

(18):2158-2161.

[3] 周杰. 放化疗结合靶向治疗非小细胞肺癌脑转移的临床疗效[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(18):2922-2923.

[4] 彭博, 李慧玲. 浅析癌症与其靶向药的相关研究进展[J]. 世界最新医学摘, 2019, 19(61):54-57.

[5] JØRGENSEN J T. Companion diagnostics: the key to personalized medicine. Foreword. [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15(2):153-156.

[6] BELTRÁN-GARCÍA J, OSCA-VERDEGAL R, MENA-MOLLÁ S, et al. Epigenetic IVD tests for personalized precision medicine in cancer[J]. Front Genet, 2019, 10(2):621.

[7] LEVENT A, DE RICHTER P, ANGEL W H, et al. Changes in the use of commercial and lab-developed IVD assays in the clinical setting for PD-L1 expression testing in NSCLC in the United States[J]. J Clin Oncol, 2018, 36 (suppl 5): S154-S157.

[8] 张杰. 聚合酶链反应技术在非小细胞肺癌 EML4-ALK 融合基因检测中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(12):856-858.

[9] 国家卫生和计划生育委员会. 肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)[EB/OL]. (2015-07-29)[2019-11-02]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s3593/201507/fca7d0216fed429cac797cdafa2ba466.shtml>.

管理·教学

[10] KERR K M, BUBENDORF L, EDELMAN M J, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2014, 25(9):1681-1690.

[11] VON AHLFEN S, MISSEL A, BENDRAT K, et al. Determinants of RNA quality from FFPE samples, PLoS One[J]. 2007, 2(12):e1261.

[12] NEWMAN A M, BRATMAN S V, TO J, et al. An ultra-sensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. Nat Med, 2014, 20(5):548-554.

[13] HAGEN R M, RHODES A, OXLEY J, et al. A M-MLV reverse transcriptase with reduced RNaseH activity allows greater sensitivity of gene expression detection in formalin fixed and paraffin embedded prostate cancer samples[J]. Exp Mol Pathol, 2013, 95(1):98-104.

[14] PRUVOST M, GRANGE T, GEIGL E M. Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies [J]. Biotechniques, 2005, 38(4):569-575.

(收稿日期:2019-12-29 修回日期:2020-02-20)

新型冠状病毒核酸检测实验室的生物安全防护探讨*

李渊婷^{1,2}, 高小玲^{1,2}, 李永红^{1,2,△}

(甘肃省人民医院:1. 临床研究与转化医学研究所;2. 国家卫生健康委
胃肠肿瘤诊治重点实验室, 甘肃兰州 730030)

摘要:2019 年 12 月底, 武汉市发现由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的新型冠状病毒肺炎病例, 随后感染人数不断上升, SARS-CoV-2 核酸检测可及时对急重症及疑似患者的诊断提供直接证据。由于 SARS-CoV-2 可能存在气溶胶传播途径, 检测人员在实验过程中存在较大的感染风险。因此, 加强检测实验室生物防护显得极为重要。该文结合相关文献及在 SARS-CoV-2 核酸检测中的工作经验, 从实验室生物安全防护、个人生物安全防护、核酸检测过程生物安全防护等各个环节进行深入探讨, 为 SARS-CoV-2 检测实验室生物安全防护提出相关措施和参考依据。

关键词:新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎 实验室生物安全防护

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.031

文章编号:1673-4130(2020)13-1661-04

中图法分类号:R817-33

文献标识码:B

自 2019 年 12 月底湖北省武汉市发现新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染患者以来, 院内感染及对病毒传播途径认知不足致使生物安全防护欠缺或不到位是导致医务人员暴露并感染的重要原因^[1]。

SARS-CoV-2 是人类分离的第七类冠状病毒, 属于 β 属的新型冠状病毒, 有包膜的单股正链 RNA 病毒, 直径 60~140 nm, 形态不一, 多为圆形或椭圆形。其基因特征与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-

* 基金项目: 甘肃省新型冠状病毒肺炎(NCP)科技重大专项。

△ 通信作者, E-mail: liyonghong-GSPH@hotmail.com。

本文引用格式: 李渊婷, 高小玲, 李永红. 新型冠状病毒核酸检测实验室的生物安全防护探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(13):1661-

CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)有明显区别^[2],但都是通过血管紧张素转化酶 2(ACE2)感染细胞。目前研究显示,SARS-CoV-2 与蝙蝠 SARS 样冠状病毒(bat-SL-CoVZC45)同源性达 85%以上。体外分离培养时,SARS-CoV-2 96 h 左右即可在人呼吸道上皮细胞内被发现,而在 Vero E6 和 Huh-7 细胞系中分离培养需约 6 d。对冠状病毒理化特性的认识多来自对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的研究。病毒对紫外线和热敏感,56 ℃ 30 min、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灭活病毒,氯己定不能有效灭活病毒^[2]。

我国 2020 年 1 月 20 日将新型冠状病毒肺炎纳入乙类传染病并采取甲类传染病的预防、控制措施。SARS-CoV-2 传染源主要为确诊患者,潜伏期患者和携带者也有传染性,潜伏期 1~14 d,人群普遍易感。传播途径除了主要的呼吸道飞沫传播、接触传播,新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)新增一条传播途径: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^[2]。对于潜在的气溶胶传播途径而言,核酸检测的实验室是高危科室,检测人员在实验过程中存在较大的感染风险,因此,加强实验室生物防护显得极为重要。本文从实验室生物安全防护、个人生物安全防护、核酸检测过程生物安全防护等各个环节进行了探讨。

1 实验室生物安全防护

根据实验室所处理对象的生物危害程度和采取的防护措施,实验室生物安全分为 4 个等级:一级生物安全实验室(BSL-1)、二级生物安全实验室(BSL-2)、三级生物安全实验室(BSL-3)、四级生物安全实验室(BSL-4)。我国将 SARS-CoV-2 按照病原微生物危害程度分类中第二类高致病性病原微生物进行管理,其分离培养、动物实验等活动在生物安全三级实验室开展,病毒抗原检测、血清学检测、核酸检测、生化分析等操作应在生物安全二级实验室开展,其中核酸检测尽可能在有外排功能的生物安全柜中进行^[3]。

SARS-CoV-2 核酸检测必须在标准 PCR 实验室

或负压 PCR 实验室中进行,检测人员按三级生物安全防护进入 PCR 实验室作业,严格遵守试剂准备区→标本制备区→扩增区→扩增产物分析区单一流向的原则,防止气溶胶逆向流动,造成污染^[4]。

核酸检测实验前检查生物安全柜,保证其内尽量少放物品,以便生物安全柜内形成稳定且洁净的气流循环。用 75%乙醇对试剂准备区及标本制备区生物安全柜和台面进行消毒后紫外线照射 30 min,打开安全柜风机运行 15~30 min 后开始实验。生物安全柜中应配备利器盒,装 0.55%~1.00%含氯消毒液用于丢弃标本、废液及与试剂、标本接触过的实验耗材(枪头、EP 管等)。实验结束后对 PCR 实验室的每个区域进行消毒,依次用 75%乙醇及 1.00%含氯消毒剂对安全柜台面、移液器等用品和地面进行消毒,安全柜风机至少运行 10 min 后方可关机。用 75%乙醇对空气进行消毒,10 min 后开启通风装置 10 min,关闭通风装置后打开安全柜及实验室的紫外灯照射 30 min^[5],注意紫外灯距台面 0.9 m 以内,密闭 30 min 以上,人员离开。紫外灯照射后,为有效去除实验过程中的气溶胶,对实验室进行通风至少 1 h,实验室不定期通风是重要的防护措施。

实验过程中如有生物安全操作失误或意外,对污染的台面使用 0.55%含氯消毒剂的纸巾覆盖消毒 30 min 以上,消毒剂现用现配,24 h 内使用^[4]。实验室污染时,除了覆盖消毒 30 min 之外,要保持实验室密闭,必要时过氧乙酸加热熏蒸过夜,剂量为 2 g/m³。清理污染物严格遵循病毒生物安全操作要求,高压蒸汽灭活病毒,实验室通风换气,防止次生危害^[6]。

