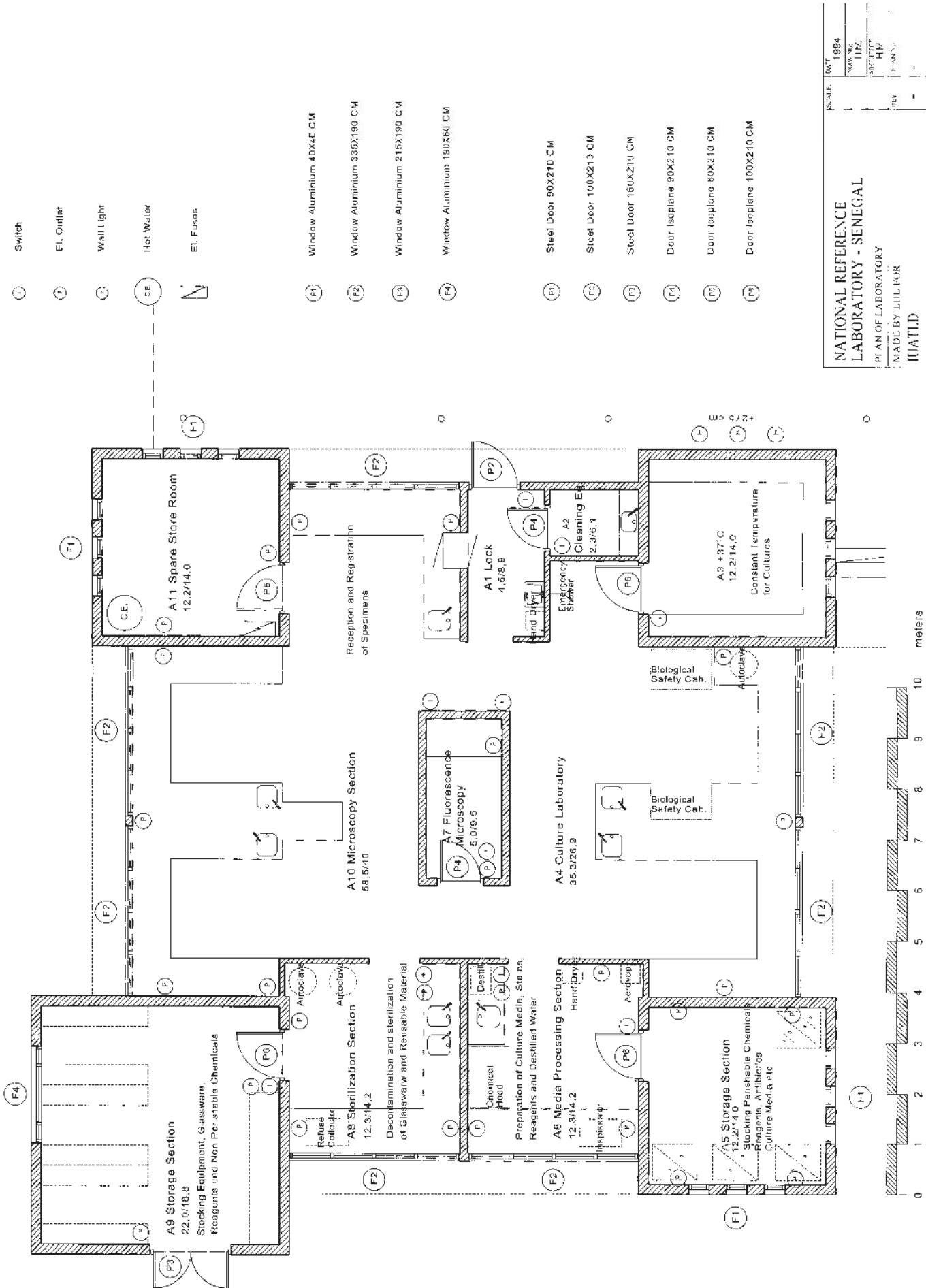
SCALE	DATE	1994
	DRAWING	H.M.
	ARCHITECT	H.M.
REV.	PLAN No.	

图2 计划B 结核病参比实验室四周图



1	实验室	1000	1000
2	办公室	1000	1000
3	会议室	1000	1000
4	值班室	1000	1000
5	更衣室	1000	1000
6	卫生间	1000	1000
7	淋浴间	1000	1000
8	休息室	1000	1000
9	器材室	1000	1000
10	档案室	1000	1000
11	试剂室	1000	1000
12	标本室	1000	1000
13	洗瓶室	1000	1000
14	消毒室	1000	1000
15	污物室	1000	1000
16	垃圾间	1000	1000
17	走廊	1000	1000
18	楼梯	1000	1000
19	电梯	1000	1000
20	出入口	1000	1000

