广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

淋病实验室检测技术
规范化性病实验室创建要求

朱邦勇
广西皮肤病防治研究所/皮肤病医院

2019-11-1　南宁

主要内容

概述

- 病原体特征
- 感染途径

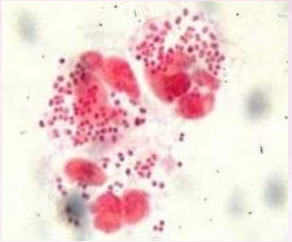
检测方法

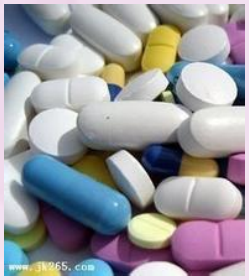
- 涂片染色、培养法、核酸检测
- **抗原检测？**

耐药监测

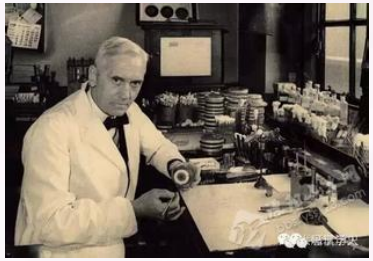
- 药敏检测方法
- **广西淋球菌耐药监测工作**

淋病——历史





3500年前 2500年前 1879 1882 1936 1943 2010 2011



淋 病

- 淋病（gonorrhoea）是一种经典的性传播疾病， 由淋病奈瑟菌（淋球菌）感染所致，主要表现为泌尿生殖系统黏膜的化脓性炎症。

	无并发症淋病	有并发症淋病	其他
男性	淋菌性尿道炎	附睾炎、精囊炎、前列腺炎	眼结膜炎、咽炎、直肠炎
女性	宫颈炎 、尿道炎、前庭大腺炎、肛周炎	淋菌性盆腔炎（子宫内膜炎、输卵管炎、输卵管卵巢囊肿、盆腔腹膜炎、盆腔脓肿）	
儿童	尿道炎、包皮龟头炎、外阴阴道炎		新生儿眼炎

约50%女性感染者无明显症状

淋病奈瑟菌

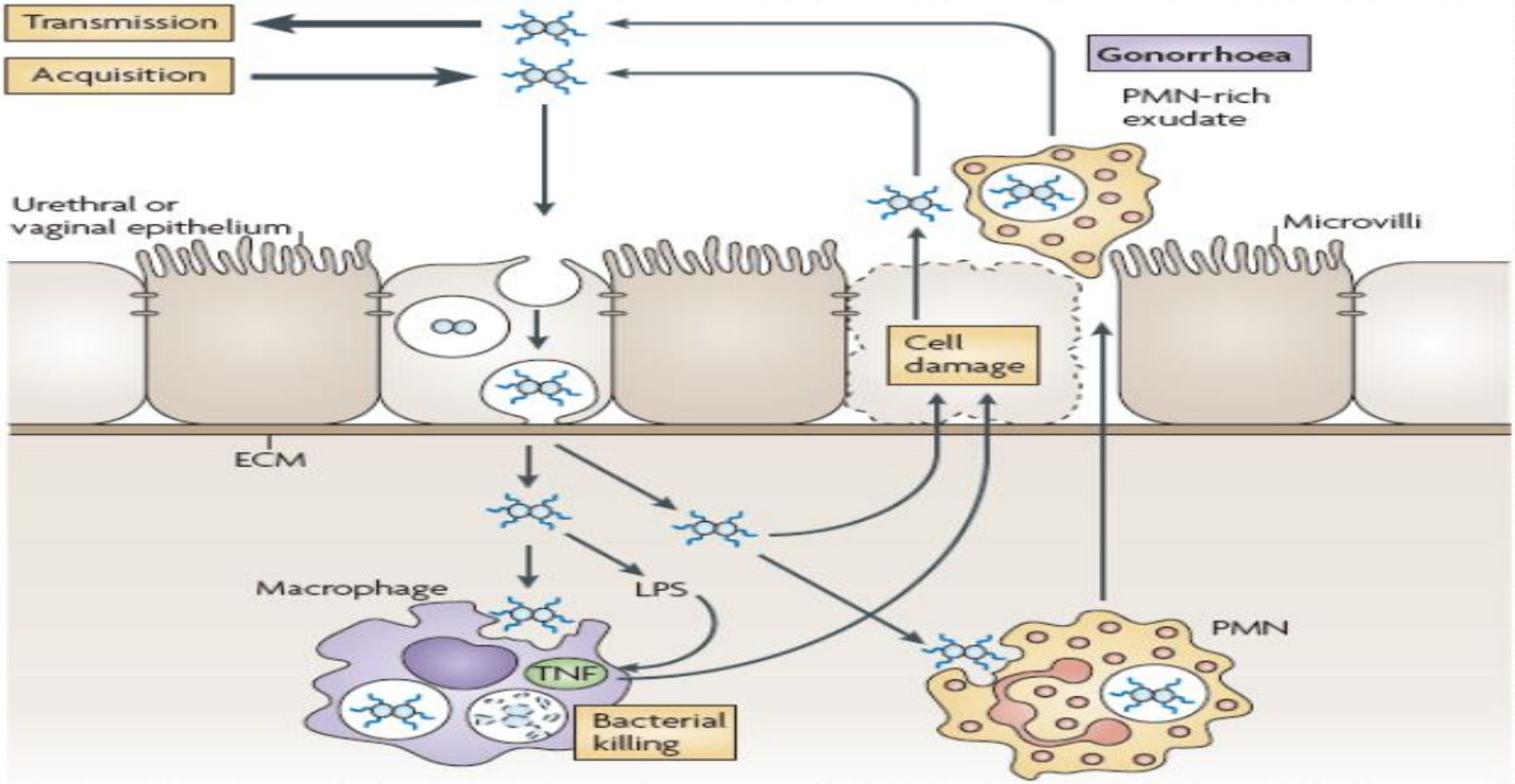
奈瑟菌属

- 氧化酶和触酶试验均阳性的需氧球菌，包括脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、乳酰胺奈瑟菌、灰色奈瑟菌和粘液奈瑟菌等十余种。

淋病奈瑟菌

- 革兰阴性双球菌、呈肾型、凹面相对、成双排列，可有荚膜和菌毛。
- 营养要求高（湿润，35－36℃，5% CO2，pH 6.5－7.5）
- 对外界抵抗力极弱（干燥环境存活1－2小时，50℃ 5分钟杀灭，100℃即刻死亡）。

