附件

**甘肃省新型冠状病毒相关实验室检验**

**及生物安全操作指南（第一版）**

为加强全省新冠肺炎防控工作，指导省内各级医疗机构和疾控机构实验室开展新型冠状病毒检验，同时保障实验室生物安全，根据国家卫生健康委办公厅《关于医疗机构开展新型冠状病毒核酸检测有关要求的通知》（国委办医函〔2020〕53号）、《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南（第四版）》、《新型冠状病毒实验室生物安全指南（第二版）》和甘肃省卫生健康委《关于调整我省新型冠状病毒肺炎确诊程序的通知》（甘卫医政函〔2020〕78号）等文件，制订本指南。

一、适用范围

本指南适用于甘肃省各级医疗机构和疾控机构实验室开展新冠肺炎病例、疑似病例、密切接触者等的实验室检验，包括疾病确诊所需新型冠状病毒核酸检测、血清学检测及辅助诊断和/或病情监测所需血常规、尿常规、C反应蛋白、降钙素原、生化指标（肝酶、心肌酶、肾功等）、凝血功能等检测项目。

二、新冠肺炎的病原学及流行病学特点

新型冠状病毒属于β属冠状病毒，基因特征与SARSr-CoV和MERSr-CoV有明显区别。病毒对紫外线和热敏感，56℃30min，乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效消灭病毒。基于目前的流行病学调查和研究结果，潜伏期为1-14天，多为3-7天；传染源主要是新型冠状病毒感染的患者，无症状感染者也可能成为传染源；主要传播途径为经呼吸道飞沫和接触传播，在相对封闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶情况下存在经气溶胶传播的可能，其他传播途径尚待明确；人群普遍易感，老年及有基础疾病的感染者病情较重。患者呼吸道标本（鼻咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、支气管灌洗液和肺组织等）含有病毒，有传染性。部分有病毒血症的患者血液，和部分有腹泻症状的患者粪便标本含有病毒，其他体液尚不能确定是否含有病毒，但所有样本均应按有传染性处理。

三、实验室安全原则

（一）新型冠状病毒暂按照病原微生物危害程度分类中第二类病原微生物进行管理。

（二）病毒分离培养、动物实验要求在生物安全三级实验室进行，并须经省级卫生健康行政部门审核后报国家卫生健康委批准方可开展。

（三）未经培养的感染性材料，如不能可靠灭活，进行实验室检验时，应在生物安全二级实验室操作，并采用生物安全三级实验室的个人防护。

四、生物安全防护

（一）防护用品类型

医用外科口罩（YY0469-2011）、医用防护口罩 (GB19083-2010)、N95（美国NIOSH42CF R84-1995）（下文行文包括KN95[GB2626-2019]）、全面型呼吸防护器、医用一次性防护服 (GB 19082-2009) **、**隔离衣、工作服、乳胶手套、医用防护帽、护目镜、面屏、防水鞋套。防护用品由专人领取、发放，及时补充；每日监督检查，填写记录。

（二）生物安全防护级别

一级生物安全防护：医用外科口罩、乳胶手套、工作服、医用防护帽，加手卫生。

二级生物安全防护：医用防护口罩或N95口罩、乳胶手套、工作服外隔离衣、医用防护帽，加手卫生。酌情可加护目镜。

三级生物安全防护：医用防护口罩或N95、双层乳胶手套、面屏、护目镜、工作服外防护服、双层医用防护帽、防水鞋套，加手卫生。必要时双层口罩（外层医用防护口罩，内层N95）。

（三）紫外线消毒灯：紫外线消毒灯照射强度应≥70μW/cm2，消毒时间不少于30分钟。须定期检测性能、完整记录。

（四）消毒液：每天试验前后使用550mg/L有效氯消毒液（84消毒液100倍稀释）或75%乙醇进行桌面、台面及地面消毒。

（五）手卫生：掌握正确地洗手方法（六步洗手法）和时机。不随意触摸面部皮肤、触摸眼睛等。建议剪短长发，禁止佩带饰物。

（六）高压灭菌：废弃物打包后，就地进行121℃ 30分钟高压灭菌，每次需用化学指示胶带和化学指示卡进行监测。定期使用生物指示剂进行灭菌效果监测。

五、标本采集

（一）采集对象

新冠肺炎疑似病例、疑似聚集性病例患者、密切接触者以及其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者。