2 个人生物安全防护

检测人员个人生物安全防护是 SARS-CoV-2 核酸检测生物安全防护的重点。实验室人员生物安全防护按不同等级病原微生物所采取的不同综合防护措施可分为 3 级:具体防护用品分配见表 1^[6-7]。SARS-CoV-2 核酸检测过程中检测人员为三级生物安全防护,严格遵循其穿脱顺序是保护检测人员、避免院内感染的重点防护措施,具体步骤见图 1、2。

表 1 个人生物安全防护分级

安全等级	医用 外科口罩	医用防护 口罩(N95)	乳胶(或 丁腈)手套	工作服	隔离服	医用 防护帽	手卫生	鞋套 (或防护靴)	防护服	护目镜	面屏	全面型 呼吸防护器
一级生物安全防护	●		●	●		●	●					
二级生物安全防护		●	●	●	●	●	●			*		
三级生物安全防护	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	*

注:●为应选择,*为根据暴露风险选择,空白为无需选择。

2.1 防护用品的穿戴注意事项 除严格遵守穿戴顺序外,手卫生也是不可忽视的重点,可采用有效碘含量为 0.5%、75%乙醇或 70%异丙醇的消毒剂浸泡或

擦拭手部,作用 1~3 min,然后用医用洗手液按照“七步洗手法”洗净双手。每次佩戴口罩前应做佩戴气密性检查,戴两层口罩时,内层为医用防护口罩或 N95,

外层为医用外科口罩。戴无菌手套时手套反折,紧套袖口防止手套污染。

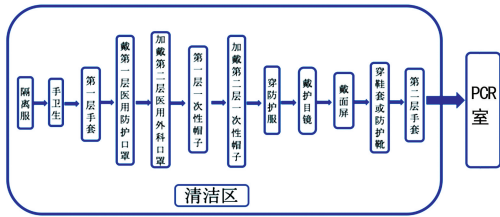


图 1 三级防护的穿戴流程

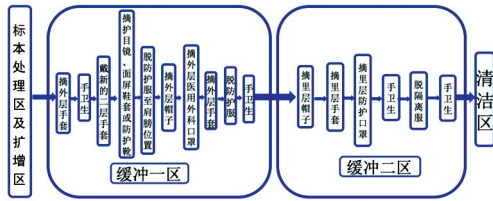


图 2 三级防护的脱摘流程

2.2 防护用品摘脱的注意事项 脱下的护目镜、防护服等非一次性使用的物品可用 75% 乙醇浸泡 30 min 后紫外消毒 30 min 备用。脱防护服时要注意,脱去第一层手套后,进行手部消毒后再脱防护服,如果是一次性防护服,可用手接触防护服内侧,缓慢从上到下脱去防护服置于三层黄色医疗垃圾袋中;如果是可重复使用的防护服,用 75% 乙醇均匀喷洒后,用消毒后的内层手套,仅接触防护服外侧脱去防护服,然后将防护服进行紫外照射至少 30 min 后备用,脱卸防护装备的每一步均应进行手消毒。注意摘口罩时不要触碰正面,摘脱多个防护用品时,务必确保医用防护口罩最后摘除。将手套、医用防护帽、鞋套,防护服等放入三层黄色医疗垃圾袋中作为医疗废物集中高压灭活病毒。

脱防护服时其表面的气溶胶、飞溅液体容易浮在空气中,应尽量减少呼吸频率,减少语言交流,并闭上眼睛。所有防护装备全部脱完后再次洗手、手消毒;按流程脱去之后,用乙醇或碘制剂,擦拭暴露的面部、鼻孔(适当深度)、耳部和耳道。建议脱去之后用生理盐水滴眼睛、漱口,如果条件许可,脱下防护服后,尽快更换隔离服,洗澡且时长应超过 30 min。

3 检测流程中的生物安全防护

3.1 标本采集及运输的注意事项 SARS-CoV-2 核酸检测标本主要包括上呼吸道标本(口咽拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽取物等)、下呼吸道标本(深咳痰液、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液和肺组织活检标本等)、发病期血液及粪便^[5]。标本采集时必须保证采集者为三级生物安全防护^[6]。据 SARS-CoV-2 核酸检测数据统计,最常用的咽拭子标本核酸检出率偏低,灵敏度不高,而下呼吸道标本的阳性率相对较高,有专家推荐使用深咳痰标本进行病毒核酸检测,