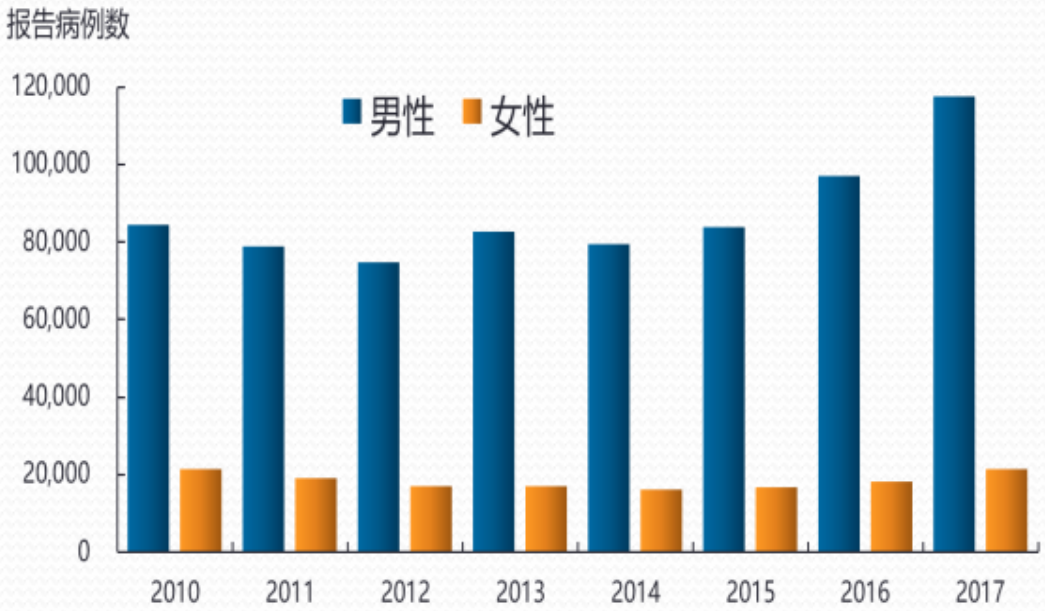
淋病奈瑟菌的侵入与传播过程



Nature review microbiology volume 7 | April 2009 | 275

全国淋病报告病例数

- 淋病报告病例数继续上升，特别是男性病例上升更加明显；
- 2017年报告病例138,855例，较2016年增长20.72%；
- 淋病报告病例数男女比例自2014年以来一直≥5:1，且有增大的趋势，说明女性病例发现明显不足。



淋病的实验室检测方法

检测方法				
涂片革兰染色	培养法	核酸检测	抗原检测	快速检测（氧化酶、触酶）

样本采集

临床类型	取材部位
男性异性恋	尿道、咽部（口交史）
男性同性恋	尿道、直肠、咽部
女性	宫颈、尿道、直肠、咽部、前庭大腺、尿道旁腺
幼女	阴道
新生儿眼炎	眼结膜、母亲（宫颈、尿道、直肠标本）

- 淋球菌的易感细胞是柱状上皮细胞。
- 对其同一患者行多部位取材可增加检出阳性率。
- 男性取材前两小时不应排尿。
- 避免使用对淋球菌生长有抑制作用的防腐剂和润滑剂。

标本的运送

- 淋球菌的抵抗力弱，对热敏感，不耐干燥。取材后标本若不能立即接种于选择性培养基上时，需采用运送系统。置于非营养型运送培养基中的标本应在12小时内送到实验室，接种于选择性培养基，分离阳性率可达90%以上。超过24小时则分离阳性率下降。

纯培养样本在肉汤培养基中或石蜡油斜面上常温可以存活一周以上

直接显微镜检查

染色方法:

革兰染液

美兰染液

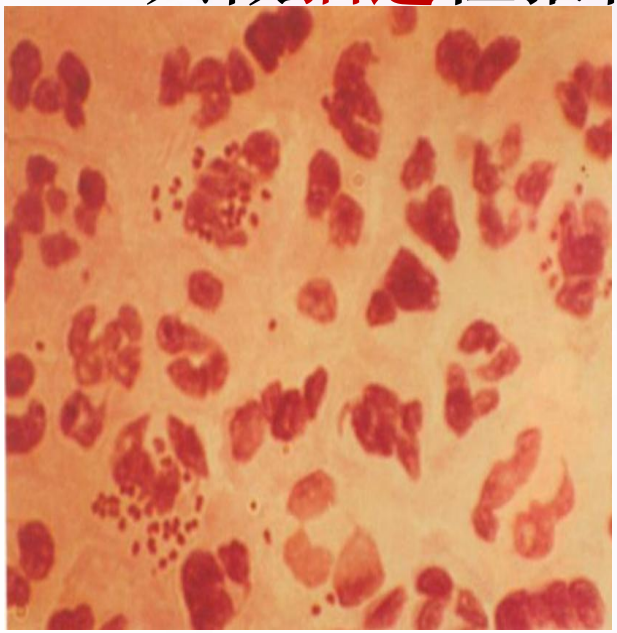
姬姆萨染液

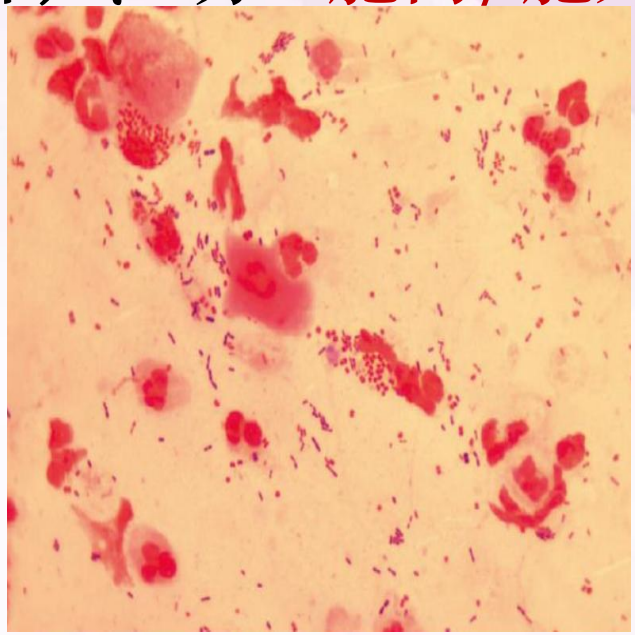
荧光抗体

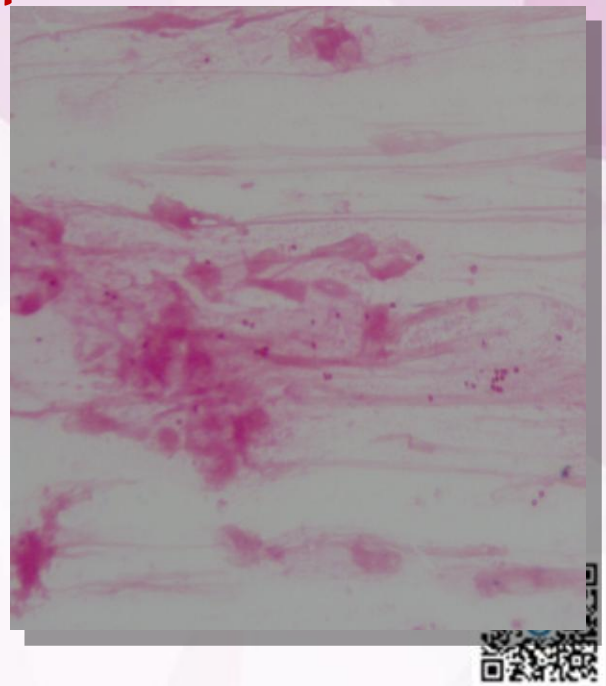
革兰染色为一传统方法，因简便、快捷及价廉、仍然为最广泛采用的方法。革兰染色将菌分为二大类，即染成紫色的革兰阳性菌及染成红色的革兰阴性菌。

