

新型冠状病毒肺炎防疫期 疾病组织样本采集、存储及应用过程中的 操作规范和建议

李鸣宇, 徐骏, 冯芝恩, 泥艳红, 李江, 潘新华, 李志会, 严明,
王旭, 张建军, 陈万涛

2019年12月以来,湖北省武汉市出现新型冠状病毒肺炎,并蔓延至国内其他省市和地区^[1]。我国研究人员第一时间分离确定了引起这次新型冠状病毒肺炎病原体——新型冠状病毒(2019-nCoV)^[2]。2020年2月11日,国际病毒分类委员会(international committee on taxonomy of viruses, ICTV)宣布,新型冠状病毒(2019-nCoV)的正式分类名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2);而世界卫生组织(WHO)同日宣布,由SARS-CoV-2这一病毒导致的疾病正式名称为冠状病毒感染导致的疾病(corona virus disease, COVID-19)^[3-5]。

该病作为急性呼吸道传染病已被纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病,按甲类传染病管理^[6]。新型冠状病毒属于 β 属的冠状病毒,其基因特征与SARSr-CoV和MERSr-CoV有明显区别。病毒的理化特性是对紫外线和热(56℃, 30 min)很敏感,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SARS-CoV-2病毒;而氯己定不能灭活SARS-CoV-2病毒^[7]。目前传染源主要是SARS-CoV-2病毒感染的COVID-19患者,无症状感染者也可能成为该疾病的传染源^[7]。研究证实,SARS-CoV-2病毒S蛋白能与宿主组织细胞的血管紧张素转化酶2(ACE2)受体结合,这是该病毒侵入人体组织器官的大门。研究还发现,ACE2在肺脏细胞有高表达,另外在心脏、食道、肾、膀胱和回肠也有很高的表达,所以SARS-CoV-2病毒除感染肺部外,同样也可能通过ACE2受体攻击人体的心脏、食道、肾、膀胱和回肠等器官^[8]。SARS-CoV-2病毒主要的传播途径是经呼吸道飞沫和接触传播,气溶胶和消化道等传播途径尚待明确。该疾病临床表现多样性,潜伏期1~14 d,多为3~7 d;有报道个别感染者潜伏期时间较长,达到24 d或更长;以发热、乏力、干咳为主要表现;少数患者伴有鼻塞、流涕、咽痛和腹泻等症状。重症患者多在发病一周后出现呼吸困难和(或)低氧血症,严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍等^[7]。临床实践已发现,存在一小部分新型冠状病毒感染者,尤其症

状轻微或无症状者;另外,还有最后确定的感染者,由于取样的困难或检测技术,前期出现实验室病毒检测一次或几次的假阴性。最近COVID-19尸体解剖系统病理学观察发现,SARS-CoV-2病毒感染主要引起深部气道和肺泡损伤为特征的炎性反应,渗出性反应较SARS明显,而肺部纤维化及实变没有SARS导致的病变严重^[9]。对新型冠状病毒肺炎逝世患者进行微创穿刺获取的组织样本,经过组织病理学检查发现,双肺组织都出现了急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的病理表现;外周血CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞数量明显减少,并发现上述T淋巴细胞处于过度激活状态^[10]。

当下在新型冠状病毒肺炎防疫的特殊时期,也就是该疾病按甲类传染病管理的特殊时期,原则上不建议采集非临床研究和基础研究所必须的疾病生物组织样本。对于组织样本捐献者,必须先期进行流行病学、临床表现、实验室检查等甄别工作,尽可能排除新型冠状病毒肺炎以及SARS-CoV-2病毒感染者。需要特别注意的是,对于已采集的、后期任何时间确诊的新型冠状病毒肺炎或疑似患者的组织样本,及时参照《国家健康委办公厅关于印发新型冠状病毒实验室生物安全指南》要求,对相关样本进行特别处理,废弃物的管理进行销毁,销毁时参照上述指南要求做好场地和个人防护工作。

本文所述内容的主要适用范围是:在SARS-CoV-2导致的疫情期间,本区域已无爆发流行,但还时有个案发生;不直接接触新型冠状病毒肺炎确诊或疑似患者人群及其来源的组织样本,从事非传染疾病的组织样本临床采集、处理、存储和应用工作过程中,如何规避可能有的生物样本潜在感染及防控措施和操作规范,做到防疫和工作两不误。

基金项目:上海市科学技术委员会资助项目(18DZ2291500);国家重点研发计划(2016YFC0902700)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院,国家口腔疾病临床研究中心,上海市口腔医学重点实验室/上海市口腔医学研究所(李鸣宇、徐骏、李江、潘新华、李志会、严明、王旭、张建军、陈万涛);100050 北京,首都医科大学附属北京口腔医院(冯芝恩);210008 南京大学医学院附属口腔医院(泥艳红)