图3 计划C 结核病参比实验室详细布局



**NATIONAL REFERENCE
LABORATORY - SENEGAL**

PLAN OF LABORATORY
MADE BY LULUKUR
IUA/TID

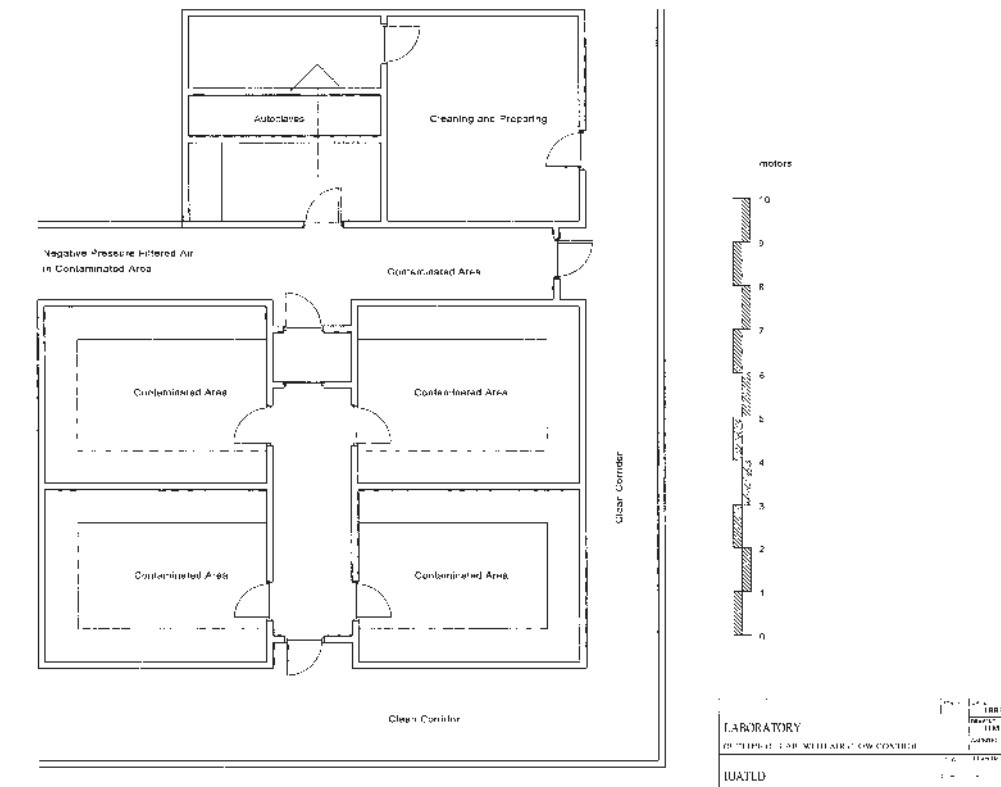
DATE	1984
SCALE	1:100
DESIGNER	HE
PROJECT	HE
REV.	-

图4 根据可利用的资源，结核病参比实验室可以建设成能够控制整个实验室内的空气流动途径。空气流动方向的确 定要求认真地计划和建设。

标有空气流动方向的实验室草图说明了对III级生物抑制的二个基本概念，即空气流动方向的概念和连锁门的概念。连锁门是指不能够同时打开的门：当一个门（门1）打开时，其它门（门2）被机械装置锁住不能打开。

此实验室草图由阿根廷布宜诺斯艾利斯的Isabel N. De Kantor, Sc.D提供。

图4.实验室气流控制草图



附件13 区域抗酸菌痰涂片镜检实验室耗材报告申请表

AFB 镜检耗材申请表

区域: _____ 期(半年) _____ 年份 _____

A 在上一个半年本区域完成的涂片数: _____ *

品目	每份涂片所需的量 B	染液配制(每升染液所需的量) C	6个月耗材需求 D	3个月的储存量 E	消耗+储存 F	库存量 ↓ G	需求量计算(=F-G) H	需求量转化为多少运输包装 I	每个包装数量
痰盒	1个								每个包装 _____ 个
玻片	1张								每个包装 _____ 个
碱性复红粉末	0.003升	10g							每瓶 _____ 克
石碳酸晶体	0.003升	50g							每瓶 _____ 升
浓硫酸	0.005升	0.25							每瓶 _____ 克
亚甲兰粉末	0.003升	3g							每瓶 _____ 升
脱色酒精	0.003升	0.1							每瓶 _____ 升
加热用酒精	0.001升								每瓶 _____ 升
镜油	0.0001升								每瓶 _____ 升

*如果有报告的话, 此处填写所有镜检中心的涂片数; 如果没有, 则根据阳性病人流行病学情况实验室登记本上的阳性病人检出数进行估算。

如果染色剂配制的不符则进行修改(这里是1%石碳酸复红、5%石碳酸, 0.3%的亚甲兰、25%硫酸)。这里填写的是区域级实验室的库存量, 而不是每个实验室的库存量。