注意事项

- 涂片时应将拭子在玻片上轻轻滚动，不要用力涂擦，防止细胞破裂，细菌逸出。
- 只做描述性报告，注明“胞内/胞外”。







临床应用

典型形态

- 革兰染色阴性，在多形核白细胞成内成双排列，凹面相对，呈肾形，常见于急性未经治疗的感染者；

不典型形态

- 革兰阴性球菌数量少，排列不规则，单个、四联、八叠，常位于细胞外，常见于慢性感染者、耐药菌株感染者和接受不规则治疗者。

临床应用

- 男性淋菌性尿道炎的尿道标本敏感性及特异性可高达95%～99%，具诊断价值。
- 宫颈标本、无症状男性尿拭子及取自直肠的涂片时敏感性仅40～70%。

淋球菌涂片只能确诊男性淋菌性尿道炎

- 不推荐直接显微镜检查诊断直肠和咽部，以及女性宫颈淋球菌感染。
- 不能用于疗后判愈。
- 如果在多形核细胞外见到形态典型的革兰阴性双球菌，需做培养进行确认。

淋球菌培养

- 培养法为诊断淋病的金标准.
- 对女性淋病的确诊应做淋球菌培养
- 从选择性培养基上分离出淋球菌即可诊断淋病。
- 培养的敏感性81—100%。
- 培养的优点有：

— 特异性极高（100%）；
— 可发现无症状淋球菌感染患者；
— 可确诊儿童性虐待；
— 可用于进一步作药敏试验；
— 可用于治疗后的判愈试验。

淋球菌培养

- 培养条件 ： 35 ～36℃，含5%～10% CO_2，湿润（70%湿度）的环境。

  CO_2环境可由CO_2培养箱、CO_2产气袋及烛缸提供。使用烛缸时，应使用白色、无芳香味的无毒性蜡烛。在烛缸底部放些浸水棉球以保持一定的湿度。

- 培养时间：24～48小时

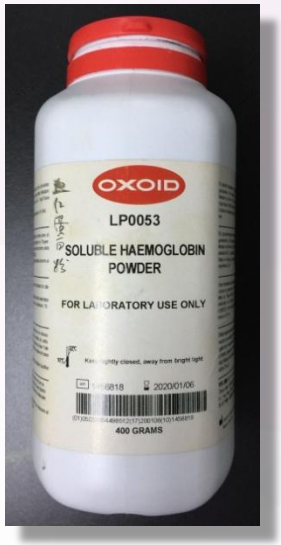
培养基

应使用营养丰富的选择性培养基

	ThayerMartin（TM）	改良TM（MTM）
成份	GC琼脂基础粉	
	血红蛋白粉	脱纤维10%绵羊血
	VITO生长添加剂（增菌剂）	
	VCNT选择添加剂（混合抗生素）	
颜色	巧克力色	血红色

VCNT选择添加剂：万古霉素、多粘菌素、三甲氧苄胺嘧啶和制霉菌素。

培养基


OXOID
LP0053
SOLUBLE HAEMOGLOBIN
POWDER
FOR LABORATORY USE ONLY
400 GRAMS

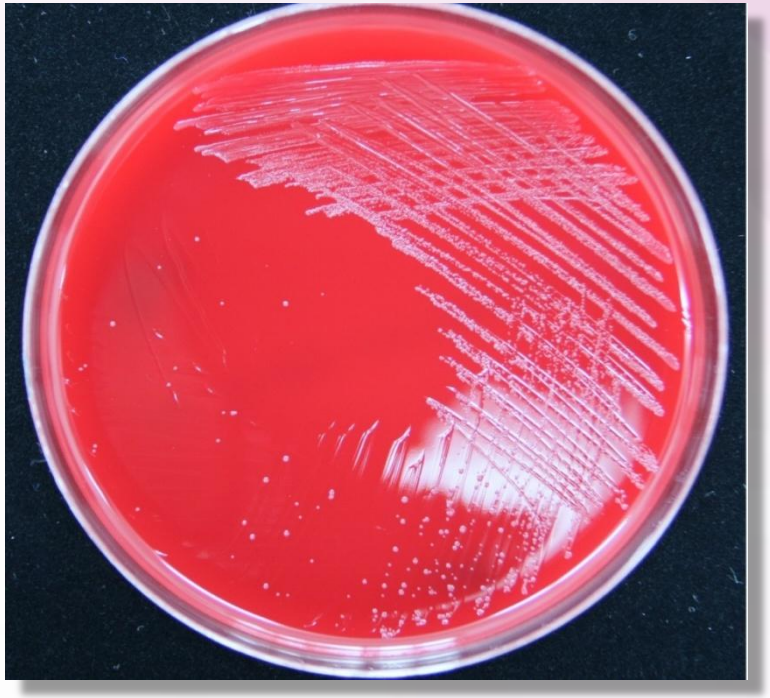
OXOID
GC AGAR
BASE
OXOID
Freeze dried
Supplements
IN VITRO DIAGNOSTICUM
OXOID
Selective
Supplements
OXOID
IN VITRO DIAGNOSTICUM

