

附件 4

新型冠状病毒肺炎 实验室检测技术指南 (第四版)

为指导各级疾控部门和其他相关机构开展新型冠状病毒肺炎实验室检测工作，特制定本技术指南。本指南主要介绍目前已经比较成熟、易于实施的核酸检测方法。

一、标本采集

(一) 采集对象。

新型冠状病毒肺炎疑似病例、临床诊断病例（仅限湖北省）和聚集性病例，其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者，或其他需要进一步筛查检测的环境或生物材料（如溯源分析）。

(二) 标本采集要求。

1. 从事新型冠状病毒检测标本采集的技术人员应经过生物安全培训（培训合格）和具备相应的实验技能。采样人员个人防护装备（personal protective equipment, PPE）要求：N95及以上防护口罩、护目镜、连体防护服、双层乳胶手套、防水靴套；如果接触了患者血液、体液、分泌物或排泄物，应及时更换外层乳胶手套。

2. 住院病例的标本由所在医院的医护人员采集。

3. 密切接触者标本由当地指定的疾控机构、医疗机构负责采集。

4. 根据实验室检测工作的需要，可结合病程多次采样。

（三）标本采集种类。

每个病例必须采集急性期呼吸道标本（包括上呼吸道标本和下呼吸道标本）；重症病例优先采集下呼吸道标本（如支气管或肺泡灌洗液等）；出现眼部感染症状的病例，需采集眼结膜拭子标本；出现腹泻症状的病例，需留取便标本。可根据临床表现与采样时间间隔进行采集。

其他研究材料依据设计需求采集。

标本种类：

1. 上呼吸道标本：包括咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物等。

2. 下呼吸道标本：包括深咳痰液、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本。

3. 血液标本：尽量采集发病后7天内的急性期抗凝血。采集量5ml，以空腹血为佳，建议使用含有EDTA抗凝剂的真空采血管采集血液。

4. 血清标本：尽量采集急性期、恢复期双份血清。第一份血清应尽早（最好在发病后7天内）采集，第二份血清应在发病后第3~4周采集。采集量5ml，建议使用无抗凝剂的真空采血管。血清标本主要用于抗体的测定，从血清抗体水平对病例的感染

状况进行确认。血清标本不进行核酸检测。

5. 眼结膜标本：出现眼部感染症状的病例需采集眼结膜拭子标本。

6. 便标本：出现腹泻症状的患者需采集便标本。

（四）标本采集方法。

1. 咽拭子：用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病毒保存液（也可使用等渗盐溶液、组织培养液或磷酸盐缓冲液）的管中，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腔内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。取另一根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子以同样的方法采集另一侧鼻孔。上述两根拭子浸入同一含3ml采样液的管中，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：要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于含3ml采样液的50ml螺口塑料管中。

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过咽部插入右肺中叶或左肺舌段的支管，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。

7. 血液标本：建议使用含有EDTA抗凝剂的真空采血管采集血液标本5ml，室温静置30分钟，1500~2000rpm离心10分钟，分别收集血浆和血液中细胞于无菌螺口塑料管中。

8. 血清标本：用真空负压采血管采集血液标本5ml，室温静置30分钟，1500~2000rpm离心10分钟，收集血清于无菌螺口塑料管中。

9. 粪便标本：如患者发病早期出现腹泻症状，则留取粪便标本3-5ml；

10. 眼结膜拭子标本：眼结膜表面用拭子轻轻擦拭后，将拭子头进入采样管中，尾部弃去，悬紧管盖。

其他材料：依据设计需求规范采集。

（五）标本包装。

标本采集后在生物安全二级实验室生物安全柜内分装。

1. 所有标本应放在大小适合的带螺旋盖内有垫圈、耐冷冻的样本采集管里，拧紧。容器外注明样本编号、种类、姓名及采样日期。

2. 将密闭后的标本放入大小合适的塑料袋内密封，每袋装一份标本。样本包装要求要符合《危险品航空安全运输技术细则》相应的标准。

3. 涉及外部标本运输的，应根据标本类型，按照A类或B类感染性物质进行三层包装。

（六）标本保存。

用于病毒分离和核酸检测的标本应尽快进行检测，能在24小时内检测的标本可置于4℃保存；24小时内无法检测的标本则应置于-70℃或以下保存（如无-70℃保存条件，则于-20℃冰箱暂存）。血清可在4℃存放3天，-20℃以下可长期保存。应设立专库或专柜单独保存标本。标本运送期间应避免反复冻融。

（七）标本送检。

标本采集后应尽快送往实验室，如果需要长途运输标本，建议采用干冰等制冷方式进行保藏。

1. 上送标本。

各省（自治区、直辖市）聚集性病例的标本，上送中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所进行检测复核，并附样本送检单（见附件）。

2. 病原体及标本运输。

2.1 国内运输。

新型冠状病毒毒株或其他潜在感染性生物材料的运输包装分类属于A类，对应的联合国编号为UN2814，包装符合国际民航

组织文件Doc9284《危险品航空安全运输技术细则》的PI602分类包装要求；环境样本属于B类，对应的联合国编号为UN3373，包装符合国际民航组织文件Doc9284《危险品航空安全运输技术细则》的PI650分类包装要求；通过其他交通工具运输的可参照以上标准包装。

