

ICS 11.020

CCS C 50

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 884—2026

分枝杆菌感染实验诊断标准

Standards for laboratory diagnosis of mycobacterial infections

2026 - 05 - 25 发布

2026 - 11 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准为您推荐性标准。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：华中科技大学同济医学院附属同济医院、武汉市肺科医院、首都医科大学附属北京胸科医院、中国疾病预防控制中心、同济大学附属上海市肺科医院、北京大学人民医院、四川大学华西医院、陕西省人民医院。

本标准主要起草人：孙自镛、彭静、任易、逢宇、欧喜超、沙巍、王辉、应斌武、张利侠、汪峰。

分枝杆菌感染实验诊断标准

1 范围

本标准规定了分枝杆菌（除外麻风分枝杆菌）感染实验诊断的关键技术要求。
本标准适用于医疗机构临床实验室开展分枝杆菌（除外麻风分枝杆菌）的实验诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

- GB/T 22576.1 医学实验室 质量和能力的要求 第1部分：通用要求
- GB/T 22576.6 医学实验室 质量和能力的要求 第6部分：临床微生物学检验领域的要求
- WS/T 442 临床实验室生物安全指南
- WS/T 640 临床微生物学检验标本的采集和转运标准
- WS/T 807 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性能验证

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

结核分枝杆菌复合群 *Mycobacterium tuberculosis complex*; **MTBC**

一组遗传学高度相关（基因组同源性>99.9%）、表型相似且可引起人类或动物结核病的分枝杆菌的总称。

注：该复合群包括结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*, MTB）、牛分枝杆菌（*M. bovis*）、山羊分枝杆菌（*M. caprae*）、非洲分枝杆菌（*M. africanum*）、田鼠分枝杆菌（*M. microti*）、海豹分枝杆菌（*M. pinnipedii*）、獾分枝杆菌（*M. mungi*）、羚羊分枝杆菌（*M. orygis*）、坎奈蒂分枝杆菌（*M. canetti*）等。

3.2

非结核分枝杆菌 *nontuberculous mycobacteria*; **NTM**

分枝杆菌属内除MTBC和麻风分枝杆菌以外的其他分枝杆菌。

3.3

慢生长型非结核分枝杆菌 *slowly growing nontuberculous mycobacteria*; **SGM**

固体培养基上培养>7 d，出现肉眼可见菌落生长的NTM。

3.4

快生长型非结核分枝杆菌 *rapidly growing nontuberculous mycobacteria*; **RGM**

固体培养基上培养≤7 d，出现肉眼可见菌落生长的NTM。

3.5

结核病 *tuberculosis*; **TB**

MTBC引起的人类疾病。MTB是人类结核病最常见且最重要的致病病原体。

3.6

非结核分枝杆菌病 *nontuberculous mycobacterial disease*; **NMD**

机体感染NTM后出现相应的临床症状、体征和影像学表现，具有病原学和/或病理学证据。

3.7

一线抗结核药物 *first-line tuberculosis medicine*

用于治疗药物敏感结核病的抗结核药物。

注：包括异烟肼（Isoniazid, INH或H）、利福平（Rifampicin, RFP或R）、吡嗪酰胺（Pyrazinamide, PZA或Z）、乙胺丁醇（Ethambutol, EMB或E）。

3.8

二线抗结核药物 second-line tuberculosis medicine

用于治疗耐药结核病或对一线抗结核药物禁忌、不耐受患者的抗结核药物。

注：包括左氧氟沙星、莫西沙星、贝达喹啉、利奈唑胺、氯法齐明、环丝氨酸、特立齐酮、德拉马尼、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、链霉素、乙硫异烟胺、丙硫异烟胺、对氨基水杨酸、卡那霉素、卷曲霉素、阿莫西林-克拉维酸等。

3.9

耐药结核病 drug-resistant tuberculosis; DR-TB

由对至少一种抗结核药物耐药MTBC菌株引起的结核病。

3.10

耐多药结核病 multidrug-resistant tuberculosis; MDR-TB

由对利福平和异烟肼耐药MTBC菌株引起的结核病。

3.11

核酸扩增试验 nucleic acid amplification test; NAAT

一种在体外扩增特定DNA或RNA序列，从而高灵敏、特异地检测病原体或遗传标记的试验。

3.12

抗微生物药物敏感性试验 antimicrobial susceptibility testing; AST

简称药物敏感性试验。通过体外试验，采用分子生物学技术检测耐药性突变，或采用表型方法测定抗微生物药物的敏感性。

4 生物安全要求

4.1 总则

分枝杆菌检验全过程生物安全应遵循 WS/T 442 的要求。

4.2 MTBC

4.2.1 MTB 和牛分枝杆菌具有高度传染性。其中，MTB 的 50% 感染剂量 (50% infective dose, ID₅₀) 小于 10 个细菌。操作者可能因暴露而引起感染。应注意预防实验室感染。

4.2.2 MTB 和牛分枝杆菌感染患者的标本检测，包括涂片染色、显微镜检查、分离培养（非泛耐药、非多耐药的菌株传代培养、扩增培养）、菌种鉴定、AST、生化检测、免疫学检测、分子生物学检测等活动可在生物安全防护二级 (biosafety level 2, BSL-2) 实验室进行。除符合 BSL-2 实验室要求外，宜设立独立房间，房门自闭，空气定向流动。操作者宜加强个人防护，如佩戴医用防护口罩、穿医用隔离衣。

4.2.3 除已灭活的标本、菌株以外，所有可能产生气溶胶的操作，如标本开盖和处理、菌株传代培养、质谱样品制备、离心桶的装载和打开等，应在生物安全柜中进行。标本中加入等体积 5% 次氯酸钠溶液作用 15 min 后，可以在操作台面制备涂片。

4.2.4 涂片固定方法，加热板优于火焰。加热板 65 °C~75 °C 固定 2 h，或 80 °C~85 °C 固定 15 min。灭活标本的涂片可采用火焰固定。

5 标本采集和运送

5.1 送检指征

5.1.1 肺部感染

5.1.1.1 可疑肺结核病：出现咳嗽、咳痰 ≥ 2 周，伴或不伴有咯血或痰血等可疑肺结核病症状者，或者在常规体检中发现胸部影像学出现疑似肺结核病灶时，应送检呼吸道标本进行结核病病原学检测。

5.1.1.2 可疑 NTM 肺病：患有支气管扩张、慢性阻塞性肺病等结构性肺病或存在免疫缺陷（原发或继发）的人群，出现持续或加重的咳嗽、咳痰、咯血等症状，且影像学呈现多发小叶中央结节、胸膜下薄壁空洞等疑似 NTM 肺病特征时，应送检呼吸道标本进行 NTM 病原学检测。

5.1.2 肺外感染

5.1.2.1 可疑肺外结核病：患者出现肺外器官感染，如局部疼痛、脓肿或窦道，合并发热、消瘦、盗汗等，经抗感染治疗疗效不佳，影像学有疑似肺外结核病的表现，应送检相应部位标本进行结核病原学检测。

5.1.2.2 可疑肺外NMD：原发或继发免疫缺陷患者出现肺外器官感染表现，或者手术、外伤部位形成脓肿或窦道，经抗感染和抗结核治疗疗效不佳时，应送检相应部位标本进行NTM病原学检测。

5.2 常见标本采集

5.2.1 总则

分枝杆菌感染病原学检测标本的采集应遵循WS/T 640的要求。

5.2.2 采集方法及要求

5.2.2.1 呼吸道标本

5.2.2.1.1 痰

清水漱口后，深咳，采集肺部深处咳出的脓样、干酪样或脓性黏液样痰5 mL~10 mL，标本不易获得时至少采集3 mL，置于无菌防渗漏容器。初诊患者应采集3份痰标本（包括即时痰、清晨痰和夜间痰）。

5.2.2.1.2 诱导痰

刷牙清洁口腔黏膜、舌头和牙龈（勿用牙膏），再用无菌水或生理盐水漱口；以超声雾化器使患者吸入3% NaCl溶液3 mL~5 mL，嘱患者从肺深部咳痰于无菌防渗漏容器，并在申请单或容器上标注“诱导痰”。该采集方法适用于干咳无痰或少痰者。

注：气道高反应者，慎用高渗氯化钠溶液采集诱导痰。

5.2.2.1.3 支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF）

将支气管镜顶端嵌顿于目标支气管段或亚段开口，经操作孔道分次注入无菌生理盐水（37℃或室温），总灌入量应为60 mL~100 mL。每次灌入后以适宜负压（推荐小于-100 mmHg）吸引回收灌洗液至无菌标本采集器。总回收量应不低于灌入量的30%。直接用原采集器送检，或在生物安全柜内移取至少5 mL BALF至无菌防渗漏容器立即送检。

注：在回收过程中，若单次回收率均低于5%，应及时中止操作。儿科患者灌洗量通常为（1 mL~2 mL）/kg，总回收量一般不超过10 mL。

5.2.2.1.4 超声支气管镜穿刺标本

通过超声支气管镜，对胸内淋巴结或者肺周边病灶实时定位，穿刺获得标本，立即注入无菌防渗漏容器送检。

5.2.2.2 胃灌洗液

清晨进食前，通过胃灌洗吸出吞咽的痰液5 mL~15 mL，置于无菌防渗漏容器（如50 mL离心管）中。因分枝杆菌在胃灌洗液中存活时间短，应尽快送检和处理。此方法适用于无法采集痰或支气管灌洗液的婴幼儿和儿童。