培养基

TM

MTM

培养基



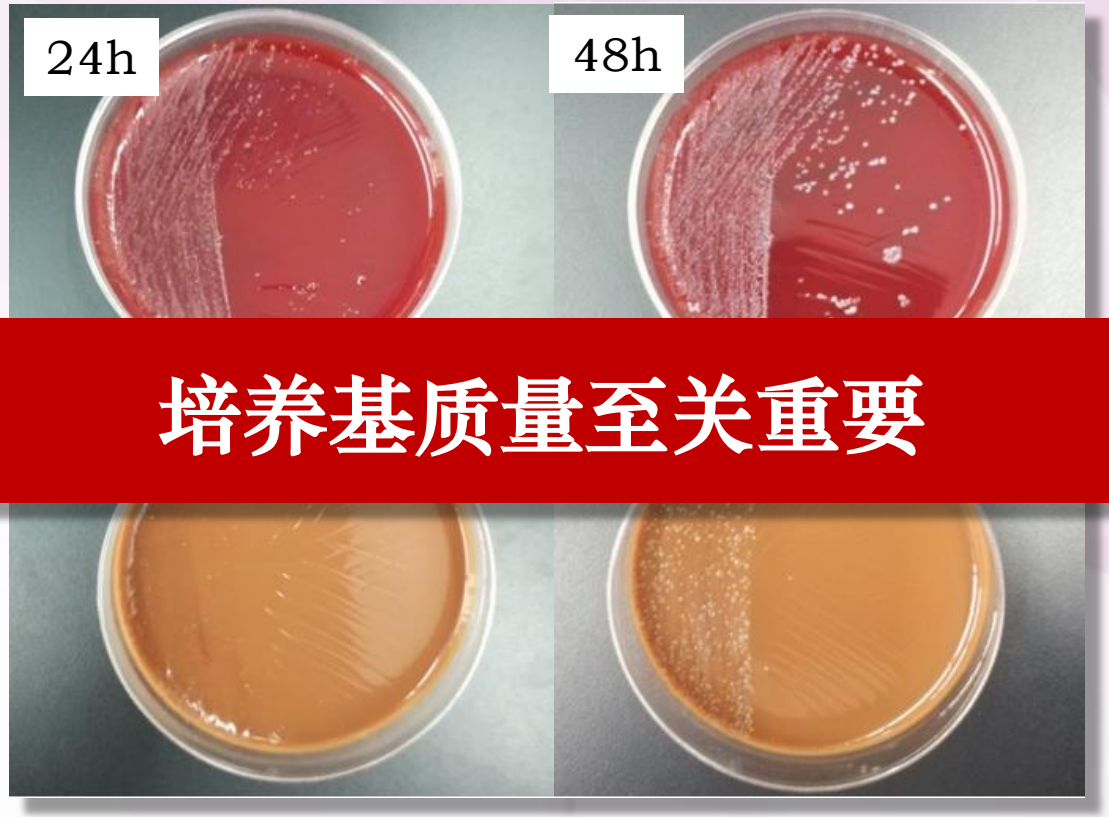
血平板

MTM

培养基

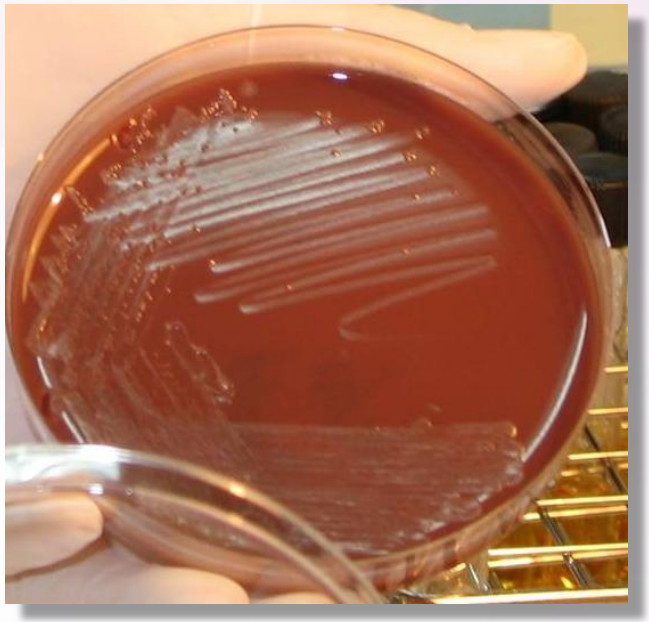
MTM

某品牌TM



培养基质量至关重要

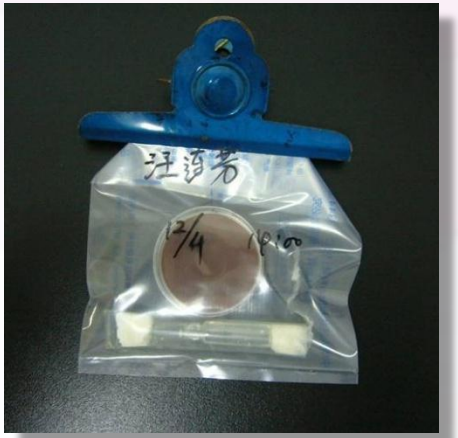
标本接种



- 取材后标本应尽早接种，如要转运需接种到运送培养基中
- 淋球菌对温度敏感，取材后标本应尽快送到实验室并接种于事先预温的培养基中
- 将取材的拭子涂布于平皿的1/4范围，然后用接种环分区划线，以保证获得较纯的单个菌落
- 避免使用棉拭子采样，其所含脂肪酸对淋球菌有抑制作用

培养环境

- 培养条件：35－36℃、5%－10%CO2、湿润（湿度70%）



CO_2气袋

烛缸

CO_2培养箱

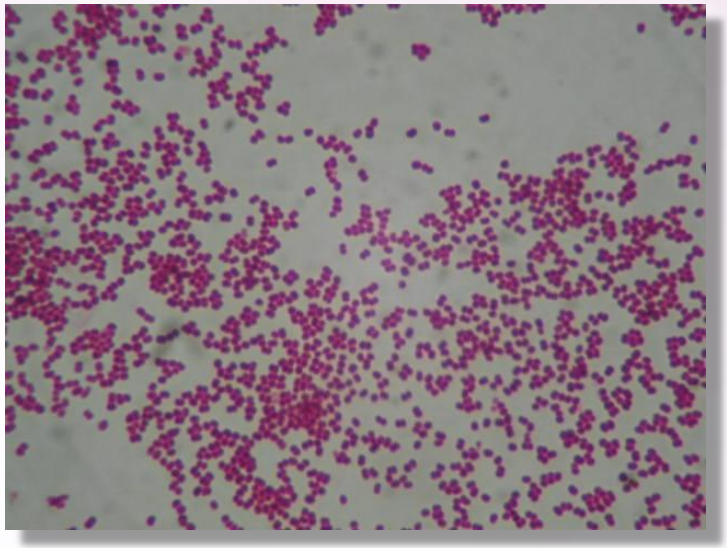
鉴定依据

初步鉴定依据	确证试验
菌落特征	糖发酵试验
镜下形态	自动化细菌鉴定/质谱技术
氧化酶试验	核酸检测

菌落特征

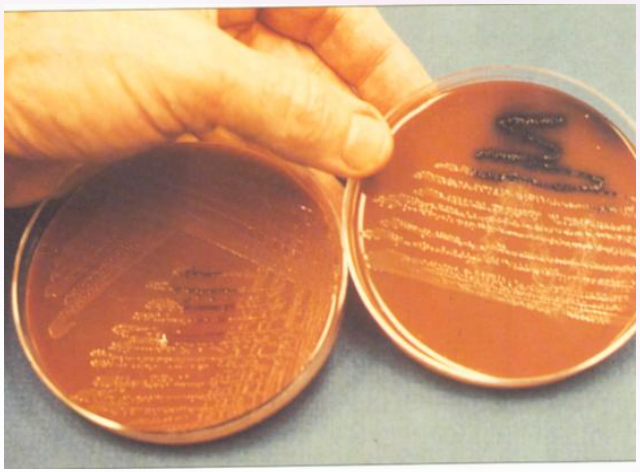
- 生长24h时直径大约为0.5－1mm，呈圆形、凸起、 湿润、光滑、半透明或灰白色菌落，有黏性。
- 培养48h后菌落直径可达3mm，边缘平滑或呈锯齿状，表面粗糙
- 培养24h后检查平皿，此时没有菌生长的平皿应继续培养至48h，仍无菌生长才可丢弃，作为淋球菌培养阴性的报告。

镜下形态



- 挑取菌落革兰染色后镜检油镜下可见革兰阴性、肾形、凹面相对、成双排列，部分呈单球、四联或八叠形。
- 超过48小时的菌落，淋球菌会出现自溶现象。

氧化酶试验



原理

- 淋球菌具有氧化酶，能将氧化酶试剂氧化成醌类化合物，出现颜色反应。
- 盐酸二甲基对苯二胺（紫红色），**盐酸四甲基对苯二胺**（紫兰色）即为阳性反应。

注意事项

- 试剂应新鲜配置，避光冷藏保存。
- 氧化酶试验非特异性反应，所有奈瑟菌属细菌及许多其他细菌，包括多数弧菌、布氏菌属、绿脓杆菌及嗜血杆菌属等氧化酶反应亦呈阳性。
- 如氧化酶阴性，一般可排除淋球菌。
- 氧化酶试剂对细胞有毒性，可迅速杀死淋球菌，需保留菌株时不要将试剂滴于菌落上。