采集深咳痰时建议用 3% 的生理盐水 6 mL,雾化吸入 15 min,由采集者从下至上轻轻手拍患者背部,诱导排痰。针对无法采集痰液标本的患者,仍需采集咽拭子进行核酸检测,但应注意采集拭子的材料、采集部位、深度等影响核酸检测的因素。

标本转运人员为二级生物安全防护^[6],采集标本后用 75% 乙醇喷洒标本采集管外部,放入专用两层一次性密封袋,75% 乙醇消毒后放入转运箱(有生物安全标识),消毒并及时送检,转运工作要在 2 h 内完成。转运人员随身携带 75% 乙醇,处理可能发生的意外^[5]。但《2019 新型冠状病毒肺炎临床实验室检测的生物安全防护指南》指出,如发生意外,转运者不要自行处理转运箱,需到接收地点说明情况,同接收人员共同处理^[6]。在此,笔者认为转运者应随声携带 75% 乙醇,当发生转运箱密封性损伤时,转运者可及时进行紧急消毒处理;当标本发生洒漏,则到接收地点同接收人员共同处理。

3.2 标本接收的注意事项 接收人员为二级生物安全防护^[6],标本进行双签收后,接收人员用 75% 乙醇对转运箱外部进行消毒,静置 3~5 min 后,小心打开转运箱后再次对箱子内部及密封袋消毒,检查标本运送过程中有无撒漏并核对患者信息,然后将标本放入储存盒中置于专用冰箱 4 ℃ 冷藏(不超过 24 h)保存,长期保存可置于 -70 ℃ 或更低温度下保存,血浆标本可在 4 ℃ 存放 3 d, -20 ℃ 长期保存。标本采集,转运,交接环节应有记录,以便回溯。

3.3 核酸检测中的注意事项 检测人员采用三级生物安全防护^[6],进入核酸检测实验室,严格按照 PCR 实验室单一流向进行实验,实验过程中可能会有高浓度气溶胶的产生,因此,可加戴一个帽子,防护服外加穿隔离衣,穿上防护服后,要避免剧烈运动,减少内外气体流动,防止带入气溶胶附着在内部衣物上。

试剂准备区配置实验试剂后,进入标本处理区。标本处理应在具有外排功能的生物安全柜中进行。口咽拭子、鼻咽拭子、肺泡灌洗液、粪便置于水浴箱中 56 ℃ 45 min 进行病毒灭活^[5],每 10 min 轻轻摇匀一次,灭活后静置 10 min(防止产生气溶胶,静置时间越长,产生气溶胶风险越小)用于核酸提取;痰液标本应提前 40 min 加入痰消化储存液、含 1 g/L 蛋白酶 K 的磷酸盐缓冲液^[5]或 4% NaOH 液化处理后进行病毒灭活。血液标本 1 500 × g 离心 10 min 后冰浴 3~5 min 后进行核酸提取。《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南(第四版)》指出血清标本主要用于抗体测定^[8],从血清抗体水平对病例感染状况进行确定,血清标本不进行核酸检测,而血浆标本可用于核酸检测,建议核酸检测使用含有乙二胺四乙酸抗凝剂的真空采血管采集血液标本 5 mL。