5.2.2.3 无菌体液（包括胸腔积液、腹腔积液、心包积液、关节液、脑脊液等）

由临床医生无菌操作，穿刺采集。

5.2.2.3.1 脑脊液

宜采集10 mL，至少2 mL，置于无菌防渗漏容器，与生化和临检标本分管采集、送检。

5.2.2.3.2 其他无菌体液

宜采集15 mL，至少2 mL，置于无菌防渗漏容器送检，或使用促凝采血管（黄头管）采集10 mL送检。

5.2.2.4 尿液

推荐采集清晨首次清洁中段尿。采集前清洁尿道口，弃去前段尿（尿流不断），收集中段尿40 mL，至少10 mL，置于无菌防渗漏容器，立即送检。分枝杆菌培养宜连续3 d分别采集清晨首次中段尿送检。

5.2.2.5 粪便

取新鲜粪便标本至少1 g置于无菌防渗漏容器送检。

5.2.2.6 脓液和伤口分泌物

不宜使用拭子采样。如必须使用，应置于2 mL~3 mL 无菌生理盐水中送检，且不可使用商业拭子运送系统或含凝胶培养基。

5.2.2.6.1 封闭脓肿

以无菌生理盐水或70%乙醇擦除表面分泌物后，注射器抽吸脓液置于无菌防渗漏容器，并无菌操作切取组织（如可行，至少1 g）置于2 mL~3 mL 无菌生理盐水中。

5.2.2.6.2 开放伤口

应从深部基底或脓肿边缘采集标本。

5.2.2.7 组织

5.2.2.7.1 手术或活检组织

采集新鲜标本（送检量尽可能大），置于0.5 mL 无菌生理盐水或专用转运培养基（如Middlebrook 7H9肉汤）送检。

5.2.2.7.2 用于培养或核酸检测的标本

不应使用固定液（如甲醛）固定。若需同步病理检查，应分装标本。

5.2.2.8 血液

标本采集后，应立即轻柔颠倒混匀5次~10次，防止交叉污染及凝血。

5.2.2.8.1 分离培养

严格无菌操作下，成人血培养宜24 h内采集3次，每次注入专用培养瓶5 mL~7 mL 全血。儿童至少采集1 mL。商品化血培养系统遵循制造商的建议。

5.2.2.8.2 免疫学检测

根据方法学要求采集标本。 γ -干扰素（interferon-gamma, IFN- γ ）释放试验宜采集肝素抗凝静脉血4 mL~6 mL，室温运送，4 h内处理。

5.3 标本运送和保存

5.3.1 标本的运送和保存应遵循 WS/T 640 或制造商建议。

5.3.2 用于培养的分枝杆菌检测标本应尽快送检。若不能在1 h内送达实验室，宜按以下条件保存：

- a) 血液和脑脊液：室温运送，不可冷藏或冷冻；
- b) 胃灌洗液：若延迟运送超过4 h，宜在标本采集1 h内加入100 mg 碳酸钠中和胃酸，尽快室温送检，室温保存；
- c) 其他标本：2 °C~8 °C 保存。

5.3.3 用于DNA为靶标的核酸检测标本：2 °C~8 °C，不超过10 d，-20 °C以下冷冻保存不超过1个月。

5.3.4 用于RNA为靶标的核酸检测标本：宜加入RNA保护剂，-20 °C以下冷冻保存。

5.4 标本接收和拒收

5.4.1 标本接收应符合 WS/T 640 的通用要求。

5.4.2 标本拒收除符合 WS/T 640 的通用要求外，分枝杆菌检测标本的拒收宜包括：

- a) 标本量不足，如呼吸道标本<3 mL、无菌体液<2 mL；
- b) 干燥拭子、肛拭子；
- c) 用于培养的混合尿液，含福尔马林或其他防腐剂的组织、淋巴结、粪便等标本；
- d) 其他不合格标本，包括：延迟运送且未在标本采集1 h内加入100 mg 碳酸钠中和的胃灌洗液，凝固血液（如红头或黄头采血管送检的标本），以及使用EDTA抗凝管（紫头采血管）送检的血培养标本。

6 标本检测

6.1 总则

- 6.1.1 微生物实验室宜同时开展分枝杆菌显微镜检查和核酸检测（包括病原菌和耐药基因检测），快速、准确地报告检测结果。
- 6.1.2 有条件的实验室宜同时开展分枝杆菌培养和鉴定，或将标本送至有能力的实验室进行培养、鉴定、AST（包括表型、基因型检测）。
- 6.1.3 检验方法应用于标本检测前应遵循WS/T 807等文件规定进行性能评估，质量控制满足GB/T 22576.6要求。

6.2 显微镜检查

6.2.1 总则

- 6.2.1.1 涂片显微镜检查是分枝杆菌感染诊断的第一步。该方法操作简便、成本低，能够快速检测标本和培养物中包括分枝杆菌在内的抗酸杆菌（acid-fast bacilli, AFB）。
- 6.2.1.2 除血液标本外，所有送检的分枝杆菌培养标本宜进行抗酸染色显微镜检查。

6.2.2 涂片制备

6.2.2.1 痰标本

痰涂片制备要点如下：

- a) 用竹签或接种环挑取干酪样、脓样或血性部分约0.1 mL涂片，宜经液化、离心浓缩，取沉淀物涂片；
- b) 在洁净载玻片上均匀涂抹痰膜10 mm×20 mm，厚度适宜，即透过痰膜模糊分辨但无法清晰辨认5号字体（或类似大小字体）。

注：脓液及用保护性毛刷采集的标本处理方式同痰标本。

6.2.2.2 液体标本

BALF、无菌体液、尿液等液体标本，以3000×g离心15 min，弃上清，吸取一接种环（直径3 mm）或一滴沉淀物涂片。

6.2.2.3 组织

应先研磨，再进行涂片。

6.2.3 固定

所有涂片应自然干燥，再加热固定后染色。若采用酒精灯固定，应缓慢通过火焰3次~4次，防止涂片焦化。

6.2.4 染色

6.2.4.1 萘-尼染色

6.2.4.1.1 操作步骤

6.2.4.1.1.1 染色：使用石碳酸复红液覆盖涂片，加热至产生蒸汽，染色时间应不少于5 min，高海拔地区适当延长染色时间。染色过程中始终保持涂片被染液覆盖，必要时补加染液。染色结束后流水冲

洗，沥干。

6.2.4.1.1.2 脱色：使用3%酸性酒精脱色液，脱色至涂片无肉眼可视红色后，流水冲洗，沥干。

6.2.4.1.1.3 复染：使用亚甲基蓝复染液复染30 s~60 s，流水冲洗，沥干。

6.2.4.1.1.4 镜检：油镜下观察，AFB呈红色，背景呈蓝色。阴性结果应观察 ≥ 300 个视野。

6.2.4.1.2 注意事项

6.2.4.1.2.1 载玻片应清洁、无油污及划痕，每张载玻片只涂抹一份标本。镜检时防止油镜镜头接触玻片，避免交叉污染。

6.2.4.1.2.2 妥善保存涂片以备复核。应保存近3个月的痰涂片。年标本量不足500张时，保存近1年的涂片。3个月涂片量超过1000张时，保存近1000张涂片。

6.2.4.1.2.3 每个检测日应进行室内质控，以龟分枝杆菌（*M. chelonae*）（ATCC 93326）或已知抗酸染色阳性菌株作为阳性质控，大肠埃希菌（ATCC 25922）或已知抗酸染色阴性菌株作为阴性质控。

6.2.4.2 荧光染色

6.2.4.2.1 操作步骤

6.2.4.2.1.1 染色：滴加金胺O荧光染色液覆盖涂片，染色时间不少于15 min。流水冲洗，沥干。

6.2.4.2.1.2 脱色：滴加0.5%酸性酒精脱色1 min~2 min。流水冲洗，沥干。

6.2.4.2.1.3 复染：使用0.5%高锰酸钾溶液复染2 min~4 min（时间不可过长，以免荧光亮度减弱）。流水冲洗，沥干。

6.2.4.2.1.4 镜检：低倍镜扫描后，使用高倍镜确认形态，以避免荧光碎片导致的假阳性结果。若镜检不能确认细胞碎片或AFB，可采用萘-尼染色法复染，或重新制片、染色。AFB在黑色背景下呈现明亮橙黄色荧光。阴性结果应观察 ≥ 50 个视野。

6.2.4.2.2 注意事项

6.2.4.2.2.1 宜采用LED（发光二极管）荧光显微镜。荧光显微镜开启后需预热10 min再进行镜检。

6.2.4.2.2.2 应尽快镜检，避免涂片荧光淬灭。

6.2.4.2.2.3 首次检测阳性患者的涂片宜由另一位技术人员镜检确认。

6.2.4.2.2.4 每次染色均应进行室内质控。质控菌株同本标准第6.2.4.1.2.3条。

6.2.4.3 改良Kinyoun染色

6.2.4.3.1 操作步骤

6.2.4.3.1.1 染色：滴加Kinyoun石碳酸复红染色液覆盖涂片，室温染色5 min。流水冲洗，沥干。

6.2.4.3.1.2 脱色：滴加1%硫酸水溶液脱色2 min~3 min，至无肉眼可视红色。流水冲洗，沥干。

6.2.4.3.1.3 复染：滴加亚甲基蓝复染30 s。流水冲洗，沥干。

6.2.4.3.1.4 镜检：油镜下观察，AFB呈红色，背景呈蓝色。

6.2.4.3.2 注意事项

6.2.4.3.2.1 本方法为冷染法，无需加热，适用于RGM感染标本染色。

6.2.4.3.2.2 染色时间可根据标本类型和室温适当调整。

6.2.4.3.2.3 镜检时应注意观察细菌形态，RGM通常较MTBC稍粗短。

6.2.5 自动制片/阅片

应重视验证检测系统运行过程中AFB的携带污染。操作步骤、结果判断、质量控制等遵循制造商建议。

6.2.6 结果报告和解释

6.2.6.1 结果报告

6.2.6.1.1 抗酸染色宜在收到标本24 h内报告结果。

6.2.6.1.2 涂片镜检应定量报告结果。建议按表1报告。

表1 抗酸染色涂片镜检结果报告

报告结果	光学显微镜（100倍）	荧光显微镜（40倍）
抗酸杆菌阴性	0条/300视野	0条/50视野
抗酸杆菌±（报告细菌数量）	（1条~8条）/300视野	（1条~9条）/50视野
抗酸杆菌阳性 1+	（3条~9条）/100视野，连续观察300个视野	（10条~49条）/50视野
抗酸杆菌阳性 2+	（1条~9条）/10视野，连续观察100个视野	（1条~9条）/1视野，至少观察50个视野
抗酸杆菌阳性 3+	（1条~9条）/1视野	（10条~99条）/1视野，至少观察20个视野
抗酸杆菌阳性 4+	≥10条/1视野	≥100条/1视野，至少观察20个视野