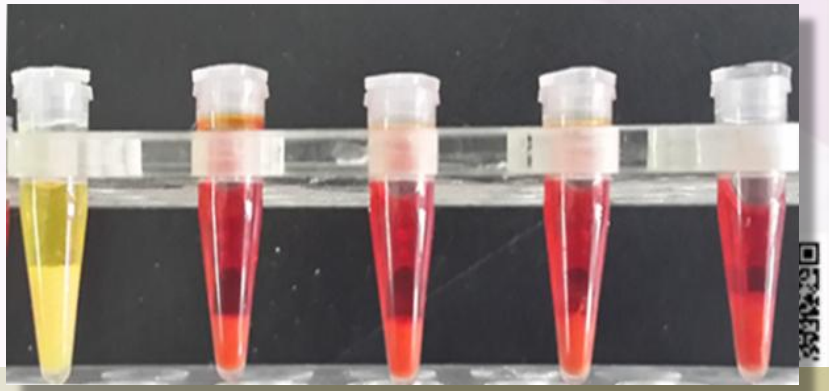
糖发酵试验

原理

- 利用淋球菌仅发酵葡萄糖，不发酵其他糖类的生物学特性

注意事项

- 用于试验的糖类纯度要高，至少为分析纯级。
- 菌悬液浓度要足够高。
- 待测菌应为纯培养物，不能用选择性培养基上的初代分离菌，避免因杂菌污染导致假阳性。
- 应用18-24h培养物，超过48h淋球菌过老自溶会导致假阴性反应。



糖发酵试验

临床应用

- 选择性培养基上分离出的氧化酶阳性、革兰阴性的双球菌，若糖发酵试验阳性可确定为淋球菌。
- 糖发酵试验的特异性为99－100%，某些淋球菌菌株反应弱，可呈现阴性葡萄糖反应，需用另外的试验加以鉴定。
- 麦芽糖阴性的脑膜炎球菌也会被误鉴定为淋球菌。

细菌	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖
淋病奈瑟菌	+	–	–	–
脑膜炎奈瑟菌	+	+	–	–
乳酰胺奈瑟菌	+	+	+	–
灰色奈瑟菌	–	–	–	–
卡他布兰汉菌	–	–	–	–

淋球菌培养临床应用

- 世界卫生组织推荐诊断淋病的金标准，特异性100%，敏感性81-100%；
- 可发现无症状淋球菌感染患者；
- 可用于进一步做药敏试验；
- 可用于治疗后的判愈试验，淋球菌培养法判愈应在治疗结束5日后进行，
- 对于取自泌尿生殖道的标本，在选择性培养基上分离出氧化酶阳性的革兰阴性双球菌，一般可诊断为淋球菌，准确性98%。
- 应对培养的菌株经糖发酵等确证试验进一步鉴定。

对女性淋病、直肠、咽部淋球菌感染的诊断应做培养

非培养检测技术-核酸检测

核酸检测的特点

- 不依赖于活的病原体的存在，无需特殊运送条件；
- 仅适合尿道或宫颈标本，以及尿液；
- 不能进行抗生素敏感性试验
- 用于判愈试验需在治疗后至少3 周以上进行.

淋球菌核酸检测技术临床应用

- 不依赖于活的病原体的存在，无需特殊运送条件；
- 不仅适合尿道或宫颈标本，以及尿液；
- 不能进行抗生素敏感性试验
- 用于判愈试验需在治疗后至少3 周以上进行.

技术准入制度，质量要求严格。

实验室检测方法综合分析

- 涂片革兰染色
- 淋球菌培养
- 淋球菌核酸检测
- 淋球菌抗原检测——有待完善，阳性标本需确证
- 淋球菌快速检测（氧化酶、触酶）——特异性存在问题，不建议

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

淋病诊断标准-WS 268_2019

ICS 11.020
C 59

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 268—2019

淋病诊断

Diagnosis for gonorrhoea

2019-01-02 发布　　2019-07-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会　发布

淋病实验室检测方法

病原学检测

- 直接涂片镜检
- 淋球菌培养
- 核酸检测技术

淋病诊断标准

	疑似病例	确诊病例
流行病学史	√	√
临床表现	√	√
实验室检查（涂片/培养/核酸）		√

注：√=符合

淋球菌耐药检测方法

- 琼脂纸片扩散法
- E test
- 琼脂稀释法/液体稀释法
- 分子生物学方法(耐药基因检测)

