

· 抗击新冠病毒感染专题 ·

抗击 COVID-19 感染病原性真菌实验室生物安全防护建议(试行)

陈伟 张晓梅 万喆 李若瑜 余进 王爱平 刘伟

(北京大学第一医院皮肤性病科;国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心;北京大学真菌和真菌病研究中心;皮肤病分子诊断北京市重点实验室,北京 100034)

【摘要】 随着 COVID-19 感染疫情的不断蔓延,实验室生物安全防护成为急需重视的重要问题。为响应国家号召,我们参照国家建议和相关文件,提出本建议。从适用范围、安全原则、个人防护、标本采集、转运、处理、检验及检验后、职业暴露等方面,对病原真菌临床检查的生物安全防护进行了建议。希望在实际工作中落实并不断完善。

【关键词】 COVID-19 感染;病原真菌;临床检查;临床实验室;生物安全

【中图分类号】 R 519 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2020)15-0006-04

Biosafety proposal for fungal examination in combating COVID-19 infection

CHEN Wei, ZHANG Xiao-mei, WAN Zhe, LI Ruo-yu, YU Jin, WANG Ai-ping, LIU Wei

(1. Department of Dermatology and Venereology, Peking University First Hospital; National Clinical Research Center for Skin and Immune Diseases; Research Center for Medical Mycology, Peking University; Beijing Key Laboratory of Molecular Diagnosis of Dermatoses, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

【Abstract】 With the outbreak and spread of the COVID-19 infection, biosafety in clinical laboratory has become increasingly important. Based on Chinese National Recommendations and relevant guidelines, we propose this document about biosafety when fungal examination. This proposal consists of applicability, safety principles, personal precaution, specimen collection, specimen transport, specimen handling, analysis, post-analysis and occupational exposure, and gives recommendations on biosafety precaution and biosafety protection. We hope that it can be practically implemented and continuously improved to ensure laboratory safety.

【Key words】 COVID-19 infection; pathogenic fungi; fungal examination; clinical laboratory; biosafety

[Chin J Mycol, 2020, 15(1):6-9]

2019 年底开始出现于武汉的新型冠状病毒肺炎(novel coronavirus pneumonia, NCP)是由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(COVID-19)感染所致,目前已经扩散到全国乃至国际,对我国和全球公众健康都产生了重要影响^[1]。截止 2020 年 2 月 15 日,全国确诊病例 68584 例,疑似病例 8228

例,死亡 1666 例,其危害已远远超过 2003 年的严重急性呼吸综合征(SARS)。在这次 COVID-19 肆虐中,院内交叉感染是非常突出的问题^[2],其中医务人员感染 1716 例,有 6 位不幸离世。目前该病已纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病并采取甲类传染病的防控措施。

微生物学检查在 NCP 患者的病原学诊断中发挥着十分关键的作用,为了进行鉴别诊断以及排除继发或并发真菌感染,真菌学实验室也承担着重要的检测工作,必须保护好操作人员和环境,确保实验室的生物安全万无一失。随着对 NCP 的临床特征和演变规律的深入认识并结合对临床微生物学

基金项目: 国家自然科学基金(81671990, 81861148028, 81971912),科技部“艾滋病和肝炎等传染病防治重大专项”(2018ZX10712-001)和“创新药物研发重大专项”(2017ZX09304028009)

作者简介: 陈伟,男(汉族),大专,主管技师. E-mail: wei_cw@sohu.com

通信作者: 刘伟, E-mail: liuweil@bjmu.edu.cn

检验知识的梳理,参考相关文件^[3-8],我们特提出抗击 NCP 疫情形势下病原性真菌实验室检查生物安全防护建议。

1 适用范围

供临床微生物检查实验室(包括皮肤科真菌实验室、检验科真菌实验室等)、医疗机构科研性实验室、基础医学实验室、动物实验室等相关人员在工作中参考。

2 安全原则

进行必要的生物安全风险评估,基于生物安全风险评估实施生物安全计划。避免过度防护、过度消毒。依第二版生物安全指南^[5]和病原性真菌临床检查方法^[9],确定如下原则。