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》。

2.2 国际运输。

新型冠状病毒毒株或样本在国际间运输的，应规范包装，按照《出入境特殊物品卫生检疫管理规定》办理相关手续，并满足相关国家和国际相关要求。

2.3 毒株和样本管理。

新型冠状病毒毒株及其样本应由专人管理，准确记录毒株和样本的来源、种类、数量，编号登记，采取有效措施确保毒株和样本的安全，严防发生无用、恶意使用、被盗、被抢、丢失、泄露等事件。

二、新型冠状病毒的实验室检测

新型冠状病毒感染的常规检测方法是通过实时荧光RT-PCR鉴定。任何新型冠状病毒的检测都必须在具备适当条件的实验室由经过相关技术安全培训的人员进行操作。本指南中的核酸检测方法主要针对新型冠状病毒基因组中开放读码框1ab（open

reading frame lab, ORF1ab) 和核壳蛋白 (nucleocapsid protein, N)。

在实验室要确认一个病例为阳性，满足以下条件：

同一份标本中新型冠状病毒2个靶标 (ORF1ab、N) 特异性实时荧光RT-PCR检测结果均为阳性。如果出现单个靶标阳性的检测结果，则需要重新采样，重新检测。

阴性结果也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：样本质量差，比如口咽等部位的呼吸道样本；样本收集的过早或过晚；没有正确的保存、运输和处理样本；技术本身存在的原因，如病毒变异、PCR抑制等。

三、实时荧光 RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸

(一) 目的。

规范实时荧光RT-PCR方法检测新型冠状病毒核酸的工作程序，保证实验结果的正确可靠。

(二) 范围。

适用于实时荧光RT-PCR方法检测新型冠状病毒核酸。

(三) 职责。

检测人员：负责按照本检测细则对被检样本进行检测。

复核人员：负责对检测操作是否规范以及检测结果是否准确进行复核。

部门负责人：负责对科室综合管理和检测报告的审核。

(四) 样本接收和准备。

核对被检样本姓名、性别、年龄、编号及检测项目等；待检样本的状态如有异常，需注明；待检样本应存放于-70℃冰箱保存。

（五）检测项目。

1. 新型冠状病毒核酸测定（实时荧光RT-PCR方法）

推荐选用针对新型冠状病毒的ORF1ab、N基因区域的引物和探针。

靶标一（ORF1ab）：

正向引物（F）：CCCTGTGGGTTTTACACTTAA

反向引物（R）：ACGATTGTGCATCAGCTGA

荧光探针（P）：

5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3'

靶标二（N）：

正向引物（F）：GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAT

反向引物（R）：CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG

荧光探针（P）：5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'

核酸提取和实时荧光RT-PCR反应体系及反应条件参考相关厂家试剂盒说明。

2. 结果判断

阴性：无Ct值或Ct $\geq$ 40。

阳性：Ct值 $<$ 37，可报告为阳性。

灰度区：Ct值在37-40之间，建议重复实验，若重做结果Ct

值 <40 ，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

注：如果用的是商品化试剂盒，则以厂家提供的说明书为准。

四、病原生物安全实验活动要求

根据目前掌握的新型冠状病毒的生物学特点、流行病学特征、临床资料等信息，该病原体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，具体要求如下：

（一）病毒培养。

病毒培养是指病毒的分离、培养、滴定、中和试验、活病毒及其蛋白纯化、病毒冻干以及产生活病毒的重组实验等操作。上述操作应当在生物安全三级实验室的生物安全柜内进行。使用病毒培养物提取核酸，裂解剂或灭活剂的加入必须在与病毒培养等同级别的实验室和防护条件下进行，裂解剂或灭活剂加入后可比照未经培养的感染性材料的防护等级进行操作。实验室开展相关活动前，应当报经国家卫生健康委批准，取得开展相应活动的资质。

（二）动物感染实验。

动物感染实验是指以活病毒感染动物、感染动物取样、感染性样本处理和检测、感染动物特殊检查、感染动物排泄物处理等实验操作，应当在生物安全三级实验室的生物安全柜内操作。实验室开展相关活动前，应当报经国家卫生健康委批准，取得开展相应活动的资质。

(三) 未经培养的感染性材料的操作。

未经培养的感染性材料的操作是指未经培养的感染性材料在采用可靠的方法灭活前进行的病毒抗原检测、血清学检测、核酸提取、生化分析，以及临床样本的灭活等操作，应当在生物安全二级实验室进行，同时采用生物安全三级实验室的个人防护。

(四) 灭活材料的操作。

感染性材料或活病毒在采用可靠的方法灭活后进行的核酸检测、抗原检测、血清学检测、生化分析等操作应当在生物安全二级实验室进行。分子克隆等不含致病性活病毒的其他操作，可以在生物安全一级实验室进行。

附表

新型冠状病毒检测标本送检表

送样单位(盖章): _____
送样人: _____

送样日期: _____年____月____日

标本 编号	标本类型	姓名	性别	年龄	发病日期	就诊日期	采样日期	样本来源是否 为聚集性病例 §	检测日期	实时荧光 RT-PCR		基因序列同源性*		备注
										试剂厂家	靶基因	一代	深度测序	

基因序列同源性*非必选项，注明完成具体靶基因序列/全基因组序列，及其与新型冠状病毒的同源性。样本来源是否为聚集性病例 § 填是或否。