通信作者:陈万涛, Email: chenwantao2002@gmail.com

收稿日期:2020-03-05

1 人体组织样本采集

1.1 样本捐献者甄别

根据国家和地方新型冠状病毒感染肺炎诊断指南,完成详细的流行病学调查和相应的临床、实验室检查,明确排除新型冠状病毒肺炎确诊或疑似患者。病人需完成“排除新冠肺炎检查”的相关项目。新型冠状病毒肺炎诊断标准:根据国家卫生健康委员会《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第六版)》,新冠肺炎诊断需结合流行病学史、临床表现(①发热和(或)呼吸道症状;②具有新冠肺炎影像学特征;③发病早期白细胞总数正常或降低或淋巴细胞计数减少)综合分析。有任何流行病学中的任何1条,且符合临床表现中任意2条,或无明确流行病学史的,符合临床表现中的3条,可诊断为疑似病例。疑似病例具备病原学证据之一者(①实时荧光逆转录-聚合酶链反应检测新型冠状病毒核酸阳性;②病毒基因测序,与已知的新型冠状病毒高度同源),为确诊病例^[7]。

1.2 生物组织样本捐献知情同意书

生物组织样本捐献知情同意书添加内容“组织样本捐献者提供的流行病学史、临床检查、CT辅助诊断和新型冠状病毒检测等指标,已排除罹患新型冠状病毒肺炎或SARS-CoV-2病毒隐性感染”。因新型冠状病毒肺炎疫情原因,标准操作程序(SOP)、知情同意书等需要及时修订,并报请所在单位的伦理委员会审核、备案。

1.3 样本采集操作过程

在新型冠状病毒肺炎疫情特殊时期,为避免潜在的感染、传播风险,在整个操作中,样本采集人员采取二级生物安全防护。二级生物安全防护指:医用外科防护口罩或N95口罩、乳胶手套、工作服外隔离衣、医用防护帽,加手卫生,佩戴护目镜。样本收集分为两类:①手术后或活检的疾病组织样本;②漱口水、唾液、血液、粪便、尿液等体液样本;样本收集后,立即用75%酒精消毒收集管表面并放入密封袋中。具体请参照中华医学会新冠肺炎临床实验室检测的生物安全防护指南^[11]。

1.4 样本采集人员的个人防护

建议按照传染性疾病的样本库的SOP进行个人防护。对于非传染性样本库,重点需要突出“呼吸道”传染风险和防护措施。主要防护有:每4小时更换口罩,正确洗手或手卫生消毒。离开样本操作室需脱下防护面罩/眼镜、防护服;下班时进行个人卫生处置,注意呼吸道和黏膜的防护。佩戴注意事项:外科口罩佩戴时,双手沿鼻沿压紧贴合。所有口罩戴上后确认密封;摘下时不要触碰正面。防护服脱下之前,全身喷雾消毒(如可用有效氯浓度500 mg/L的消毒剂),按标准流程依次脱个人生物安全防护装备,污染面切勿接触内部衣物^[11]。出操作间后流动水下再次洗手。为预防长时间佩戴护目镜、口罩等出现压力性损伤,必要时使用薄型水胶体贴在鼻梁、颧弓、耳后乳突等受力点,保护皮肤,预防压力性损伤。

工作人员之间也应做预防性隔离,保持1 m以上距离,避免直接接触。间接接触的物品做好消毒处理。定时、定点监控所有工作人员,若出现有发热、咳嗽、乏力等新型冠状病毒肺炎相关症状,需要第一时间到医院发热门诊或指定门诊就诊,必要时给予医学观察和隔离,最大限度地避免交叉感染。

1.5 样本标识

在新型冠状病毒肺炎流行和防疫时期采集的组织样本,建议在疫情特殊时期给予额外的特殊标识和编号,特别注意样本库在信息化系统中,对疫情特别阶段收集的样本加上备注。对有条件的样本库,对疫情期间收集的所有样本单独入库储存,样本袋或冻存管要密封,要求透明、设有特殊生物安全标识,便于对后期可能确诊的SARS-CoV-2病毒感染患者的样本进行及时追踪和处理。

2 组织样本运送

2.1 医院内运送

疫情期间,样本医院内从病房或门诊到组织库,或从组织库到实验室等部门间的院内运送,要严格按照组织样本库生物样本运输SOP进行。运送前做好各项安全保障工作,样本液氮罐或运送箱要求质量合格、密封良好、有生物安全标识,坚固、耐用、专用。包装材料应满足防水、防破损、防外泄、耐高温、易于消毒处理等要求。需冷藏运送的唾液、血液等样本由采集人员放入可密封的采血管或离心管,装入样本袋中。一般无特殊要求,血液、尿液等样本运输过程中保持在2~10℃,包装好的组织样本应放置在专用样本运输箱中,并加入适量的袋装干冰冷藏运输;运送时间如果超过2 h以上,应记录组织样本运输箱内的实际温度。运送过程中应防颠簸,防止试管内溶血,防止破损,以防样本被污染,或污染其他样品、物品。需冷冻运送的组织样本,要保证液氮充足,避免运送过程中液氮溢出或挥发后降低低温保存效果。运输箱底座并有一定的防震能力,能耐受常规的运输颠簸不会倾倒。放置液氮内的样本容器,应在液氮条件下保持良好的机械强度和密闭性,避免取出时炸裂污染或伤人。严禁使用纱布、纸张直接包裹组织样本,冻存管质量可靠,盖子必须拧紧。