6.2.6.2 结果解释

6.2.6.2.1 抗酸染色灵敏度低（痰标本检出限为 5000 个细菌/mL~10000 个细菌/mL），且不能区分活菌与死菌。此外，RGM 抗酸性存在差异，尤其在荧光染色时，甚至表现为抗酸染色阴性。涂片抗酸染色阴性结果不能排除分枝杆菌感染。对疑似病例应进行分枝杆菌分子检测或培养。

6.2.6.2.2 除分枝杆菌外，奴卡菌属（*Nocardia*）、红球菌属（*Rhodococcus*）、戈登菌属（*Gordonia*）、冢村菌属（*Tsukamurella*）、麦克军团菌（*L. micdadei*）等病原体具有不同程度的抗酸性，宜通过培养、分子生物学等方法进行菌种鉴定。

注：在革兰染色中，分枝杆菌染色极弱或不着色（“鬼影”状），或表现为革兰染色阴性，部分RGM可呈革兰阳性，串珠状杆菌。标本涂片革兰染色出现此类现象，宜进行抗酸染色或核酸检测。

6.2.7 注意事项

6.2.7.1 操作步骤应遵循制造商的建议。

6.2.7.2 临床标本直接涂片抗酸染色宜采用荧光染色，以提高检测敏感性和速度。

6.2.7.3 适用时，临床标本宜离心浓缩后涂片，以提高检测敏感性。

6.2.7.4 胃灌洗液和尿液涂片抗酸染色价值存在争议。粪便涂片抗酸染色很少用于分枝杆菌检测。

6.3 分离培养和鉴定

6.3.1 总则

6.3.1.1 分离培养是分枝杆菌感染诊断的金标准和治疗监测的必要手段。对儿童结核病、肺外结核病、HIV 感染合并结核病等少菌 MTBC 感染，以及 NTM 感染的诊断和鉴别诊断具有重要价值。

6.3.1.2 大多数分枝杆菌可导致人类疾病，可由常规培养方法检出，某些分枝杆菌有特殊的营养和培养温度要求。疑似分枝杆菌感染患者的标本培养宜同时进行固体和液体培养。

6.3.1.3 所有标本在培养接种前均应进行前处理，以消化黏液、灭活杂菌和浓缩菌体。

6.3.1.4 每批标本处理宜使用 5 mL~10 mL 无菌生理盐水或缓冲液作为阴性对照（与标本同步操作）。若阴性对照分枝杆菌检测呈阳性，则整批结果无效，需核查操作全过程以确保无污染。

6.3.1.5 培养鉴定的所有分枝杆菌均应报告，特别是 MTBC 和临床相关 NTM。阴性结果仅表明本次培养未检出分枝杆菌，不能排除分枝杆菌感染。

6.3.2 标本前处理

6.3.2.1 痰、脓液、BALF 等黏稠或非无菌标本

黏稠或非无菌标本的常用处理方法如下：

- NaOH 消化法：加入等体积 2% NaOH 溶液，涡旋混匀 30 s~60 s，室温静置 15 min 后接种；
- NALC-NaOH 消化法：加入等体积 NALC-NaOH（N-乙酰-L-半胱氨酸-氢氧化钠-枸橼酸钠）消化液（终浓度 NaOH 为 1%~1.5%），涡旋混匀，室温静置 15 min 后，加入 0.67 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 6.8）至 45 mL，以 3000×g 离心 15 min（推荐制冷离心，温度 8℃~10℃），弃上清，沉淀重悬于 1 mL~2 mL PBS 中备用。

6.3.2.2 胃灌洗液

收集于含100 mg碳酸钠容器中，以3000×g离心15 min，弃上清，沉淀重悬于5 mL无菌生理盐水中，再按本标准第6.3.2.1条处理。

6.3.2.3 无菌体液

若为无菌采集，可直接以3000×g离心15 min，取沉淀接种；若非无菌采集，按本标准第6.3.2.1条处理。

6.3.2.4 粪便

取1 g标本与5 mL无菌生理盐水混匀，静置10 min~15 min，取上清液，再按本标准第6.3.2.1条处理。

6.3.2.5 组织

若为无菌采集，应在无菌生理盐水或0.2%牛血清白蛋白中研磨成匀浆后直接接种；若为非无菌采集，则研磨后按本标准第6.3.2.1条处理。

6.3.3 固体培养

6.3.3.1 接种

固体培养接种的操作要点如下。

- 取无污染标本或前处理后标本的离心沉淀物接种罗氏培养基、米氏培养基等；经本标准第6.3.2.1 a)条处理的标本接种酸性罗氏培养基；经本标准第6.3.2.1 b)条处理的标本接种中性罗氏培养基。
- 每支培养基斜面或平皿至少接种3滴（约0.2 mL），使菌液均匀铺展于斜面或平面。
- 接种后，培养管斜置于培养箱孵育1 d~2 d，以便液体充分吸收，随后拧紧管盖并直立继续孵育；平皿置室温，直至液体被完全吸收，再密封于聚乙烯袋中孵育。

6.3.3.2 孵育和观察

6.3.3.2.1 MTBC最佳孵育温度为36℃±1℃，嗜血分枝杆菌（*M. haemophilum*）、龟分枝杆菌、海分枝杆菌（*M. marinum*）、溃疡分枝杆菌（*M. ulcerans*）在25℃~33℃生长最佳。皮肤、骨、关节活检组织宜接种两组培养基，分别置于36℃±1℃和较低最佳温度。蟾蜍分枝杆菌（*M. xenopi*）在41℃±1℃生长更优。

6.3.3.2.2 接种后第3 d、第7 d及此后每周一次，观察菌落生长和污染情况并记录，持续8周。某些分枝杆菌，如溃疡分枝杆菌（皮肤标本）和日内瓦分枝杆菌（*M. genavense*）需要孵育更长时间（8周~12周）。

6.3.3.2.3 MTBC菌落通常呈淡黄色，干燥、粗糙、凸起、不规则。NTM菌落形态多样，可产色，光滑、湿润。

6.3.3.2.4 培养物经抗酸染色确定为抗酸杆菌后，宜使用MPT64快速鉴定（见本标准第6.3.5.1条）或者同时转种含对硝基苯甲酸（PNB）的鉴别培养基（多数NTM可生长，MTBC不生长），初步鉴定MTBC和NTM。

6.3.3.3 结果判断

6.3.3.3.1 培养8周后无分枝杆菌生长，报告分枝杆菌培养阴性。

6.3.3.3.2 观察到菌落生长，并经抗酸染色及鉴定确认为分枝杆菌后，报告鉴定结果及菌落丰度。宜至少孵育4周，依据以下标准报告菌落丰度：

- 菌落生长不及斜面面积1/4，报告实际菌落数（弱阳性）；
- 菌落占斜面面积1/4，报告(1+)；
- 菌落占斜面面积1/2，报告(2+)；
- 菌落占斜面面积3/4，报告(3+)；
- 菌落布满斜面，报告(4+)。

6.3.4 液体培养

6.3.4.1 接种

无污染标本或经本标准第6.3.2.1 b)条前处理后标本的离心沉淀物接种专用分枝杆菌液体培养基。

6.3.4.2 孵育和培养

6.3.4.2.1 培养基应置全自动分枝杆菌培养监测系统，或采用手工法直立于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱，连续培养 42 d。

6.3.4.2.2 使用自动监测系统者，应遵循制造商的建议。手工法需每日观察培养基浊度或荧光指示剂变化并记录。

6.3.4.2.3 疑似生长时，应取培养物进行涂片抗酸染色镜检，以确认 AFB 的存在，并排除污染。

a) 抗酸染色阳性、无杂菌生长的培养基转种固体培养基（如罗氏培养基）进行纯培养，并按本标准第 6.3.3.2.4 条操作。

b) 抗酸染色阳性、有杂菌生长时，培养物宜按照本标准第 6.3.2.1 b) 条重新处理，再接种专用分枝杆菌液体培养基。

c) 抗酸染色阴性、无杂菌生长的培养基继续孵育 2 d~3 d 再进行涂片抗酸染色；若仍为抗酸染色阴性、无杂菌生长，孵育至第 42 d；若抗酸染色阳性，按本条 a)、b) 操作。