淋球菌耐药监测的实验室技术

1. 纸片扩散法

- WHO法
- CLSI法

特点：定性，快；适合于临床检测

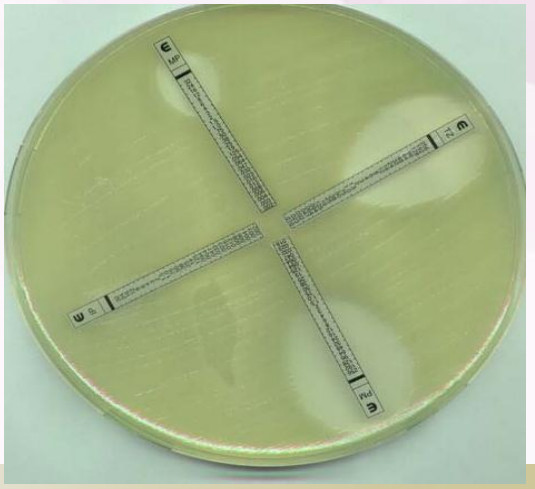
注意：培养基、质量、操作等

2. E-test纸片扩散法

E-test纸片扩散法：

特点：定量，快，适合与临床检测，成本高；

注意：试剂条、培养基、判读标准等。



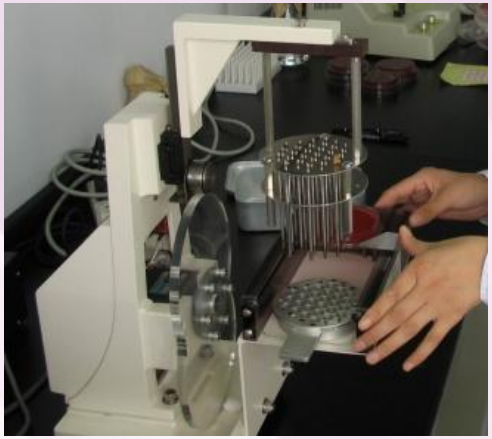
3. 琼脂稀释法

琼脂稀释法：

特点：定量，集中测定；

不适合与临床检测

注意：操作技术、各类试剂、判读水平等



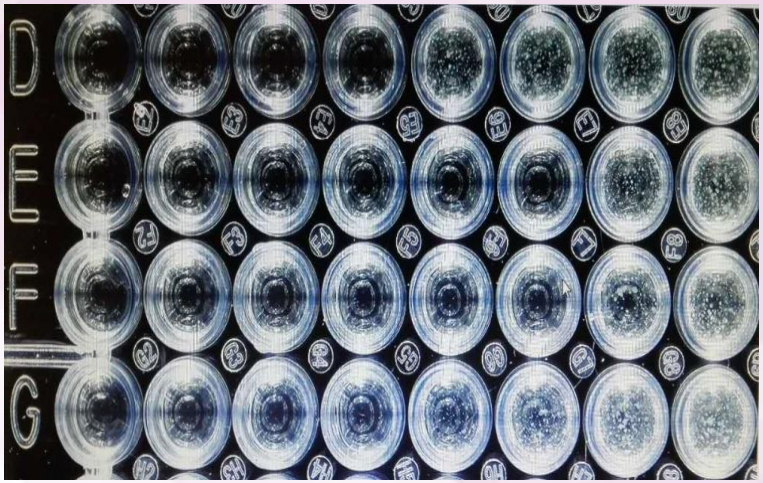
4. 液体稀释法

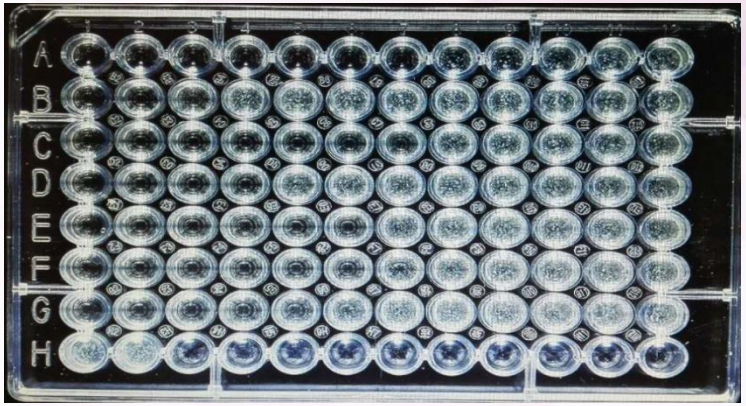
液体稀释法：

特点：定量，单一测定；

适合与临床检测

注意：试剂质量、判读、操作等。





广西淋球菌耐药监测点网络分布管理

1、通过疫情查询选择淋球菌菌株收集单位
2、规范化性病实验室现场检查确定参加单位
3、通过文件形式要求各市的工作任务
4、通过培训和网络交流进行技术层面的改进
5、定期进行菌株收集情况通报

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

广西淋球菌耐药点分布图

2017年菌株来源分布：7个市，13个单位，166株

南宁
钦州
北海
崇左
玉林
贵港
柳州

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

广西淋球菌耐药分布图

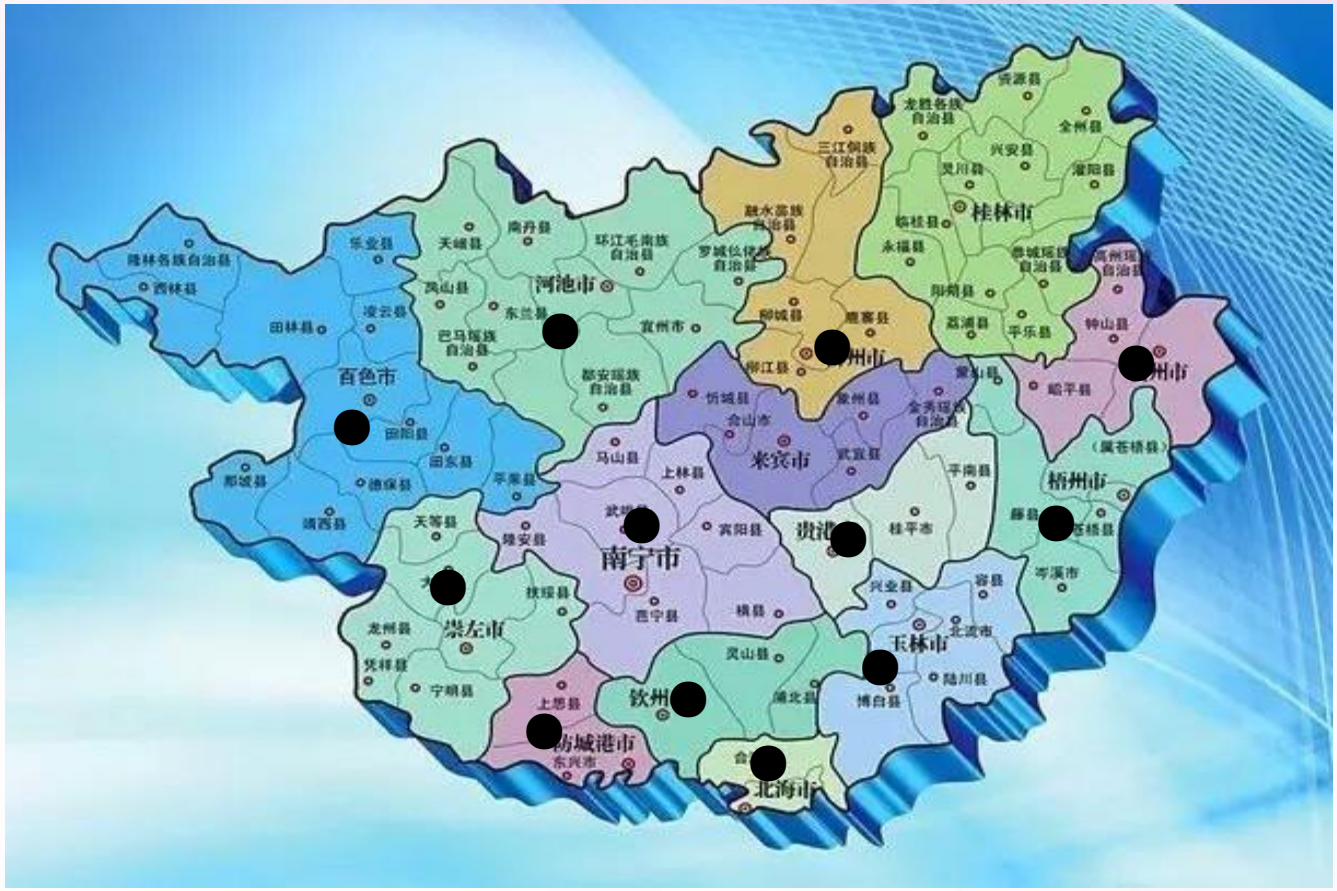
2018年菌株来源分布：**8**个市，**24**个单位，**234**株

南宁
钦州
北海
崇左
玉林
防城港
贵港
柳州

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

广西淋球菌耐药分布图

2019年菌株来源分布：12个市，30个单位



南宁
钦州
北海
崇左
玉林
贵港
防城港
柳州
百色
河池
梧州
贺州

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

菌株来源网络分布管理

广西壮族自治区

卫生和计划生育委员会文件

桂卫疾控发〔2017〕16号

自治区卫生计生委
关于印发《2017年广西壮族自治区
麻风病性病防治工作量化考核细则》的通知

各市卫生计生委：

根据国家卫生计生委疾控局对2017年麻风病、性病防治工作的部署以及中央转移支付项目对麻风病、性病防治工作的有关要求，我委组织制定了《2017年广西壮族自治区麻风病性病防治工作量化考核细则》，现印发给你们，请遵照执行。