2.1 对 NCP 确诊患者和疑似患者临床标本

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,应在生物安全三级实验室开展。在生物安全二级实验室开展时,操作者须三级生物安全防护。

开展前应由省级卫生行政部门审核后报国家卫生健康委员会批准。可参照中华医学会检验医学分会颁布的“2019 新型冠状病毒肺炎临床实验室生物安全防护专家共识”^[8]进行生物安全风险评估,实施生物安全计划。

2.2 对于一般患者

按试行第五版诊疗方案中确定的疑似病例、确诊病例之外的其他患者,本建议称为一般患者^[4]。患者感染 COVID-19 的概率低,在对此类患者进行标本现场采集检测或对患者其他标本检测时,须有一级生物安全防护。

3 个人安全防护

3.1 防护用品和分级^[6]

医用外科口罩(YY0469-2011)、医用防护口罩(GB19083-2010)、N95(美国 NIOSH42CF R84-1995)[下文包括 KN95(GB2626-2019)]、防护服(GB 19082-2003 或 2009)、隔离衣、工作服、乳胶手套、医用防护帽、护目镜(GB/T 14866)、鞋套。

一级生物安全防护:医用外科口罩、乳胶手套、工作服,加手卫生,可戴医用防护帽。

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。必要时(比如有喷溅风险)可加护目镜。

三级生物安全防护:医用防护口罩或 N95、单或双层医用防护帽、面屏、护目镜、双层乳胶手套(条件许可,可以不同颜色)、工作服外防护服、鞋套,加手卫生。必要时双层口罩(外医用防护口罩,内 N95)。

防护底线:必须要有医用口罩、工作服、手套。

佩戴注意事项:医用外科口罩佩戴时,双手沿鼻压紧贴合。所有口罩戴上后确认密封;摘下时不要触碰正面。手套佩戴前须确认气密性。防护服穿脱符合规范。脱去之前全身喷雾消毒(有效氯浓度 500~1000 mg/L 消毒液或 75%乙醇),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,手不接触外表面^[10]。

3.2 用品和消毒

消毒 对于确诊和疑似患者,建议用涉及 NCP 的专用标本转运箱,要求正规、密封良好、有生物安全标识、方便、坚固、防水、防破损。转运箱定期清洁消毒(有效氯浓度 500 mg/L 消毒液或 75%乙醇)。较长期保存之前,从医院之外送回后,须进行清洁消毒(有效氯浓度 500 mg/L 消毒液或 75%乙醇)。转运箱一般不进入隔离病房;如果是从隔离病房内取出,需要内部和外部清洁消毒(有效氯浓度 1000 mg/L 消毒液或 75%乙醇)。

密封标本袋,要求透明、有生物安全标识。

生物安全柜 需采用二级生物安全柜。生物安全柜须年检合格、性能验证通过、运行期间性能指标符合要求。实验室具备良好规范操作,并执行每日功能监测、清洁消毒等。生物安全柜以紫外杀菌灯消毒为主。也可以用 75%乙醇消毒(不建议含氯消毒剂),消毒后建议清水擦拭。

紫外线杀菌灯 符合国家标准^[11]。定期检测性能、完整记录、累积使用不超过规定时限。每次消毒时间大于 30 min。注意有效消毒距离。实验室内消毒,必要时可以采用移动式紫外线杀菌灯,以避免层高导致无效。

消毒液 每天实验前后要对实验室桌面、台面及地面消毒,使用 1000 mg/L 有效氯的消毒液进行。消毒液新鲜配置,有效时间不超过 24 h。清洁区可以使用 500 mg/L 有效氯的消毒液。建议进行浓度测试。