6.3.4.2.4 所有阴性培养基（包括自动化培养监测系统）丢弃前，均应目测检查。疑似生长时，取培养物进行涂片抗酸染色镜检。

6.3.4.3 结果判断

6.3.4.3.1 培养至第 42 d 无分枝杆菌生长，报告分枝杆菌培养阴性。

6.3.4.3.2 疑似生长，且经抗酸染色和鉴定确认为分枝杆菌，报告鉴定结果。

6.3.5 菌种鉴定

6.3.5.1 快速抗原鉴定（MPT64 检测）

6.3.5.1.1 操作要点

6.3.5.1.1.1 自固体培养基挑取适量菌落制备菌悬液，或吸取液体培养基上清液。

6.3.5.1.1.2 将菌悬液或上清液加入检测卡的加样孔或包被有抗体的微孔板。

6.3.5.1.1.3 依据试剂说明书观察、判断结果。

6.3.5.1.2 结果报告和解释

6.3.5.1.2.1 根据检测结果报告为阳性或阴性。

6.3.5.1.2.2 MPT64 是 MTBC 分泌的特异性抗原，NTM 通常不分泌该蛋白。阳性结果表明培养物中检出 MTBC。阴性结果表明培养物中未检出 MTBC，或 MTBC 分泌的 MPT64 浓度低于方法学检出限，或菌株存在 MPT64 蛋白编码基因突变。

6.3.5.1.2.3 若培养物 MPT64 检测阴性，而抗酸染色阳性，则可能为 NTM，应根据其临床意义进行菌种鉴定。

6.3.5.1.3 注意事项

6.3.5.1.3.1 MPT64（又称为 MPB64）检测操作简便、快速（数分钟内即可获得鉴定结果），具有较高的敏感性和特异性，宜用于 MTBC 与 NTM 的鉴别。

6.3.5.1.3.2 该方法适用于分枝杆菌新鲜培养物 MTBC 检测，不宜用于临床标本（如痰）MTBC 检测。阳性培养物若不能立即检测，应按照制造商建议进行保存，避免反复冻融。

6.3.5.1.3.3 部分 MTBC 菌株（如牛分枝杆菌 BCG 亚型的 Copenhagen、Glaxo、Pasteur、Tice 株，非洲分枝杆菌部分亚型，及 MPT64 蛋白编码基因突变株）可因 MPT64 抗原表达缺失或显著降低导致假阴性结果。

6.3.5.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS）法

6.3.5.2.1 操作要点

6.3.5.2.1.1 应使用经分离培养获得的新鲜、纯培养分枝杆菌菌落。

6.3.5.2.1.2 样品处理前应使分枝杆菌充分灭活。

6.3.5.2.1.3 具体操作应遵循制造商建议。

6.3.5.2.2 结果报告

6.3.5.2.2.1 根据鉴定结果，可报告“结核分枝杆菌复合群”，或NTM至种或复合群水平。鉴定结果宜区分脓肿分枝杆菌与龟分枝杆菌、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)与奇美拉分枝杆菌(*M. chimaera*)等。

6.3.5.2.2.2 实验室应根据预期用途确定鉴定水平；宜鉴定到种或亚种水平的分枝杆菌，包括但不限于：

- a) 具有重要公共卫生意义的细菌，如MTBC；
- b) 与严重并发症相关的细菌；
- c) 具有特定预后意义的细菌；
- d) 对常用经验性治疗抗微生物药物耐药的细菌。

6.3.5.2.3 注意事项

6.3.5.2.3.1 该方法适用于纯菌落鉴定，不适用于临床标本的直接检测。

6.3.5.2.3.2 前处理过程应文件化，并确保分枝杆菌充分灭活。

6.3.5.2.3.3 应使用经认证的商业化数据库。

6.3.5.2.3.4 应规定MTBC报告为复合群或种水平。

6.3.5.2.3.5 必要时，无法鉴定结果、罕见鉴定结果、鉴定结果与菌落形态不匹配或与不寻常的药敏模式相关等菌株，宜采用基因测序或其他基因型分析方法，或送有能力的实验室确认。

6.3.5.2.3.6 质控应遵循制造商的建议。阳性质控宜选择相对少见的菌种，如外来分枝杆菌(*M. peregrinum* ATCC 700686)。

6.3.5.3 核酸鉴定

6.3.5.3.1 总则

核酸鉴定遵循以下原则：

- a) 应采用经验证或确认的方法提取培养物中的分枝杆菌核酸；
- b) 可采用直接测序法或间接分析法（详见本标准第6.4.3.1条）；
- c) 靶基因的分辨率存在差异，应根据鉴定需求选择合适的靶基因（详见本标准第6.4.4.1条）；
- d) 对于罕见菌种或新发现菌种，可采用多靶点联合测序或全基因组测序进行鉴定；
- e) 应遵循制造商建议或执行经确认的标准化操作规程。

6.3.5.3.2 结果报告和解释

详见本标准第6.4.5条。

6.4 核酸检测

6.4.1 总则

6.4.1.1 NAAT适用于分枝杆菌感染患者的病原菌及其耐药性检测。

6.4.1.2 选择检测系统时宜综合考虑以下因素：

- a) 机构性质（如传染病专科或综合医院）和设施条件；
- b) 专业人员技术水平；
- c) 标本量和服务人群特征（包括患者来源，如急诊、普通门诊或住院患者）；
- d) 本地分枝杆菌流行状况（如菌种构成、耐药状况）；
- e) 方法学性能指标（如菌种覆盖范围、检测靶标、方法灵敏度和特异性）。

6.4.1.3 病原学诊断是结核病有效治疗和管理的基石，应快速检测并及时报告结果。

6.4.2 标本类型

6.4.2.1 取自患者的标本

- 6.4.2.1.1 呼吸道标本：痰、BALF、鼻咽抽吸物等。
- 6.4.2.1.2 体液：血液（通常采用 EDTA 或 ACD 等抗凝，避免肝素抗凝）、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液、关节液、尿液等。
- 6.4.2.1.3 组织：淋巴结抽吸物或活检组织、其他组织活检或手术切除标本。
- 6.4.2.1.4 其他：胃液（需注意胃酸对核酸的影响）、粪便（需特殊处理去除抑制物）等。

6.4.2.2 培养物

- 6.4.2.2.1 菌落：固体培养基上的新鲜菌落。
- 6.4.2.2.2 液体培养基：培养液或沉淀物。

6.4.3 检测方法

6.4.3.1 常用检测方法

- 6.4.3.1.1 分枝杆菌核酸检测可采用一种或多种技术，包括但不限于以下技术和方法：
 - a) 以扩增技术为核心的方法：实时荧光聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）、等温扩增、巢式 PCR、多重 PCR、数字 PCR、逆转录 PCR、基于荧光探针熔解曲线的多重 PCR；
 - b) 以核酸杂交技术为核心的方法：基因芯片、线性探针方法；
 - c) 测序技术：一代测序（Sanger 测序）、全基因组测序（whole genome sequencing, WGS）、宏基因组二代测序（metagenomic next-generation sequencing, mNGS）、靶向二代测序（targeted next-generation sequencing, tNGS）、纳米孔测序。
- 6.4.3.1.2 分枝杆菌感染分子生物学实验诊断常用技术及其特点见本标准附录 A 中表 A.1。

6.4.3.2 检测方法的临床应用

- 6.4.3.2.1 根据检测原理、操作流程、标本前处理要求、仪器设备依赖程度及生物信息学分析复杂度等因素，分枝杆菌核酸检测系统可分为低、中、高三个等级。
- 6.4.3.2.2 不同复杂程度核酸检测系统的临床应用详见本标准附录 B 中表 B.1。

6.4.4 分子检测靶标

6.4.4.1 病原菌检测靶标

- 6.4.4.1.1 分枝杆菌检测靶标：常用靶标包括 *16S rRNA* 基因、ITS（16S-23S rRNA 基因间隔区）、*rpoB* 基因、*hsp65* 基因以及 *IS6110*、*IS1081* 序列。此外，*gyrB*、*secA*、*sodA*、*dnaJ*、*groEL1*、*hsp70* 等基因被用于分枝杆菌菌种的精细分型。
- 6.4.4.1.2 MTBC 检测靶标：核心靶标为 *IS6110*、*IS1081*、*mpt64 (Rv1980c)* 等。RD 区基因、*esxA*、*esxB* 等基因可作为补充靶标，以提高检测覆盖率和准确性。

6.4.4.2 耐药相关检测靶标

分枝杆菌耐药相关常用分子检测靶标包括：

- a) 利福平：*rpoB* 基因 507~533 密码子（利福平耐药决定区）突变；
- b) 异烟肼：*katG* 基因 315 密码子、*inhA* 和 *ahpC* 基因启动子区、*kasA* 基因突变等；
- c) 吡嗪酰胺：*pncA* 基因及其启动子突变、*rpsA*、*panD*、*panC* 基因突变；
- d) 乙胺丁醇：*embB*、*embA*、*ubiA* 基因突变等；
- e) 氟喹诺酮类药物：*gyrA*、*gyrB* 基因抗性决定区，*mfpA* 基因突变；
- f) 贝达喹啉：*atpE*、*Rv0678*、*pepQ (Rv2535c)*、*Rv1979c* 基因突变等；
- g) 利奈唑胺：*rrl*、*rp1C* 基因突变；
- h) 氯法齐明：*Rv0678*、*pepQ (Rv2535c)* 基因突变；
- i) 环丝氨酸：*alr*、*ald*、*ddl*、*cycA* 基因突变；
- j) 链霉素：*rpsL*、*rrs* 基因和 *gidB* 基因启动子突变；
- k) 乙硫异烟胺/丙硫异烟胺：*ethA* 基因、*inhA* 基因启动子区突变；

- l) 卡那霉素、阿米卡星和卷曲霉素：*rrs* 基因抗性决定区和 *eis* 基因启动子突变，*whiB7*、*tlyA* 基因突变；
- m) 普托马尼：*ddn*、*fgd1*、*fbiA*、*fbiB*、*fbiC*、*fbiD* (*Rv2983*) 基因突变等；
- n) RGM 对大环内酯类药物：*erm* 基因、*rrl* 基因突变。