（二）采集项目

1.发热门诊患者在确诊前进行的血常规、全血CRP、新型冠状病毒核酸检测必须闭盖检测操作。

2.确诊病例进行诊疗必须的检测项目时，尽可能少开展手工检测操作。

（三）采集防护

1.呼吸道飞沫、呼吸道气溶胶对采集者有传播风险，采集者需三级生物安全防护（防护服、医用帽、N95口罩、双层乳胶手套、靴套、护目镜/面屏）。

2.采集者采集标本时应避开患者咳嗽，不要与呼吸道诊疗操作同时进行。

3.采集过程须兼顾安全和目标，在能够达成目标的情况下，尽量减少接触，尽量避免气溶胶和飞沫产生，尽量缩短在床旁和病房的滞留时间。

（四）常见采集方法

1.新型冠状病毒核酸检测的标本类型包括上呼吸道的咽拭子、鼻拭子和鼻咽抽取物，下呼吸道的深咳痰液、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本及血液标本。为提高核酸阳性检出率，兼顾采样的便捷性，呼吸道标本应首选深咳痰，其次鼻咽拭子，最后才是咽拭子。可根据临床表现与采样时间间隔多次进行采集。

（1）咽拭子：用1-2根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子同时擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子头浸入含3ml采样液管中，尾部弃去，旋紧管盖。

（2）鼻拭子：将1根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子轻轻插入鼻道内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。取另一根聚丙烯纤维头塑料杆拭子以同样方法采集另一侧鼻孔。上述两根拭子浸入含3ml采样液的同一管中，尾部弃去，旋紧管盖。

（3）鼻咽抽取物或呼吸道抽取物：用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取粘液或从气管抽取呼吸道分泌物。将收集器头部插入鼻腔或气管，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出，收集抽取的粘液，并用3ml采样液冲洗收集器1次（亦可用小儿导尿管接在50ml注射器上来替代收集器）。

（4）深咳痰液：用温开水或矿泉水等（勿用含消毒剂的漱口液，有假牙者取出假牙）漱口2～3次，要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于含3ml采样液（细胞保存液）的50ml螺口痰杯中。

（5）支气管灌洗液：将收集器头部从鼻孔或气管插口处插入气管（约30cm深处），注入5ml生理盐水，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出，收集抽取的粘液，并用采样液冲洗收集器1次（亦可用小儿导尿管接在50ml注射器上来替代收集）。

（6）肺泡灌洗液：局部麻醉后将纤维支气管镜通过口或鼻经咽部插入右肺中叶或左肺舌段的支气管，将其顶端契入支气管分支开口，经气管活检孔缓缓加入灭菌生理盐水，每次30～50ml，总量100～250ml，不应超过300ml。

2.血液标本：按项目要求选择正确的真空采集管采集血液标本4ml进行检测。

3.大小便样本：依据需求规范采集，旋紧管盖。

送检标本容器外必须贴上含样本编号、种类、患者姓名及采样日期等信息的识别条码。

六、标本转运

（一）标本转运箱

1.要求准备正规、密封良好、有新型冠状病毒标本标识的专用转运箱。感染性生物材料运输包装应符合A类要求，对应的联合国编号为UN2814。

2.转运箱一般不进入隔离病房；如果是从隔离病房内取出，需要外部清洁消毒。

（二）标本转运人员

转运人员需二级生物安全防护（隔离衣、医用帽、外科口罩或N95口罩、手套）

（三）标本转运流程

1.标本采集者或辅助者将样本放入双层密封标本袋内后，置于新型冠状病毒专用转运箱，75%酒精消毒后封闭，并由专人转运到实验室。

2.转运期间不能自行打开转运箱，并保持转运箱平稳，避免剧烈震荡、颠簸。

3.转运期间如果发生意外，转运者不要自行处理转运箱，须到接收地点说明情况，共同处理。

4.相关医疗机构和疾控机构应制定标本运送应急处置方案。

（四）标本区域间转运

新型冠状病毒毒株或其他潜在感染性材料运输应按照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（原卫生部令第45号）办理《准运证书》。

七、标本接收

（一）实验室接收人员

接收人员须二级生物安全防护（隔离衣、医用帽、外科口罩或N95口罩、手套）；特殊情况时，升级为三级生物安全防护（防护服、医用帽、N95口罩、双层乳胶手套、靴套、护目镜/面屏）。