3.3 环境

浅部真菌检验实验区须符合二级生物安全实

实验室规范。深部真菌检测符合二级或三级生物安全实验室规范。

核酸检测(如 PCR)则必须具备相应资质、且实验室环境符合分子生物学实验室基本要求。

实验室严格管理,分区到位。除实验室人员和保洁等相关人员外,禁止无关人员进入。相关物品分区放置,按时更换。清洁区和实验区按常规消毒。

3.4 个人

具备相应工作资质、岗位能力认可。接受专业培训,掌握相应技术规范、操作规程、生物安全防护知识和实际操作技能,并考核合格。接受 COVID-19 相关微生物学、感染病学、流行病学、感染控制学等培训,并考核合格。掌握正确地洗手时机;正确行手卫生(七步洗手法)。不随意触摸面部皮肤、眼睛、鼻孔等黏膜相关部位。建议剪短长发。禁止佩戴饰物。生活区内,遵守纪律,注意防护,避免聚集。禁止泄露患者隐私。

健康的心理,树立正确理念,对疾病有科学正确的理解,避免恐慌焦虑,不轻信未经科学证实言论。科学地做好防护,积极乐观地开展工作。

4 标本采集、转运、接收、检测和检测后

4.1 浅部真菌标本采集检测

指对怀疑有浅部真菌感染的皮肤及附属器标本的真菌检测。

一般患者^[9]对这些患者进行标本现场采集检测时,须有一级生物安全防护;要求门诊就诊或病房住院患者须正确佩戴医用外科口罩或 N95 口罩;操作者要佩戴医用外科口罩、乳胶手套、工作服、医用防护帽;操作过程要严格规范,取材时用一次性取材器械,在对患者皮损消毒及取材过程中,尽量不与患者接触;取材后标本先用 20% KOH 浸泡并在酒精灯上稍加热以溶解角质细胞,同时也可起到对微生物的灭活作用,然后可直接盖上盖玻片在显微镜下观察,也可加入荧光染料后盖上盖玻片进行显微镜下观察;建议真菌涂片镜检时采用荧光染色,易于发现真菌成分。显微镜下可观察到真菌菌丝或孢子^[9]。

NCP 疑似患者 不建议进入隔离区进行标本现场采集及检测;如必须检测时,检验人员须三级生物安全防护;标本采集及检测所用物品,如显微镜等,检测完成后不能立即带出隔离区,必须经专

业人员消毒后才可。

NCP 确诊患者 不建议进行皮肤等浅部真菌检测。

4.2 深部真菌标本采集和检测

包括痰液、支气管肺泡灌洗液及其它气道分泌物、血液、脑脊液、尿液、胸腔积液、心包积液、腹腔积液、关节液、腹透液标本以及皮肤或内脏组织等。

标本采集转运 一般患者:参考国家标准^[12-14]进行标本采集和转运。标本采集需把握好时间,采集时间最好在病程早期、急性期,且必须在使用抗菌药物之前采集,确保病原菌的检出;采集时严格无菌操作要求,避免正常菌群的污染,同时采集者需做好相应防护;用于真菌学检测的标本量应多于用于细菌学检测的标本,应置于无菌,防漏,带有螺旋盖的密闭容器中尽快送检;若不能及时送检,非无菌部位标本需要 4℃ 保存,无菌部位标本室温保存。如果标本量过少,液体(<1 mL)或组织(<1 cm³)应在 30 min 内送到实验室。一些深部真菌血清学试验如:G 或 GM 试验的血液标本,采集标本时需避免对检测产生影响,建议使用去热源无抗凝剂采血管,一些特殊患者如透析患者、使用静脉营养患者、严重黄疸患者等不建议做 G 试验。确诊或疑似患者:标本的采集和转运除参考上述两个标准外,所有标本还应遵循有关原则^[8]进行预处理。