6.4.5 结果报告和解释

6.4.5.1 应根据检测结果，报告与所用方法学预期用途相匹配的结果，如相应的分枝杆菌菌种或复合群名称、药物耐药相关的基因及突变位点。建议参照下列方式进行报告：

- a) 阴性结果报告为：未检出 XX 分枝杆菌核酸和/或 XX 药物耐药相关的 XX 基因、XX 基因突变；阴性结果不能排除相应病原菌感染和/或相关药物耐药；
- b) 阳性结果报告为：检出 XX 分枝杆菌核酸和/或 XX 药物耐药相关的 XX 基因、XX 基因突变，例如，MTBC 核酸和异烟肼耐药相关的 *katG* 基因 p. Ser315Thr 错义突变检测阳性，报告为：检出结核分枝杆菌复合群核酸和异烟肼耐药相关的 *katG* 基因 p. Ser315Thr 错义突变；
- c) 可疑或无法明确判断的结果：建议重新采集标本送检或采用其他方法（如培养、表型药敏试验）验证或确认。

6.4.5.2 宜标注“未检出”、“检出”含义，如：“未检出”表明标本中不存在目标核酸，或其含量低于本试验的检出限，或标本中存在检测体系的抑制物或干扰物质；“检出”表明标本中存在目标核酸。

6.4.5.3 宜标注检测方法、检出限、检测靶标等信息。

6.4.6 注意事项

- 6.4.6.1 应依据序列相似性、覆盖度等指标评估检测结果的可靠性，必要时采用其他方法验证。
- 6.4.6.2 该技术仅能检测已知耐药基因突变，存在假阴性风险，不宜完全替代药敏试验。
- 6.4.6.3 若患者治疗效果不佳或检测结果与临床不符，宜采用培养等方法进行验证。
- 6.4.6.4 检测结果应结合患者临床表现、流行病学史及其他实验室检查结果进行综合分析。

6.5 免疫学检测

6.5.1 脂阿拉伯甘露聚糖 (lipoarabinomannan, LAM) 抗原检测

6.5.1.1 检测方法

常用侧向层析法，检测患者晨尿或随机尿中结核分枝杆菌细胞壁特异性 LAM 抗原。

6.5.1.2 适应症

- 6.5.1.2.1 HIV 阳性成人或儿童患者，出现肺结核或肺外结核症状和体征时，宜采集尿液检测 LAM 抗原，用于活动性结核病的辅助诊断。
- 6.5.1.2.2 HIV 患者，CD4⁺ T 细胞计数小于 200 个/ μ L 时，无论是否出现结核症状，宜采集尿液检测 LAM 抗原，用于活动性结核病的辅助诊断。

6.5.1.3 注意事项

- 6.5.1.3.1 该试验标本易获取，操作简单，为床旁快速检测方法。
- 6.5.1.3.2 尿液 LAM 试验不宜用于 HIV 阴性人群可疑结核病诊断。
- 6.5.1.3.3 对于 CD4⁺ T 细胞计数大于 200 个/ μ L 且无结核症状的患者，不宜使用尿液 LAM 试验辅助诊断结核病。
- 6.5.1.3.4 血液 LAM 试验敏感性低于尿液 LAM 试验。

6.5.2 IFN- γ 释放试验 (interferon-gamma release assay, IGRA)

6.5.2.1 酶联免疫斑点法 (enzyme-linked Immunospot, ELISPOT)

6.5.2.1.1 操作要点

6.5.2.1.1.1 采集患者肝素抗凝外周血 4 mL~6 mL，室温条件下 4 h 内分离外周血单个核细胞，洗涤细胞后计数。

6.5.2.1.1.2 将 2.5×10^5 细胞加入预包被有 IFN- γ 抗体的 96 孔培养板, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 16 h~20 h。

6.5.2.1.1.3 洗板后加入酶标抗体, 置 2 °C~8 °C 孵育 1 h。

6.5.2.1.1.4 洗板后加入底物, 在室温条件下避光反应 7 min。

6.5.2.1.1.5 蒸馏水冲洗终止反应, 待培养板干燥后读取斑点数。

6.5.2.1.2 结果报告和解释

6.5.2.1.2.1 根据检测结果, 报告为阳性或阴性。

6.5.2.1.2.2 阳性结果提示标本中含有被 MTB 致敏的结核特异性 T 淋巴细胞, 表明机体感染 MTB, 但不能区分活动性结核和潜伏性结核。

6.5.2.1.2.3 阴性结果表明标本中未检出结核特异性 T 淋巴细胞, 提示机体未感染 MTB, 但需注意由免疫抑制状态导致的假阴性可能。阴性结果不能排除结核感染。

6.5.2.1.3 注意事项

6.5.2.1.3.1 本试验宜用于潜伏性结核的诊断和筛查。

6.5.2.1.3.2 不可单独使用该方法诊断或排除结核病, 但当可疑结核病患者病原学检测结果为阴性, 或者可疑肺外结核病患者难以取材进行病原学检测时, 可采用该方法进行辅助诊断。

6.5.2.1.3.3 可疑结核性胸膜炎患者病原学检测为阴性时, 可采集胸腔积液进行 ELISPOT 检测。

6.5.2.1.3.4 宜定量报告斑点数值, 但不宜使用斑点数值区分活动性与潜伏性结核感染。

6.5.2.1.3.5 检测结果受免疫抑制状态影响较小, 但当患者合并免疫抑制状态时斑点数值降低。

6.5.2.1.3.6 尚无可行的室内质控方案, 实验室应制定标准化操作规程, 并遵照执行。

6.5.2.2 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

6.5.2.2.1 操作要点

6.5.2.2.1.1 将新鲜采集的患者外周血 (肝素抗凝) 转移至反应管, 充分混匀, 确保血液全部溶解覆盖管壁的刺激剂。将反应管置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 16 h~24 h。

6.5.2.2.1.2 离心后使用酶联免疫吸附试验检测血浆中 IFN- γ 浓度。

6.5.2.2.2 结果报告和解释

详见本标准第 6.5.2.1.2 条。

6.5.2.2.3 注意事项

6.5.2.2.3.1 不宜采用 IFN- γ 浓度区分活动性与潜伏性结核。

6.5.2.2.3.2 检测结果受免疫抑制状态影响较大, 当患者合并免疫抑制状态时不确定结果比例增高。

6.5.2.2.3.3 该法操作相对简便, 实验过程可引入全自动检测仪器, 应用于潜伏性结核筛查具有优势。

6.5.2.2.3.4 除 ELISA 之外, 也可使用化学发光等方法检测 IFN- γ 浓度。

7 药物敏感性试验

7.1 总则

分枝杆菌 AST 主要分为两类: 基于培养的表型检测方法和基于耐药基因的分子检测方法。由于分枝杆菌普遍生长缓慢, 表型检测方法需要 7 d~10 d 或 4 周, 而分子方法可检测培养物和临床标本, 快速提供药敏结果, 从而改善患者的治疗效果并减少耐药分枝杆菌的传播。

7.2 表型检测

7.2.1 固体培养基法

7.2.1.1 菌液制备

7.2.1.1.1 选择培养基上生长 1 周~2 周, 鉴定为分枝杆菌的新鲜菌落。

7.2.1.1.2 用无菌接种环挑取多个菌落加入含玻璃珠的磨菌管,拧紧管盖,在涡旋振荡器上振荡 20 s~30 s,静置 15 min。

7.2.1.1.3 加入 1 mL~2 mL 无菌生理盐水,拧紧管盖,轻轻混匀,静置 15 min。

7.2.1.1.4 用无菌吸管吸取上层菌液至无菌试管,避免吸取沉淀。比浊仪调整菌液至 1 麦氏浊度(相当于 1 mg/mL)。

7.2.1.1.5 十倍系列稀释:用 10 μ L 接种环取 1 mg/mL 菌液 2 环,加入无菌生理盐水 2 mL,制成 100 倍稀释液(10^{-2}),再从 100 倍稀释液中取 2 环加入 2 mL 无菌生理盐水,制成 10000 倍稀释液(10^{-4})。

7.2.1.2 接种

7.2.1.2.1 使用 10 μ L 接种环取菌液。应使液面适当凸出接种环,以确保取液量。接种前检查药敏培养基,弃去过多的冷凝水。

7.2.1.2.2 取高稀释度(10^{-4})菌液各一环,分别划线接种对照培养基和含药培养基。取低稀释度(10^{-2})菌液各一环,分别划线接种另一组对照培养基和含药培养基。

7.2.1.2.3 拧紧管盖,将培养基竖直放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱,培养 4 周。

7.2.1.3 结果报告和解释

7.2.1.3.1 按以下方式记录菌落生长情况:

- a) 无菌落生长,记为(-);
- b) 少于 50 个菌落生长,记为(+,实际菌落数);
- c) 50 个~100 个菌落生长,记为(1+);
- d) 100 个~200 个菌落生长,记为(2+);
- e) 大部分融合生长(200 个~500 个菌落),记为(3+);
- f) 融合生长(大于 500 个菌落),记为(4+)。

7.2.1.3.2 计算耐药百分比(以对照培养基和含药培养基上最大可数菌落数计算耐药百分比):
 耐药百分比=(含药培养基上生长的菌落数/对照培养基上生长的菌落数) \times 100%。

7.2.1.3.3 判定标准:耐药百分比>1% 判定为耐药。

7.2.1.4 注意事项

7.2.1.4.1 对照培养基应菌落生长良好且高稀释度对照培养基上菌落数 \geq 20 个,否则试验无效,重新检测。

7.2.1.4.2 若高、低稀释度对照培养基菌落数都不可数,以含药培养基上菌落数 \geq 20 个判断为耐药。若高稀释度耐药、低稀释度敏感,则试验无效,应重新检测。