广西壮族自治区卫生和计划生育委员会
2017年6月12日

6.实验室能力建设（8分）

指标：2017年，梅毒血清学检测实验室能力验证的参与率不低于90%；梅毒血清学检测实验室能力验证的合格率不低于95%；按照《性传播疾病临床诊疗与防治指南》要求规范开展梅毒、淋病实验室检测工作，（梅毒检测必须开展非梅毒螺旋体血清学试验及梅毒螺旋体血清学试验；淋病检测应根据实验室条件按要求开展相关检测方法，如直接涂片法、培养法和核酸检测法等，开展PCR方法进行核酸检测的，应通过相关部门审核认证通过后才能开展，男性尿道分泌物涂片镜检，至少保存涂片三个月以上）；每个市至少创建一家市级性病中心实验室，并配合做好性病实验室评定工作；配合做好WHO西太区中国淋球菌耐药监测广西区域工作任务，每个市至少负责收集20株淋球菌菌株。

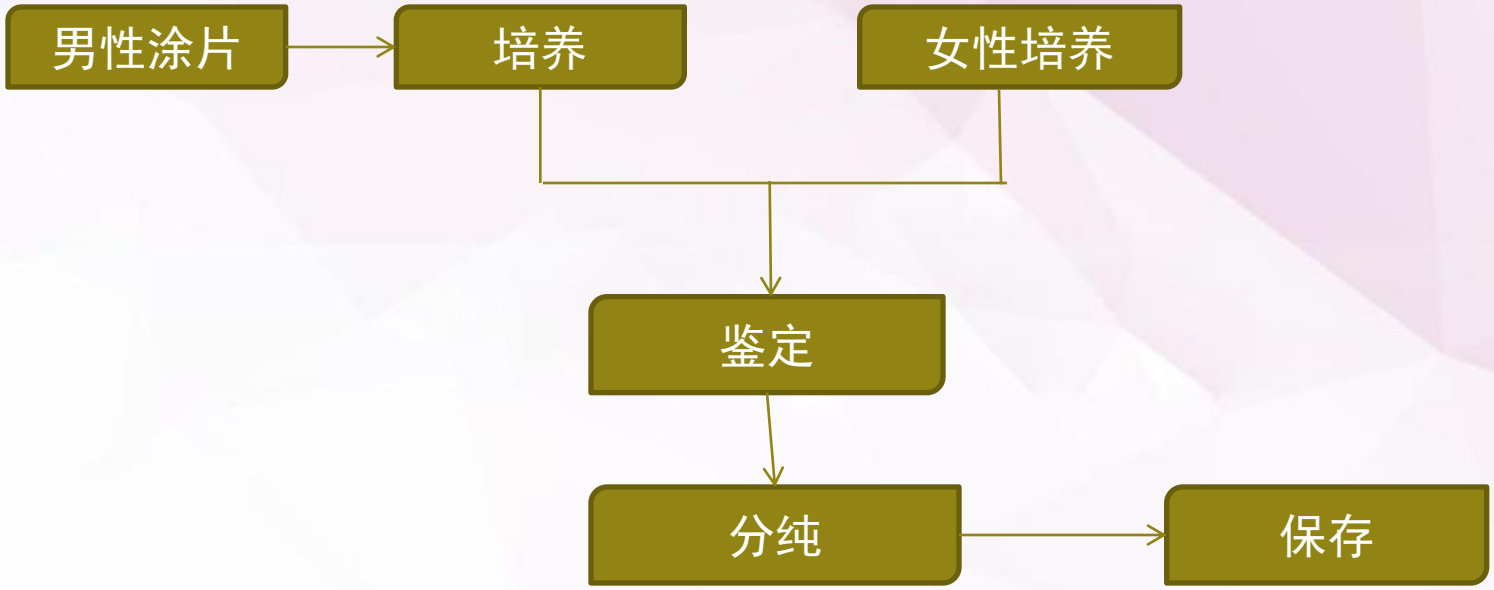
广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

菌株来源网络分布管理

通过网络交流进行具体技术层面的改进

菌株的收集

- **本单位菌株：** 涂片或者培养发现阳性，培养、鉴定、分纯、保存。



菌株的收集

- **外单位运送来的菌株：** 运送过来的菌株，收到马上鉴定分纯培养，做好登记。

收到平板、区分是否非淋球菌

分纯 → 鉴定 → 保存

菌株收集

- **鉴定：** 初步鉴定（革兰染色、菌落形态、氧化酶试验）。
- **分纯：** 分区划线、一般三区、目的就是达到培养出单个菌落。
- **洗脱：** 洗脱入脱脂牛奶中。
- 保存：编号后统一放置-80度冰箱里。
- 同时做KB法（CRO、CTX、SPT）

广西淋球菌耐药性监测规划

网络建设
- 提质扩面-加强原点，扩展新点

耐药监测
- 统一标准-按期完成，指导临床

科学研究
- 监测点市级课题，省级课题

广西淋球菌耐药监测网络具体要求

* 原则：

1、自愿

2、技术能力

3、菌株量

4、责任心

5、任务ren'wu

全区规范化性病实验室创建标准和要求

1、背景情况
2、依据
3、基础
4、目标
5、标准
6、程序

全国2/3省成立了省级性病中心实验室

- 2018年底，全国有19个省（自治区、直辖市已经建立了省级性病中心实验室并通过了性病控制中心组织的现场考核。

未建立省级中心实验室

1. 上海
2. 吉林
3. 辽宁
4. 内蒙古
5. 山西
6. 青海
7. 江西
8. 重庆
9. 宁夏
10. 贵州
11. 安徽
12. 西藏

依　据

相关文件和工作要求（全国和广西的）

1、《中国遏制与防治艾滋病“十二五”行动计划》（国办发〔2012〕4号）

2、《中国预防与控制梅毒规划（2010-2020年）》（卫疾控发［2010］52号）

3、《中华人民共和国传染病防治法》

4、《性病防治管理办法》

工作基础：性病门诊

1. 国家级规范化性病门诊1家
2. 自治区级规范化性病门诊113家
3. 自治区级合格性病门诊66家

目前已经建立了180家性病规范化或合格门诊。

每个县（市）至少建立1所规范化性病门诊。

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

工作基础

一、省级性病中心实验室

CDC

合格证书

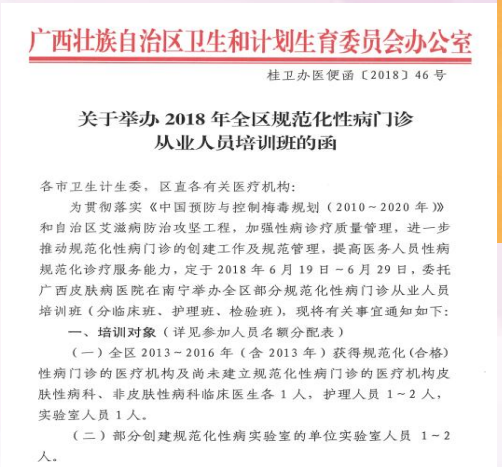
广西壮族自治区皮肤病防治研究所：

你单位通过全国省级性病中心实验室现场考核验收，成绩合格。

特发此证。

中国疾病预防控制中心
性病控制中心
2014年2月25日

二、培训



广西壮族自治区卫生和计划生育委员会办公室

桂卫办医便函〔2018〕46号

关于举办2018年全区规范化性病门诊从业人员培训班的函

各市卫生计生委，区直各有关医疗机构：

为贯彻落实《中国预防与控制梅毒规划（2010～2020年）》和自治区艾滋病防治攻坚工程，加强性病诊疗质量管理，进一步推动规范化性病门诊的创建工作及规范管理，提高医务人员性病规范化诊疗服务能力，定于2018年6月19日～6月29日，委托广西皮肤病医院在南宁举办全区部分规范化性病门诊从业人员培训班（分临床班、护理班、检验班），现将有关事宜通知如下：