标本检测 一般患者:深部真菌标本痰、便等进行显微镜观察前,建议将标本用紫外线照射 30 min,然后 56℃ 灭活 30 min 后进行;一些特殊标本如:支气管肺泡灌洗液、脑脊液等,要先进行离心,用离心沉淀物进行真菌镜检和培养;上清液可以进行 GM 试验或新型隐球菌荚膜抗原试验;真菌培养的标本不能 56℃ 灭活处理;真菌培养应在生物安全 II 级实验室开展,接种操作在二级生物安全柜中进行,28±2℃ 培养至少 1 周。G 试验、GM 试验和新型隐球菌荚膜抗原测定在血清检测前可 56℃ 灭活 30 min 后在二级生物安全柜中进行^[9]。对疑似患者:在没有确诊前不建议对有菌体液及开放体液进行检测;对于血液、脑脊液等无菌标本进检测时建议在三级生物安全实验室进行检验人员须三级生物安全防护。对确诊患者:不建议对有菌体液及开放体液进行检测。尽量减少不利于防护和消毒的检测,尽量使用全自动检测仪器,减少手工操作。

5 职业暴露的处理

对于一般患者标本污染生物安全柜的操作台造成局部污染,先使用新鲜配制的 5500 mg/L 有效氯含量的消毒液消毒 30 min,再用紫外线灯消毒 60 min。

对于确诊和疑似患者标本造成的实验室污染,要保持实验室空间密闭,禁止不相关人员出入。使用浸透 5500 mg/L 有效氯含量的消毒液的纱布覆盖污染区 30 min。然后使用高锰酸钾甲醛,对实验室空间进行熏蒸消毒。

6 小 结

为应对新型冠状病毒肺炎疫情的不断蔓延的严峻形势,本文响应国家号召,参照国家的有关建议和相关文件,从适用范围、安全原则、个人防护、标本采集、转运、处理、检验及检验后、职业暴露等方面,对病原真菌临床检查的生物安全防护进行了建议,希望有益于病原真菌临床实验室检查工作的开展,并在实际工作中不断完善。

参 考 文 献

- [1] Wang C, Horby PW, Hayden FG et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J/OL]. *The Lancet*, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
- [2] Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J/OL]. *JAMA*, 2020. doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [3] 中华人民共和国卫生健康委员会. 中华人民共和国传染病防治法 [EB/OL]. [2013-06-29]. <http://www.nhc.gov.cn/fzs/s3576/201808/6d00c158844f42c5bcf94993bffa665a.shtml>.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会办公厅,国家中医药管理局. 2020 年 2 月 4 日. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方

案(试行第五版).

- [5] 中华人民共和国卫生健康委员会. 国家卫生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(第二版)的通知(国卫办科教函[2020]70号)[EB/OL]. [2020-01-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml>.
- [6] 中华人民共和国卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于印发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)的通知(国卫办医函[2020]75号)[EB/OL]. [2020-01-27]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/e71c5de925a64eafbe1ce790debab5c6.shtml>.
- [7] 中华人民共和国国务院. 病原微生物实验室生物安全管理条例(国务院令 第 424 号)[EB/OL]. http://www.gov.cn/jzhengce/content/2008-03/28/content_6264.htm.
- [8] 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生物安全防护专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(00): E001.
- [9] 王端礼. 医学真菌学—实验室检验指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [10] 中华人民共和国卫生健康委员会. 经空气传播疾病医院感染预防与控制规范[S]. WS/T 511-2016,2016.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会. GB 19258-2012. 紫外线杀菌灯[M]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部令(第 45 号)——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[EB/OL]. [2005-12-28]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s3589/200804/081c1f4c9a934fda887c1534abb3dd94.shtml>.
- [13] 中华人民共和国卫生健康委员会. 临床微生物学检验标本的采集和转运. WS/T 640-2018,2019.
- [14] 中华人民共和国卫生健康委员会. 侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南. WS/T497-2017,2017.

[收稿日期] 2020-02-16

[本文编辑] 施 慧