7.2.2 液体培养基法

7.2.2.1 微量肉汤稀释法

7.2.2.1.1 药物选择

7.2.2.1.1.1 MTBC

MTBC 表型药物敏感性试验液体培养基法药物选择的基本原则如下:

- a) 优先检测药物:利福平、异烟肼、左氧氟沙星、贝达喹啉、利奈唑胺、氯法齐明、德拉马尼、莫西沙星;
- b) 次选药物:乙胺丁醇、D-环丝氨酸、特立齐酮、乙硫异烟胺、丙硫异烟胺;
- c) 替代药物:左氧氟沙星与莫西沙星、特立齐酮与 D-环丝氨酸、丙硫异烟胺与乙硫异烟胺可相互替代;
- d) 非常推荐检测普托马尼、吡嗪酰胺的敏感性,但普托马尼尚无标准化检测方法,吡嗪酰胺不可采用微量肉汤稀释法检测(检测方法见本标准第 7.2.2.2 条);
- e) 对于药物选择困难或治疗效果不理想的患者,宜根据最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值,结合药物安全性,制定或调整个体化给药方案,并扩大药物选择范围;

f) 推荐检测药物种类、优先顺序和浓度见本标准附录 C 中表 C.1。

7.2.2.1.1.2 RGM

MIC检测，宜包括阿米卡星、头孢西丁、环丙沙星、克拉霉素、多西环素、利奈唑胺、亚胺培南、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、替加环素和妥布霉素。

7.2.2.1.1.3 SGM

MIC检测，宜包括克拉霉素、利福平、阿米卡星、环丙沙星、多西环素、利奈唑胺、米诺环素、莫西沙星、利福布汀、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑。

7.2.2.1.2 试剂和菌液制备

7.2.2.1.2.1 选择鉴定为分枝杆菌的新鲜培养物（肉眼可见菌落），制备菌悬液。

7.2.2.1.2.2 用无菌接种环刮取菌落，乳化于含 0.2%吐温-80 和玻璃珠的无菌生理盐水中，涡旋振荡混匀至少 30 s。使用比浊仪调整菌液至 0.5 麦氏浊度。

7.2.2.1.2.3 MTBC：取 100 μL 菌悬液加入含清蛋白葡萄糖过氧化氢酶的 7H9 肉汤培养液中，涡旋混匀 30 s，获得 1×10^5 CFU/mL（范围 5×10^4 CFU/mL~ 5×10^5 CFU/mL）的接种液。

7.2.2.1.2.4 NTM：取 50 μL 菌悬液至相应肉汤中，混匀备用。

7.2.2.1.3 加样

7.2.2.1.3.1 根据鉴定结果选择适宜的药敏板。

7.2.2.1.3.2 使用移液器或自动菌液加样仪每孔加入菌悬液 100 μL ，30 min 内完成加样。

7.2.2.1.3.3 使用黏合密封膜覆盖所有孔，消毒擦拭后装入自封袋。

7.2.2.1.3.4 置于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 、非 CO_2 培养箱中孵育。

7.2.2.1.4 结果观察和报告

7.2.2.1.4.1 MTBC 和 SGM 孵育 7 d，RGM 孵育 72 h 后读取结果。

7.2.2.1.4.2 首先查看阳性生长对照孔。在阳性对照孔生长良好的前提下，读取含药孔 MIC 值。甲氧苄啶-磺胺甲噁唑读取与对照孔相比，生长抑制约 80% 孔为其 MIC 值。

7.2.2.1.4.3 根据国内外最新折点标准判定药敏结果（解释如下）。无折点标准时，仅报告 MIC 值。

- a) “敏感”：在使用现有折点和方法情况下，所检测的分枝杆菌在体外试验中对该药物敏感，使用标准的包含该药物暴露剂量的治疗方案成功的可能性较大。
- b) “耐药”：在使用现有折点和方法情况下，所检测的分枝杆菌在体外试验中对该药物耐药，使用包含标准的该药物暴露剂量的治疗方案可能无效。

7.2.2.1.5 注意事项

7.2.2.1.5.1 MTBC

MTBC表型药物敏感性试验液体培养基法注意事项如下：

- a) 治疗过程中，可对不同时期分离的菌株进行多次 MIC 测定，以监测其动态变化；
- b) 常规质控菌株：H37Rv ATCC 27294。

7.2.2.1.5.2 RGM

RGM表型药物敏感性试验液体培养基法注意事项如下。

- a) 脓肿分枝杆菌对阿米卡星 $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/mL}$ 时，需重新检测；若重复检测结果仍 $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ，应在报告中注明：“该菌株 MIC 值超出预期范围，若需使用本药物治疗，应通知实验室以便将分离株送相关实验室复核”；此类菌株可能存在 *rrs* 基因突变，与其他氨基糖苷类药物（包括妥布霉素、链霉素、卡那霉素、普拉佐米星）产生交叉耐药，导致治疗成功率更低，复发率更高，患者预后更差。
- b) 所有偶发分枝杆菌群、产黏液分枝杆菌群和耻垢分枝杆菌群分离株均对亚胺培南敏感；当亚胺培南 $\text{MIC} > 8 \mu\text{g/mL}$ 时，需重新检测（应 3 d 内判读结果）。

- c) 妥布霉素主要用于治疗龟分枝杆菌病，若分离株 MIC $>4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，需重新检测，并通过 *rpoB* 基因测序确认菌种；若复检结果仍 $>4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 且测序确认为龟分枝杆菌，则应在报告中注明：“该菌株 MIC 值超出预期范围，若需使用本药物治疗，应通知实验室以便将分离株送相关实验室复核”。
- d) 常规质控菌株：外来分枝杆菌 ATCC 700686；补充质控菌株：金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、粪肠球菌 ATCC 29212 和/或铜绿假单胞菌 ATCC 27853，可根据需要使用。

7.2.2.1.5.3 SGM

SGM表型药物敏感性试验液体培养基法注意事项如下。

- a) 从无菌部位检出或判定其具有临床意义时，应及时进行药敏试验；鸟分枝杆菌复合群（MAC）、堪萨斯分枝杆菌以及其他 SGM，已建立相应的药敏试验判读标准与折点；MAC 对大环内酯类药物均表现出敏感性，但单药治疗数月后会产生耐药性，联合治疗也可能导致耐药性产生。
- b) 常规质控菌株：海分枝杆菌 ATCC 927、鸟分枝杆菌 ATCC 700898（克拉霉素、利奈唑胺和莫西沙星的质控替代）。

7.2.2.2 仪器法

7.2.2.2.1 菌液制备

7.2.2.2.1.1 基于液体培养基的药敏试验：以仪器报阳后 24 h 内计为 0 d，孵育 1 d 的培养物无需稀释，直接接种；孵育 3 d~5 d 的培养物，1:5 稀释；超过 5 d 的培养物需重新培养。

7.2.2.2.1.2 基于固体培养基的药敏试验：刮取生长 1 周~2 周的新鲜菌落，置于磨菌管中，涡旋振荡 10 s~20 s，静置 20 min；吸取上部菌液，用无菌生理盐水调至 0.5 麦氏浊度，再用无菌生理盐水 1:5 稀释制备工作菌液。

7.2.2.2.1.3 其他要求依据仪器及试剂说明书。

7.2.2.2.2 药液准备

7.2.2.2.2.1 取药敏试剂盒，向链霉素（SM）、异烟肼（INH）、利福平（RFP）、乙胺丁醇（EMB）药瓶中各加 4 mL 无菌双蒸水或去离子水复溶。

7.2.2.2.2.2 吡嗪酰胺（PZA）药瓶中加入 2.5 mL 无菌双蒸水或去离子水复溶。

7.2.2.2.2.3 根据工作量分装药液， $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存，最长保存 6 个月，仅可冻融一次。

7.2.2.2.2.4 标记生长对照管及各药物名称缩写。

7.2.2.2.2.5 向各培养管加入 0.8 mL 药敏营养添加剂，再分别加入相应药液 0.1 mL。

7.2.2.2.3 接种

7.2.2.2.3.1 各含药培养管中加入工作菌液 0.5 mL。

7.2.2.2.3.2 SM、INH、RFP、EMB 生长对照管中加入 1:100 稀释的工作菌液 0.5 mL。

7.2.2.2.3.3 PZA 生长对照管中加入 1:10 稀释的工作菌液 0.5 mL。

7.2.2.2.3.4 拧紧管盖，轻轻颠倒数次混匀。

7.2.2.2.4 上机检测

7.2.2.2.4.1 扫描药敏培养架条形码，按仪器指示位置放入培养箱。

7.2.2.2.4.2 仪器自动孵育并报告药敏结果。

7.2.2.2.4.3 具体操作及结果报告依据仪器和试剂说明书。

7.2.2.2.5 结果报告和解释

遵循制造商的建议。

7.3 基因型检测

7.3.1 总则

基因型AST通过检测分枝杆菌耐药相关基因的突变，快速判定其对药物的敏感性。本方法适用于菌株及临床标本（包括抗酸染色阴性、培养阴性标本）的耐药性检测，可作为分枝杆菌感染，特别是DR-TB的快速筛查和辅助诊断方法。

7.3.2 耐药基因的核酸检测方法

详见本标准第6.4条。

8 实验诊断

8.1 总则

疑似分枝杆菌病患者实验诊断宜遵循以下原则：

- a) 快速诊断 MTBC；
- b) 准确鉴定 NTM；
- c) 识别 MTBC 和 NTM 复合感染或不同 NTM 菌种混合感染；
- d) 检测抗微生物药物耐药性。