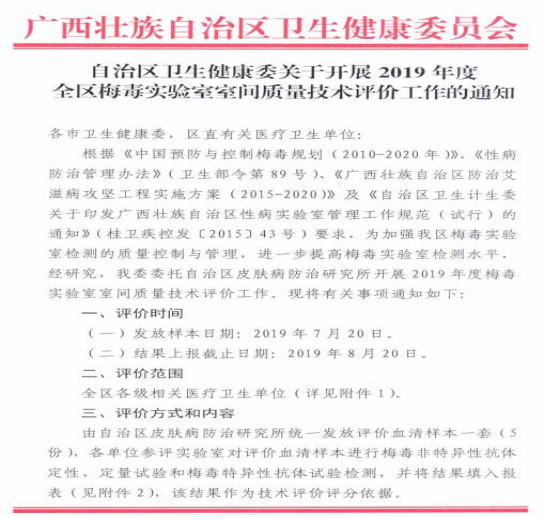
一、培训对象（详见参加人员名额分配表）

（一）全区2013～2016年（含2013年）获得规范化（合格）性病门诊的医疗机构及尚未建立规范化性病门诊的医疗机构皮肤性病科、非皮肤性病科临床医生各1人，护理人员1～2人，实验室人员1人。

（二）部分创建规范化性病实验室的单位实验室人员1～2人。

三、督导

四、质量评价



广西壮族自治区卫生健康委员会

自治区卫生健康委关于开展2019年度全区梅毒实验室室间质量技术评价工作的通知

各市卫生健康委，区直有关医疗卫生单位：

根据《中国预防与控制梅毒规划（2010-2020年）》、《性病防治管理办法》（卫生部令第89号）、《广西壮族自治区防治艾滋病攻坚工程实施方案（2015-2020）》及《自治区卫生计生委关于印发广西壮族自治区性病实验室管理工作规范（试行）的通知》（桂卫疾控发〔2015〕43号）要求，为加强我区梅毒实验室检测的质量控制与管理，进一步提高梅毒实验室检测水平，经研究，我委委托自治区皮肤病防治研究所开展2019年度梅毒实验室室间质量技术评价工作。现将有关事项通知如下：

一、评价时间

（一）发放样本日期：2019年7月20日。

（二）结果上报截止日期：2019年8月20日。

二、评价范围

全区各级相关医疗卫生单位（详见附件1）。

三、评价方式和内容

由自治区皮肤病防治研究所统一发放评价血清样本一套（5份），各单位参评实验室对评价血清样本进行梅毒非特异性抗体定性、定量试验和梅毒特异性抗体试验检测，并将结果填入报表（见附件2），该结果作为技术评价评分依据。

目　标

1、建立健全性病实验室质量管理网络，

2、进一步加强我区性病实验室规范化管理，

3、不断提高性病实验室工作质量和技术水平，

4、使全区县级以上（含县级）医疗机构和性病防治机构均达到相应规范化性病实验室的等级标准，

5、确保性病实验室以科学的方法、规范的检测、准确的结果为患者提供优质的服务。

具体文件

广西壮族自治区

卫生和计划生育委员会文件

桂卫疾控发〔2015〕43号

自治区卫生计生委关于印发广西壮族自治区性病实验室管理工作规范（试行）的通知

各市卫生计生委，区直有关医疗单位：

为规范我区性病实验室管理，提高性病实验室工作质量和技术水平，科学指导性病现场防治工作，我委制订了《广西壮族自治区性病实验室管理工作规范（试行）》，现印发给你们，请遵照执行。

广西壮族自治区卫生和计划生育委员会
2015年10月10日

广西壮族自治区

卫生和计划生育委员会文件

桂卫疾控发〔2017〕10号

自治区卫生计生委关于印发规范化性病实验室等级评定实施方案的通知

各市、县（市、区）卫生计生委（局），自治区皮肤病防治研究所：

为进一步加强我区性病实验室建设，提高规范化性病实验室技术能力水平，根据《自治区卫生计生委关于印发广西壮族自治区性病实验室管理工作规范（试行）的通知》（桂卫疾控发〔2015〕43号）要求，我委制定了《广西壮族自治区规范化性病实验室等级评定实施方案》，现印发给你们，请结合实际，

标　准

类别	内容
分级	省级性病中心实验室、市级性病中心实验室 三级实验室、二级实验室、一级实验室
人员	不同级别要求专业人员人数、职称、培训
空间和设备	足够的空间和设置要求，仪器设备符合要求
项目	不同级别开展的项目满足相应要求
制度文件	完善的实验室相关制度、标准操作程序和各类表格
质量管理	室内质控、室间质评

程　序

单位自评

单位申请

市级审核

自治区评定

结果通报

广西壮族自治区皮肤病防治研究所
广西壮族自治区皮肤病医院

完成的部分工作

广西壮族自治区

卫生和计划生育委员会文件

桂卫疾控发〔2018〕16号

自治区卫生计生委关于
南宁市疾控中心等4个单位
通过市级性病中心实验室考核的通知

各有关市卫生计生委：

根据规范化性病实验室等级评定实施方案的要求，在各地自愿申报的基础上，经自治区组织专家组进行现场评估，确认南宁市疾控中心、梧州市皮肤病防治院、贺州市皮肤病防治院、防城港市防城区皮肤病防治院4个单位为市级性病中心实验室。请各有关市卫生计生委继续加强对市级性病中心实验室建设，进一步提升能力，为性病防治工作提供技术支撑，确保人民群

－1－

广西壮族自治区卫生健康委员会办公室

自治区卫生健康委办公室关于开展
规范化性病实验室等级现场验收的通知

各有关市卫生健康委、医疗卫生机构：

根据《自治区卫生计生委关于印发广西壮族自治区性病
验室管理工作规范（试行）的通知》（桂卫疾控发〔2015〕43号
和《自治区卫生计生委关于印发规范化性病实验室等级评定
施方案的通知》（桂卫疾控发〔2017〕10号）要求，我委将于
期组织专家组对申报规范化性病实验室的单位进行现场验收，
将有关事项通知如下：

一、验收时间

2019年7月，具体时间由专家组联络员另行通知。

二、验收单位

广西壮族自治区桂东人民医院、贵港市皮肤病防治院、玉林市皮肤病防治医院、柳州市柳江区人民医院、藤县皮肤病防治院、藤县人民医院、藤县妇幼保健院、合山市人民医院、大新县皮肤性病防治站。

三、验收标准

按照《自治区卫生计生委关于印发规范化性病实验室等级评定实施方案的通知》（桂卫疾控发〔2017〕10号）执行。

四、其他事项

THANK YOU

0771-2317266