提取核酸时,戴双层手套(外层需为无粉丁腈手套)小心旋转标本盒螺口,打开标本盒后,吸取足量标本,将标本盒盖紧。剩余标本放入密封袋中,表面喷洒 75%乙醇后重新放入储存盒,再放入标本转运箱内。标本离心时,检测人员不能离开离心机。正常离心结束后,静置 10 min 以上(有效减少气溶胶的形成),75%乙醇喷雾消毒后,开离心机盖喷雾消毒,转入生物安全柜中。如果疑似意外发生,比如离心过程有异常声响,则停止离心,离心停止 30 min 以上,75%乙醇喷雾消毒后,开离心机盖喷雾消毒。按实验流程进行操作,实验过程中发现外层手套污染或破损时,用 75%乙醇消毒后弃去外层手套,对内层手套用 75%乙醇消毒后更换新外层手套。皮肤被污染物污染时,应立即清除污染物,再用一次性吸水材料沾取 0.5%碘伏或过氧化氢消毒剂擦拭消毒 3 min 以上,使用清水清洗干净;黏膜污染时应用大量生理盐水冲洗或 0.05%碘伏冲洗消毒。操作过程中不能用 75%乙醇对空气消毒。核酸提取完成后在生物安全柜内将模板加入 PCR 扩增体系中。标本检测过程中的枪头、离心管、废液等与标本接触的耗材放入盛有 1%含氯消毒剂的黄色利器盒中浸泡 30 min 以上,盖紧利器盒,按医疗废物处置方法处置。扩增体系放入扩增仪,核对并运行扩增程序。标本检测结束后,将扩增产物放入三层黄色医疗垃圾袋中封存高压;检测后灭活的标本密封后放在专用的冰箱中,设立专人管理,双人双锁做好登记。

检测过程中的利器盒及检测人员的防护服、手套、鞋套、帽子等废弃物用 75%乙醇消毒后收集于三层医疗废物包装袋,鹅颈结密封,并标注为新型冠状病毒肺炎。经过高压灭活病毒后,由专员统一处理。

本次疫情对实验室生物安全防控体系是一场考验,实验室生物安全防护和个人生物安全防护都是避免院内感染的重要环节。每个医务工作者都应该提高生物安全防护意识,从工作中总结经验,吸取教训,及时发现和改善不足,不断完善实验室生物安全防控

体系,做到精准检测的同时有效保护每一位医务人员。

参考文献

[1] 国家卫生健康委员会. 截止 2 月 24 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况[EB/OL]. (2020-02-25)[2020-02-25]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-02/25/content_5482868.htm.

[2] 国家卫生健康委员会办公厅,国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第六版)[EB/OL]. (2020-02-18)[2020-02-24]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/19/content_5480948.htm.

[3] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[EB/OL]. (2020-01-23)[2020-02-24]. http://www.nhc.gov.cn/qijys/s7948/202001/0909555408_d842a_58828611dde2e6a26.shtml.

[4] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床基因扩增检验工作导则(卫办医政发[2010]194 号);2010[S/OL]. (2010-12-06)[2020-02-24]. https://wenku.baidu.com/view/ceb323af_59f5f61fb7360b4c2e3f_5727a5e92493.html.

[5] 中华医学会检验医学分会. 新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识[J]. 中华医学杂志, 2020, 206(13): 968-973.

[6] 中华医学会检验医学分会. 2019 新型冠状病毒肺炎临床实验室检测的生物安全防护指南[EB/OL]. (2020-01-30)[2020-02-24]. <http://www.cslm.org.cn/cn/news.asp?id=73.html>.

[7] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎防控中常见医用防护用品使用范围指引(试行)[EB/OL]. (2020-01-26)[2020-02-24]. http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/202001/e71c5de_925a64eaf_be1ce790_debab5c6.shtml.

[8] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南(第四版)[EB/OL]. (2020-01-27)[2020-02-24]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-01/28/content_5472673.htm.

(收稿日期:2020-02-25 修回日期:2020-02-29)

(上接第 1651 页)

[35] 刘又嘉,贺璐,邓艳玲,等. 益生菌预防 2 型糖尿病研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(10): 1221-1225.

[36] LI C, DING Q, NIE S P, et al. Carrot juice fermented with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(49): 11884-11891.

[37] MOROTI C, SOUZA MAGRI L F, DE REZENDE COSTA M, et al. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly Peo-

ple with type 2 diabetes mellitus[J]. Lipids Health Dis, 2012, 11(1): 29.

[38] 杨胜华,杨华章. 胰高血糖素样肽-1 及其类似物治疗 2 型糖尿病的优势[J]. 循证医学, 2010, 10(6): 374-376.

[39] 张雄燕. 双歧杆菌四联活菌片对血糖控制欠理想 2 型糖尿病患者肠道菌群及胰岛 β 细胞功能的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(12): 1433-1436.

(收稿日期:2019-12-04 修回日期:2020-01-02)