8.2 推荐意见

8.2.1 联合涂片和分子生物学检测方法，快速鉴别 MTBC 和 NTM。

8.2.2 高度怀疑 MTBC 感染，而初次检测结果阴性者，宜多次和/或多部位采集标本检测或联合多种方法检测。

8.2.3 所有 MTBC 病原学阳性患者应立即开展耐药筛查。

- a) 优先采用分子生物学耐药检测技术识别 MDR-TB。对于 MDR-TB 患者，需进一步检测二线抗结核药物的敏感性。
- b) 若检测结果可疑，或临床治疗需要，应进行分枝杆菌培养、鉴定和药敏。必要时，送有能力的实验室检测。

8.2.4 高度怀疑 NTM 感染者检测结果为阴性时，宜再次采集同类型或不同类型标本检测分枝杆菌。

8.2.5 送检标本 NTM 检测阳性时，需结合菌种致病性、临床相关性、流行病学特征及患者免疫状态综合判断其为 NTM 病、定植或污染。NTM 病患者标本，宜采用分子生物学等方法鉴定至种或者亚种，必要时提供药物敏感性试验结果。

8.2.6 明确 NTM 病患者，宜进行表型 AST，并依据相关指南及药敏结果制定治疗方案。

8.2.7 基因型药敏检测提示敏感但临床治疗无效时，在排除用药依从性等因素后，应进行表型 AST。快速生长分枝杆菌 *erm* 基因阳性者，宜在治疗前及治疗第 14 d 分别进行表型 AST，以排除大环内酯类药物诱导耐药。

8.2.8 免疫学检测（如 IGRA）对病原学阴性 MTBC 感染的诊断具有补充价值。

9 质量保证

9.1 总则

9.1.1 实验室应确保结果及时、准确，并控制生物安全风险。

9.1.2 宜遵循 GB/T 22576.1、GB/T 22576.6 的要求建立管理体系，监控检验全过程。

9.1.3 应设立与实验室技术和能力相适应的质量指标。质量指标宜涵盖检验前、中、后全过程，建立相应的基线或正常值，制定定期监测的时间间隔：

- a) 宜分析 3 个月~6 个月数据，作为相应质量指标的基线或正常值；
- b) 宜每隔 1 个月~3 个月监测一次，通常监测结果保持一致，或轻微波动。

9.1.4 监测发现质量指标出现显著变化或偏离正常范围时，应核查相应程序，采取必要的纠正措施。

9.2 常用质量指标

9.2.1 涂片镜检

9.2.1.1 抗酸染色阳性率

9.2.1.1.1 抗酸染色阳性率=（抗酸染色阳性标本数/抗酸染色标本数）×100%。

9.2.1.1.2 异常变化可能原因：试剂或用水污染、技术问题等导致假阳性；显微镜、离心机性能不满足要求，技术问题，镜检时间、观察视野不足等导致假阴性。

9.2.1.2 培养阳性标本的涂片阳性率

9.2.1.2.1 该指标适用于同时开展抗酸染色和分枝杆菌培养的实验室，评估涂片镜检敏感性（与培养相比）。

9.2.1.2.2 培养阳性标本的涂片阳性率，包括 MTBC、NTM 培养阳性标本的涂片阳性率（计算公式如下）。通常，涂片阳性标本中 MTBC 多于 NTM。

a) MTBC 培养阳性标本的涂片阳性率=（MTBC 培养阳性标本中涂片阳性标本数/MTBC 培养阳性标本数）×100%。

b) NTM 培养阳性标本的涂片阳性率=（NTM 培养阳性标本中涂片阳性标本数/NTM 培养阳性标本数）×100%。

9.2.1.2.3 异常变化可能原因：接受治疗患者可出现涂片阳性而培养阴性，此外，交叉污染、玻片质量不满足要求、试剂或用水污染或质量不满足要求等导致涂片假阳性；显微镜、离心机性能不满足要求，技术问题，标本运送不规范等导致涂片阳性与培养阳性比率降低。

9.2.1.3 涂片阳性标本的培养阳性率

9.2.1.3.1 该指标适用于同时开展抗酸染色和分枝杆菌培养的实验室，评估涂片镜检特异性（与培养相比）。

9.2.1.3.2 涂片阳性标本的培养阳性率=（涂片阳性标本中 MTBC 和 NTM 培养阳性数/涂片阳性中 MTBC 和 NTM 培养标本数）×100%。通常为 90%~98%。

9.2.1.3.3 比率下降可能原因：涂片假阳性，或患者接受治疗导致培养假阴性。

9.2.1.4 抗酸染色报告及时率

9.2.1.4.1 抗酸染色报告及时率=（目标周转时间内抗酸染色报告数/抗酸染色报告数）×100%。

9.2.1.4.2 实验室收到标本至发出报告的目标周转时间（turnaround time, TAT）宜为 24 h。

9.2.2 分离培养

9.2.2.1 标本污染率

9.2.2.1.1 标本污染率=（报告为“污染”的标本数/分枝杆菌培养标本数）×100%。通常为 3%~5%（标本数量统计不包括重新处理标本）。

9.2.2.1.2 异常变化可能原因：标本运送延迟、标本处理不完全、试剂或培养基污染、仪器故障、NaOH 浓度不足等导致标本污染率>5%；过度去污染等导致标本污染率<3%。

9.2.2.2 含抗微生物药物液体培养基污染率

9.2.2.2.1 含抗微生物药物液体培养基污染率=（因污染丢弃的含抗微生物药物液体培养基数/接种的含抗微生物药物液体培养基数）×100%。通常为 7%~8%。

9.2.2.2.2 异常变化可能原因：抗微生物药物浓度不足或失效导致污染率上升。

9.2.2.3 固体培养基污染率

9.2.2.3.1 固体培养基污染率=（因污染丢弃的固体培养基数/接种的固体培养基数）×100%。通常为 2%~5%。

9.2.2.3.2 异常变化可能原因：详见本标准第 9.2.2.1.2 条。

9.2.2.4 MTBC 培养阳性率

9.2.2.4.1 MTBC 培养阳性率=（培养阳性标本数/MTBC 培养标本数）×100%。

9.2.2.4.2 异常变化可能原因：交叉污染、假阳性、试剂（包括培养基）或用水污染、标本采集过程中污染等导致阳性率上升；仪器和培养基、标本质量、标本处理、标本中细菌污染严重等导致阳性率下降。

9.2.2.5 NTM 培养阳性率

9.2.2.5.1 NTM 培养阳性率=（培养阳性标本数/NTM 培养标本数）×100%。

9.2.2.5.2 异常变化可能原因：见本标准第 9.2.2.4.2 条。

9.2.2.6 MTBC 培养鉴定及时率

9.2.2.6.1 MTBC 培养鉴定及时率=（目标 TAT 内 MTBC 鉴定数/MTBC 培养阳性报告数）×100%。

9.2.2.6.2 实验室收到标本至鉴定为 MTBC 的目标值宜为 21 d。

9.2.2.7 一线抗结核药物敏感性报告及时率

9.2.2.7.1 一线抗结核药物敏感性报告及时率=（目标 TAT 内一线抗结核药物敏感性报告数/一线抗结核药物敏感性报告数）×100%。

9.2.2.7.2 鉴定为 MTBC 至发出一线抗结核药物敏感性报告的目标 TAT 宜为 17 d。

9.2.3 核酸检测

9.2.3.1 培养确诊结核病患者同时送检 MTBC 核酸检测比率

9.2.3.1.1 该指标适用于开展 MTBC 培养的实验室。

9.2.3.1.2 培养确诊结核病患者同时送检 MTBC 核酸检测比率=（培养确诊结核病患者同时送检 MTBC 核酸检测例数/培养确诊结核病患者例数）×100%。

9.2.3.1.3 开展 MTBC 培养的医疗机构宜建立培养确诊结核病患者同时送检 MTBC 核酸检测比率的基线值（仅纳入初始诊断患者），制定目标值，定期监测，持续提升该比率，以缩短结核病诊断时间，改善患者预后，减少疾病传播。

9.2.3.2 分枝杆菌 NAAT 报告及时率

9.2.3.2.1 分枝杆菌 NAAT 报告及时率=（目标 TAT 内 NAAT 报告数量/分枝杆菌 NAAT 报告数量）×100%。

9.2.3.2.2 标本采集至发出报告的目标 TAT 宜为 48 h。

附录 A

(资料性)