（二）接收流程

1.接收者首先核对送样单，送样单信息不完整，接收者有权拒收样品。接收时确认新型冠状病毒标本转运箱标识，如果没有标识，拒收标本。

2.接收者在生物安全柜内打开转运箱，从密封袋取出标本，确认样本符合采样要求，容器表面75%乙醇消毒。

3.通过LIS系统或手工登记完成每个样本的签收。

4.确认样本在装箱前有消毒环节，并在开箱瞬间用75%乙醇喷雾消毒。

5.样本接收时如发现溢洒情况，应立即启动实验室应急程序，进行规范处置，并记录。

八、标本前处理

（一）实验室前处理人员

前处理人员需三级生物安全防护（防护服、医用帽、N95口罩、双层乳胶手套、靴套、护目镜/面屏）。

（二）前处理流程

1.新型冠状病毒核酸检测的呼吸道样本可直接按照核酸提取试剂盒说明书操作；也可作56℃30分钟进行灭活处理，待采样管降至常温后，在生物安全柜内开盖。

2.血常规、凝血等闭管操作项目标本无需处理，直接上机检测。

3.其他生化、免疫等项目需离心处理的血液标本，应尽可能在生物安全柜中放入和取出离心机转子；离心时，操作者不能离开离心机，离心停止15分钟以上，在生物安全柜中开盖，并消毒；如果离心过程有异常声响，则停止离心30分钟以上后开盖，并消毒。

九、实验室检验

（一）基本原则

1.所有检测必须在空间相对独立的生物安全二级实验室开展，操作人员需三级生物安全实验室个人防护（防护服、医用帽、N95口罩、双层乳胶手套、靴套、护目镜/面屏）。

2.检验操作过程尽可能避免打开试管盖，尽可能缩短打开的持续时间，尽可能避免产生气溶胶。

3.检验操作过程如果必须打开试管盖、或有可能产生气溶胶的操作、或可能接触标本本身，则必须在生物安全柜内进行，试管盖弃去消毒。

（二）检验人员资质及培训

1.进行新冠肺炎相关常规项目，如血常规、全血CRP、生化、免疫等操作人员和结果审核人员均应持临床检验上岗证；进行新型冠状病毒核酸检测的人员还必须持临床基因扩增检验上岗证。

2.从事新冠肺炎相关检验的检验人员，需接受新型冠状病毒核酸检测技术和相关生物安全培训，考核合格后方能上岗工作。

（三）新型冠状病毒核酸检测

1.开展新型冠状病毒核酸检测的实验室应满足《临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫医发〔2010〕194号）规定的实验室分区和仪器设备要求，并通过省或市级卫生健康行政管理部门验收、备案。

2.做好新型冠状病毒核酸检测前、中、后全流程的质量控制，包括室内质量控制、室间质量评价/实验室间比对、样本采集、运送、储存等的质量监测、临床反馈处理等。

3.在分子生物学实验室设置专门的新型冠状病毒核酸提取间（推荐负压实验室，并确保气压符合要求）进行病毒核酸提取，确保生物安全。

4.进行核酸提取时，呼吸道标本的开盖、取样，核酸的人工提取等操作都应在生物安全柜内进行，或完成加样后，转移到全自动核酸提取仪。操作者需三级生物安全防护（防护服、医用帽、N95口罩、双层乳胶手套、靴套、护目镜/面屏）。

5.新型冠状病毒的核酸检测目前采用实时荧光RT-PCR方法，根据新型冠状病毒核酸检测试剂盒推荐操作流程，完成加样和荧光PCR仪扩增、检测。操作者须二级生物安全防护（隔离衣、医用帽、外科口罩或N95口罩、手套）。

6.结果判读：目前基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸检测试剂包括单靶标、双靶标、三靶标三大类。引物和探针的设计推荐选用新型冠状病毒的3个特异性区域，开放读码框1ab（open reading frame, ORF1ab）、核壳蛋白（nucleoprotein,N）及包膜蛋白（envelop, E）基因。根据美国疾病预防控制中心的推荐，E基因是一线筛查靶标；ORF1ab是确认靶标，特异性最高；而N基因是附加确认靶标。（见附表）