2.2 医院外运输

在SARS-CoV-2病毒疫情期间,新收集的组织样本建议尽量暂缓外部转运。特殊原因,必须外部(市内或国内)转运,要按照国家和地方生物组织样本转运要求向所在单位提交申请报告,申请批复后启动样本转运程序。首先要确认接收方资质,签订特殊时期样本转运合同。所有样本均作为潜在感染性材料运输,按照《可感染人类的高致病性病原微生物(毒)种或样本运输管理规定》(卫生部令第45号)办理《准运证书》。

使用A类生物安全运输箱密闭转运、固定行走路线、严格样本交接登记,并有防污染泄漏的应急措施。A类生

物安全运输箱,使用两层包装,即主容器和运输容器。运输容器为金属或塑料容器,可耐压力灭菌或化学消毒剂作用,容器盖应有垫圈、密闭、防水、防漏,并定期清除污染。主容器为装有样本的管或瓶,运输时主容器必须用吸收或缓冲材料固定,并保持直立。实行专车运输。外包装内附有详细样本信息单,在外包装醒目位置贴有生物危险标识^[12-13]。转运人员个人一级以上生物安全防护。

实验室接收人员着工作服、医用帽、外科口罩或 N95 口罩、塑胶手套。接收样本时需确认转运者标识,转运箱特殊标识及装箱前消毒环节。如果不确定是否消毒、怀疑消毒不到位时,可于开箱瞬间 75% 乙醇喷雾消毒,并做好过程记录工作。

3 组织样本处理和衍生物制备

3.1 样本处理实验室要求

实验区建议尽可能符合二级生物安全实验室规范^[14]。应有硬性隔断,并有良好的通风通气条件。操作前紫外线照射消毒,用含有效氯 2000 mg/L 消毒液喷洒消毒。物表、地面用含有效氯 2000 mg/L 消毒液擦拭消毒,每天至少 2 次;有污染时随时消毒,尤其关注高频接触物件的表面(如各类把手、按键、仪器面板、楼梯走道等)。除仪器维修、质检、保洁相关人员外,严格禁止其他人员进入。

3.2 样本接收入库

从密封袋取出装有组织样本的冻存管或离心管等容器后,须进行 75% 乙醇喷雾消毒,或紫外线消毒。在疫情防控期间为避免组织样本交叉感染,所接收的组织样本进行预入库操作,统一放置规定的临时存储区,在接收组织样本 15 d 后,再次确认组织样本捐献者无感染情况下,再行标准入库操作。

3.3 样本处理、制备和销毁

分拣、剪切、离心组织样本时,操作者须二级生物安全防护。剪切、剖解、分块组织样本,带双层手套,在生物安全柜中操作;血液等液体样本离心前,仔细检查离心管,保证无破损,管盖严密。停止离心后,小心开盖;仔细检查,如发现有液体溅出,75% 乙醇喷雾消毒转子和离心管后,再对标本进行处理。有条件尽可能在生物安全柜中,进行转子中离心管的放入和取出。离心完毕,立即用含 0.55% 氯的消毒液对离心机进行消毒、清洁处理^[11]。

尽可能避免或少打开装有样本的离心管盖;需要打开时,操作尽量在生物安全柜内进行,要轻柔缓慢,和操作者面部保持足够远距离。尽可能缩短打开盖的持续时间,主要是避免产生气溶胶。如果可以,酒精喷雾消毒。如果需要打开的是试管塞、或有可能产生气溶胶的操作,则必须在生物安全柜内进行操作。

血液、唾液、尿液等体液样本应在生物安全柜中重新加盖。提取 DNA 或沉淀物前,可以对样本先行消毒。包括 56 °C 孵育 30 min,加蛋白酶 K。黏液痰加胰蛋白酶或 4%

NaOH 操作时,避免气溶胶产生。保持环境有效负压(如果具备条件),及时稀释、排除气溶胶。分泌物涂片也要在安全柜内涂布,涂布后须紫外线照射 30 min。对样本培养进行的相关操作,如液化、振荡、涂布、划线等,也须在生物安全柜内完成。操作完毕,即用含 0.55% 氯的消毒液对生物安全柜进行消毒、清洁处理,并开启紫外线灯消毒 30 min。