分枝杆菌感染分子生物学实验诊断常用技术及特点

分枝杆菌感染分子生物学实验诊断常用技术及其特点见表 A. 1。

表 A. 1 分枝杆菌感染分子生物学实验诊断常用技术及特点

技术名称	原理	技术特点	临床应用
实时荧光PCR技术	在PCR反应体系中加入荧光基团,通过实时监测PCR过程中积累的荧光信号,对起始模板进行定量分析。包括非特异性检测(DNA结合染料法)和特异性检测(荧光探针法)	灵敏度高、可定量,需防止假阳性。根据配套检测的仪器设备,可实现高通量、高自动化,全程封闭及实时在线检测,自动输出结果	菌种鉴定、耐药性检测等
等温扩增技术	以RNA或者DNA为靶标和扩增子,在恒温条件下,利用多种酶(如逆转录酶和RNA聚合酶或链置换DNA聚合酶)的协同作用,精心设计多条引物,将靶RNA序列或者DNA序列进行指数级扩增,并通过实时荧光探针进行检测,从而实现MTB的极高灵敏度和特异性检测	在等温条件下完成DNA扩增,根据检测起始核酸类型,包括DNA和RNA,其中RNA检测需要先逆转录cDNA,再进行DNA扩增。其简单、快速,特异性高	结核分枝杆菌RNA或者DNA核酸检测
巢式PCR技术	通过两轮连续扩增(先外侧引物预扩增大片段,再内侧引物特异性扩增目标小片段),实现双重筛选	二次扩增,提高灵敏度和特异性	菌种鉴定、耐药性检测等
多重PCR技术	在一个单一的PCR反应体系中,加入多对引物,同时扩增多个不同的目标DNA序列	多靶标检测,提高检测覆盖病原体数量	菌种鉴定、多种耐药突变同时检测等
数字PCR技术	将一份样品分成成千上万个微小的独立反应单元,让每个单元包含0个、1个或几个目标分子,然后对每个单元进行独立的PCR扩增,最后通过计数“有信号”的单元数量,直接计算出目标分子的绝对拷贝数	可实现绝对定量,且灵敏度极高	菌种鉴定、耐药性检测等,在低菌量标本检测与精确定量、低频耐药突变检测方面有优势
逆转录PCR技术	以RNA为起始模板,先通过逆转录过程将其互补成cDNA(complementary DNA),再以cDNA为模板进行普通的PCR扩增。该技术将微量RNA信号放大到足以进行检测和分析的水平	先将RNA逆转录为DNA,再进行PCR扩增	结核分枝杆菌RNA检测
基于荧光探针熔解曲线的多重PCR技术	一种基于实时荧光PCR的衍生技术,用于在扩增反应结束后,通过测量荧光值随温度变化的情况来区分不同的扩增产物	高特异性,扩增和检测在同一反应管中进行,成本低,可同时实现菌种鉴定和耐药筛查	菌种鉴定、多种耐药突变检测
基因芯片技术	基于碱基互补配对核酸杂交原理,结合高通量、并行化的检测方式,实现了对大量基因信息的同时分析	短时间内可同时检测多种耐药性,以及MTBC和常见分枝杆菌,通量高	菌种鉴定、多种耐药突变检测
线性探针技术(LPA)	与传统的将标本DNA固定在膜上、用探针杂交的方式相反,LPA是将多种特异性探针固定在膜条上,然后用标记的标本DNA去杂交	短时间内可同时检测多种耐药性,以及结核分枝杆菌复合群,特异性高	菌种鉴定、多种耐药基因突变检测

表A.1 分枝杆菌感染分子生物学实验诊断常用技术及特点（续）

技术名称	原理	技术特点	临床应用
一代测序（Sanger测序）	利用双脱氧核苷酸（ddNTPs）随机终止DNA链延伸，产生不同长度的片段，通过毛细管电泳分离并读取序列	准确性极高（金标准）、读长较长（可达1000 bp），但通量低、成本高且无法检测低频突变（<20%），对于分枝杆菌混合感染的标本，可能存在漏检	主要用于分枝杆菌的菌种鉴定、耐药突变确认等
全基因组测序技术（WGS）	通过对分枝杆菌的整个基因组进行断裂、测序和重组装，获取其全部的遗传密码（约440万个碱基对），并将其与参考基因组比对，以识别所有的遗传变异	提供最全面、最完整的遗传信息，以及已知和未知的耐药相关突变。当前仅用于纯培养物检测。价格较贵，报告周期较长	菌种鉴定及耐药谱预测、基因分型与溯源、异质耐药检测。它被视为菌种鉴定、耐药性预测和分子流行病学研究的“金标准”
宏基因组二代测序（mNGS）	通过高通量测序技术直接检测标本中所有微生物的DNA/RNA，无需预设病原体，通过比对数据库识别病原体。其核心原理是通过随机引物扩增标本中的核酸，结合生物信息学分析，检测多种病原体	优势：广谱病原体覆盖能力，对混合感染、罕见病原体及疑难感染（如FUO）提供快速诊断线索。 局限：分枝杆菌检出率受核酸丰度、数据库完整性限制；阴性结果不能排除感染；需结合培养/PCR验证结果；成本较高、周期较长	用于在分枝杆菌合并其他病原体感染的诊断，尤其是合并罕见病原体感染
靶向二代测序技术（tNGS）	通过PCR或探针捕获的方法富集分枝杆菌基因组中与耐药性和菌种鉴定相关的特定目标区域，然后对这些富集后的片段进行高通量测序，从而高效、精准地获取关键基因的序列信息	极高的检测深度和敏感度，通量大、数据量小，通过特异性引物或者探针富集，可定制化系列检测靶标。较mNGS测序成本更低，且操作更简便，适合大规模临床应用。可快速完成耐药性检测和病原体鉴定，缩短诊断时间	耐药性检测、菌种鉴定
纳米孔测序技术	不依赖于PCR扩增、荧光标记或合成反应，而是直接测量单分子DNA或RNA通过微小孔道时引起的电信号变化	超长读长、测序时间短、高通量、直接对DNA和RNA天然序列测序，高灵敏度，携带方便，但原始错误率较高，同时数据分析复杂，对生物信息学分析能力要求高	菌种鉴定、耐药性检测、监测病原传播和溯源

附录 B

(资料性)

不同复杂程度核酸检测系统的临床应用

不同复杂程度核酸检测系统的临床应用见表 B.1。

表 B.1 不同复杂程度核酸检测系统的临床应用

复杂程度	应用场景	适用标本类型	实验室要求	人员要求	操作步骤	标本前处理	检测过程	结果输出方式	技术类别 ^a
低复杂度	基层医院或者实验室功能布局少的医疗机构	常见临床采集标本	无需PCR实验室	普通实验室人员经过简单培训后,可进行操作	操作仅分为标本前处理和上机检测	标本前处理仅需将标本前处理液与临床标本简单混合处理即可	检测过程全封闭,无需对扩增体系进行开盖加成分操作	检测过程实时监测,自动输出结果或者通过肉眼与阴阳性对照对比,即可获得结果	等温扩增(DNA)、快速实时荧光定量PCR便携式系统
中等复杂度	实验室布局较完善,且设置PCR实验室	常见临床采集标本或者纯培养物	需生物安全实验室及PCR实验室	实验人员需经过严格、系统培训后方可进行实验操作	操作分为标本前处理,配制扩增体系,模板与扩增体系混合后,上机操作	标本需经多个步骤处理,获得提取的核酸	检测过程全封闭或者需加入扩增体系中其他引物或者成分,进行开盖操作	检测过程实时监测,自动输出结果	多重PCR、等温扩增(RNA)、线性探针技术、基因芯片技术、熔解曲线技术
高等复杂度	实验室布局较完善,且设置PCR实验室,配备特殊的仪器设备平台	常见临床采集标本或者纯培养物	需生物安全实验室及PCR实验室	实验人员需经过培训后,才可进行实验操作,对特殊仪器操作及生物学分析要求较高	操作分为标本前处理,配制扩增体系,模板与扩增体系混合(或需制备特殊扩增模式),开放操作;尤其是标本文库制备要求较高	标本需经多个步骤处理,获得提取的核酸	检测过程全封闭或者需加入扩增体系中其他引物或者成分,进行开盖操作	检测过程实时监测,自动输出结果或者输出FASTA文件后,通过生物信息学分析软件分析,获得相应结果	数字PCR、巢式PCR、逆转录PCR、测序技术

^a 各种检测技术可组合使用。

附录 C

(资料性)

结核分枝杆菌复合群微量肉汤稀释法推荐检测药物及其浓度

结核分枝杆菌复合群微量肉汤稀释法推荐检测药物及其浓度见表 C.1。

表 C.1 结核分枝杆菌复合群微量肉汤稀释法推荐检测药物及其浓度

推荐药物 ^a 中文名	推荐药物 英文名	推荐药物 英文缩写	推荐级别	推荐浓度范围 /(mg/L)
利福平	Rifampicin	RIF	最高	0.016~2
异烟肼	Isoniazid	INH	最高	0.016~2
左氧氟沙星	Levofloxacin	LFX	最高	0.006~8
贝达喹啉	Bedaquiline	BDQ	最高	0.0008~1
利奈唑胺	Linezolid	LZD	最高	0.06~4
氯法齐明	Clofazimine	CFZ	最高	0.0008~1
德拉马尼	Delamanid	DLM	最高	0.002~0.25
乙胺丁醇	Ethambutol	EMB	较高	0.125~8
D-环丝氨酸	D-cycloserine	DCS	较高	1~64
乙硫异烟胺	Ethionamide	ETO	较高	0.125~16
卡那霉素	Kanamycin	KAN	一般 ^b	0.125~16

^a 以推荐检测顺序依次排列。

^b 已不推荐用于治疗结核病。由于体外药敏结果表现较好，用于替代AMK体外药敏检测。

参 考 文 献

- [1] 人间传染的病原微生物目录（国卫科教发〔2023〕24号）
- [2] 中国结核病预防控制工作技术规范（国卫办疾控函〔2020〕279号）
- [3] Karen C. Carroll, Michael A. Pfaller. *Manual of Clinical Microbiology*. 13th edition, 2023.
- [4] Amy L. Leber, Carey-Ann D. Burnham. *Clinical Microbiology Procedures Handbook (CMPH)*, 5th edition, 2023.
- [5] WS 288—2017 肺结核诊断.
- [6] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes*, 2nd Edition, M24S, 2023.
- [7] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes*, 3rd edition, M24, 2018.
- [8] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria*, 2th Edition, M48, 2018.
- [9] World Health Organization (WHO). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment and care*, 2025.
- [10] World Health Organization (WHO). *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance*. 2023.
- [11] World Health Organization (WHO). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: Diagnosis—rapid diagnostics for tuberculosis detection*, 2021.
- [12] World Health Organization (WHO). *WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment—drug-resistant tuberculosis treatment*, 2020.
- [13] World Health Organization (WHO). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment—drug-resistant tuberculosis treatment*, 2020.
-