7.由检测人员完成检测和结果初审，审核者进行结果复核，阴性结果直接报告临床；阳性结果由实验室主任终审后发出阳性报告。

8.阴性结果不能排除新型冠状病毒感染，需要排除可能产生假阴性的因素，包括呼吸道标本采集部位不正确；标本采集的时间过早或过晚；没有正确保存、运输和处理标本；检测技术本身的局限性，如病毒变异、PCR抑制等问题。

9.核酸检测阴性结果是排除新型冠状病毒感染的实验室依据。如果临床症状和影像学特征典型的疑似病例，建议行多次间隔采样（采样间隔时间不少于24小时），以提高阳性检出率。

 （四）新冠肺炎相关的其他常规检验（血常规、尿常规、C反应蛋白、降钙素原、肝酶、心肌酶、肾功、凝血功能等）

1.必须在空间相对独立的二级生物安全实验区（室）开展，并按三级防护标准要求做好人员防护（防护服、医用帽、N95口罩、双层乳胶手套、靴套、护目镜/面屏）。

2.按相应检验项目的标准操作流程在分析仪器上完成，报告结果。

3.结果及临床意义：发病早期白细胞总数正常或降低，淋巴细胞计数减少，部分患者出现肝酶、肌酶和肌红蛋白增高。多数患者C反应蛋白和血沉升高，降钙素原正常；严重者D-二聚体升高、外周血淋巴细胞进行性减少；重型患者动脉血氧分压（PaO2）/吸氧浓度（FiO2）≤300mmHg(1mmHg=0.133kPa)，凝血功能异常。

十、检验后标本及相关废弃物处理

（一）如果血液等标本需复查，应在生物安全柜中加新盖，按规定保存。否则和其他固体废弃物一起装入符合国家标准的黄色废弃物袋内密封，转运至高压灭菌室，高压灭菌。

（二）相关废液采用化学消毒或物理消毒方式处理，并对消毒效果进行验证，确保彻底灭活。

（三）消毒灭菌后的标本转运应符合生物安全相关规范。废弃物管理应符合《医疗废物管理条例》、《医疗卫生机构医疗废物管理办法》、《新型冠状病毒实验室生物安全指南（第二版）》和《关于严格做好新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控医疗废物医院污水规范化处置和监督管理工作的紧急通知》（甘卫法监函〔2020〕47号）的要求。

十一、生物安全意外事故的处理

（一）新型冠状病毒标本污染生物安全柜的操作台造成局限污染的，应使用3000mg/L有效氯消毒液，消毒液需要现用现配，24小时内使用。

（二）新型冠状病毒标本造成实验室污染的，应保持实验室空间密闭，避免不相关人员出入，避免污染物扩散。使用3000mg/L有效氯消毒液的毛巾覆盖污染区。必要时(大量溢撒时)可用过氧乙酸加热熏蒸实验室，剂量为2g/m3，熏蒸过夜；或20g/L过氧乙酸消毒液用气溶胶喷雾器喷雾，用量8ml/m3，作用1～2小时。熏蒸时室内湿度为60%-80%。

（三）清理污染物严格遵循生物安全操作要求，采用压力蒸汽灭菌处理，并进行实验室换气等，防止发生次生危害。

附表

（1）单靶标试剂结果判读：

|  |  |
| --- | --- |
| **试用结果** | **结果判断** |
| **ORF1ab** | **2019nCoV** |
| **+** | **+** |
| **-** | **-** |

（2）双靶标试剂结果判读：

|  |  |
| --- | --- |
| **试用结果** | **结果判断** |
| **ORF1ab** | **N/E基因** | **2019nCoV** |
| **+** | **+** | **+** |
| **+** | **-** | **+** |
| **-（重复+）** | **+** | **+** |
| **-（重复-）** | **+** | **隔期复查** |
| **-** | **-** | **-** |

（3）三靶标试剂结果判读：

|  |  |
| --- | --- |
| **试用结果** | **结果判断** |
| **ORF1ab** | **E基因** | **N基因** | **2019nCoV** |
| **+** | **+** | **+** | **+** |
| **+** | **+** | **-** | **+** |
| **+** | **-** | **+** | **+** |
| **+（重复+）** | **-** | **-** | **+** |
| **-（重复+）** | **+** | **+/-** | **+** |
| **-（重复-）** | **+** | **+/-** | **隔期复查** |
| **-（重复+）** | **+/-** | **+** | **+** |
| **-（重复-）** | **+/-** | **+** | **隔期复查** |
| **-** | **-** | **-** | **-** |