因为 SARS-COV-2 病毒主要感染肺脏,还可能感染食道、肾、膀胱、心脏和结直肠等组织器官^[8],在处理来源于这些组织器官样本时,应该重点予以注意;另外,血液、唾液、痰、粪便和尿液是病毒所在体液,处理这些样本更要严格按照规范操作和防护。样本经各种制备后,密封并做好特殊标识,表面须喷洒消毒液后保存。

实验室检测结束后的血样本等经高温高压处理后,由保管人员提交部门审批后送至医院医疗生物样本废物暂存处,由指定单位集中进行焚烧处理。

4 随访

新型冠状病毒肺炎疫情期间,根据研究方案要求,提前做好受试者随访计划;在保证安全的前提下,尽量通过网络视频、电话、微信等其他即时通讯方式进行远程随访,并如实详尽记录远程随访的过程,尽量减少病例脱落。联系随访者,应询问受试者目前是否有发热、咳嗽等新型冠状病毒肺炎相关症状。

样本库人员应及时沟通临床随访人员,万一发现样本捐赠者新增确诊为新型冠状病毒感染,立即根据《新型冠状病毒感染的肺炎疫情医疗废物应急处置管理与技术指南(试行)》^[14]的相关规定对相关样本进行处理。

5 小结

目前,新型冠状病毒正在一些中国以及国外某些地区肆虐,SARS-CoV-2 病毒有极强的传染性。还有隐性感染者等特点,已对大众生命健康造成了强于 SARS 的危害,并进一步影响了经济建设和民众生活秩序。我们坚信只要贯彻“坚定信心、同舟共济、科学防治、精准施策”的疫情防控指导原则,严格落实“分区分级差异化疫情防控措施”的指示,统筹推进疫情防控和社会经济发展,就一定能打赢疫情防控阻击战、同时努力实现我国经济社会发展目标任务。鉴于新型冠状病毒感染患者的临床特点,尤其存在一小部分新型冠状病毒感染者,尤其症状轻微或无症状者,不能得到及时的诊断;另外,还有很少一部分患者,实验室 SARS-CoV-2 病毒检测呈现一次或几次的假阴性现象。上述各种原因造成的新型冠状病毒感染者的诊断遗漏,无疑给临床组织样本的收取、处理和应用带来了可能的风险。本文总结了在不直接接触新型冠状病毒肺炎确诊或疑似人群及其来源的生物组织样本前提下,从事人体组织样本采集、处理、存储和应用工作过程中的一些预防性防控措施和操作规范,供广大在实

践中读者参考。毫无疑问,新型冠状病毒是一种全新的病毒,传染性极强,人们对其特性和发病机制认识尚处于初期阶段,本文所述的观点和措施肯定存在一些不当或值得改进之处,在此还请广大读者、传染病和生物样本库专业的老师不吝指正和建议,以便及时完善和修订。

志谢 感谢郑小辉、王艳、孙孟红、刘世建、陈福祥、许锋等生物样本库领域的专家对论文的修改和建议。

参考文献

- [1] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*, 2020 Jan 29. [Epub ahead of print]
- [2] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020, 382(8):727-733.
- [3] World Health Organization. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. (2020-02-11). <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.
- [4] Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv*, 2020 Feb 11.
- [5] International Committee on Taxonomy of Viruses. Naming the 2019 Coronavirus. <https://talk.ictvonline.org/>.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中华人民共和国国家卫生健康委员会公告(2020年第1号). (2020-01-20). <http://www.nhc.gov.cn/kj/s7916/202001/44a3b8245e8049d2837a4f27529cd386.shtml>.
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 中华人民共和国国家中医药管理局. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知. (2020-02-19). <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [8] Zou X, Chen K, Zou JW, et al. The single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to Wuhan 2019-nCoV infection. *Front Med*, 2020. [Epub ahead of print]
- [9] 刘茜, 王荣帅, 屈国强, 等. 新型冠状病毒肺炎死亡尸体系统解剖大体观察报告. *法医学杂志*, 2020, 36(1):19-21.
- [10] Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*, 2020 Feb 18. [Epub ahead of print]
- [11] 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(试行第一版). (2020-01-30). <http://www.cslm.org.cn/cn/news.asp?id=73.html>.
- [12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎防控方案(第三版)的通知. (2020-01-28). http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-01/29/content_5472893.htm.
- [13] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎防控方案(第三版). (2020-01-28). <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-01/29/5472893/files/2efb7f97b77d42d6b4baba8569ac73c.pdf>.
- [14] 中华人民共和国生态环境部. 新型冠状病毒感染的肺炎疫情医疗废物应急处置管理与技术指南(试行). (2020-01-29). http://www.gov.cn/xinwen/2020-01/29/content_5472997.htm.