

Annexe 4

Guide technique pour les tests de laboratoire de la pneumonie du nouveau coronavirus

Afin de guider les CDC à tous les niveaux avec les autres institutions concernées à effectuer des tests de laboratoire sur la pneumonie du nouveau coronavirus, ce guide technique est spécialement formulé.

(1) Objet de collection.

Les cas suspects et les cas d'infection de conglomération de pneumonie du nouveau coronavirus nécessitent un diagnostic différentiel d'infections du nouveau coronavirus ou d'autres matériels environnementaux ou biologiques après des tests de dépistage supplémentaires.

(2) Exigences de prélèvement d'échantillons.

1. Le personnel technique engagé dans la collecte de nouveaux échantillons de détection des coronavirus doit avoir une formation en biosécurité (formation qualifiée) et les compétences expérimentales correspondantes. Exigences en matière d'équipement de protection individuelle (EPI) pour le personnel d'échantillonnage: masques de protection N95 ou supérieurs, lunettes, vêtements de protection joints, gants en latex double couche, couvre-bottes imperméables; en cas de contact avec le sang, les liquides organiques, les sécrétions ou les excréments du patient, les gants extérieurs en latex doivent être remplacés en temps opportun.

2. Des échantillons de patients hospitalisés ont été collectés par le personnel médical de l'hôpital.

3. Les échantillons de contacts étroits sont collectés par les institutions locales de contrôle des maladies et médicales désignées.

4. Selon les besoins des tests de laboratoire, un échantillonnage multiple peut être combiné avec l'évolution de la maladie.

(3) Types de spécimens collectés.

Les échantillons respiratoires aigus (y compris les échantillons des voies respiratoires supérieures ou les échantillons des voies respiratoires inférieures) doivent être prélevés dans chaque cas. Dans les cas graves, les échantillons des voies respiratoires inférieures doivent être prélevés de préférence; les échantillons de selles, les échantillons de sang total et les échantillons de sérum peuvent être conservés en fonction des besoins cliniques.

Type d'échantillon:

1. Échantillons des voies respiratoires supérieures: y compris les écouvillons nasopharyngés, les écouvillons de la gorge, etc.

2. Échantillons des voies respiratoires inférieures: crachats de toux profonde, liquide de lavage alvéolaire, liquide de lavage bronchique, aspirations des voies respiratoires, etc.

3. Échantillons de selles: environ 10 grammes d'échantillons de matières fécales (de la taille d'une arachide) doivent être conservés. S'il n'est pas pratique de conserver les échantillons de selles,

des prélèvements anaux peuvent être prélevés.

4. Prélèvements sanguins: essayer de prélever l'anticoagulant en phase aiguë dans les 7 jours suivant le début de la maladie. Le volume de prélèvement est de 5 ml. Il est recommandé d'utiliser un vaisseau sanguin sous vide contenant un anticoagulant l'EDTA pour recueillir le sang.

5. Échantillons de sérum: essayez de recueillir autant de sérum que possible dans les phases aiguës et de récupération. Le premier sérum doit être prélevé dès que possible (de préférence dans les 7 jours après le début), et le deuxième sérum doit être prélevé 3 à 4 semaines après le début. Le volume de collecte est de 5 ml. Il est recommandé d'utiliser un vaisseau iliaque sous vide sans anticoagulant. Les échantillons de sérum sont principalement utilisés pour la détermination des anticorps et aucune détection d'acide nucléique n'est effectuée.

(4) Collecte et traitement des échantillons.

1. Écouvillon nasopharyngé: l'échantillonneur tenait légèrement la tête de la personne recueillie d'une main et tenait l'écouvillon d'une main. L'écouvillon était placé contre la narine et pénétrait lentement le long du bas du passage nasal inférieur. Comme le passage nasal est courbé, il ne peut pas être utilisé avec une force féroce, afin d'éviter les saignements traumatiques. Attendez le coton-tige lorsqu'il atteint la paroi arrière de la cavité nasopharyngée, et tournez-le doucement pendant une semaine (si vous avez une toux réflexe, vous devez rester pendant un certain temps), puis retirez lentement l'écouvillon et plongez la tête de l'écouvillon dans un tube contenant 2 à 3 ml de solution de stockage de virus (également une solution saline isotonique, une solution de culture tissulaire ou une solution tampon de phosphate), et jetez la queue et vissez fermement le capuchon du tube.

2. Écouvillon pharyngé: La personne recueillie se rince d'abord la bouche avec une solution physiologique. La personne chargée de l'échantillonnage place l'écouvillon dans une solution saline stérile normale pour l'humidifier (il est interdit de mettre l'écouvillon dans la solution de conservation du virus pour empêcher les antibiotiques de provoquer des allergies). Levez légèrement la bouche, ouvrez la bouche et émettez un «son», exposant les amygdales pharyngées des deux côtés. Passez l'écouvillon sur la langue. Frottez légèrement les amygdales pharyngées d'avant en arrière au moins 3 fois des deux côtés du sujet, puis essuyez les parois supérieure et inférieure du pharynx au moins 3 fois. Plonger la tête de l'écouvillon dans un tube contenant 2 à 3 ml de solution de conservation du virus (vous pouvez également utiliser une solution saline isotonique, une solution de culture tissulaire ou une solution tampon de phosphate), jeter la queue et serrer le capuchon du tube. L'écouvillon de gorge peut également être utilisé avec le nez Les tampons de gorge ont été placés dans le même tube.

3. Extrait nasopharyngé ou des voies respiratoires: utilisez un collecteur connecté à une pompe à pression négative pour extraire le mucus du nasopharynx ou extraire les sécrétions des voies respiratoires de la trachée. Insérez la tête du collecteur dans la cavité nasale ou la trachée, activez

la pression négative, tournez la tête du collecteur et retirez lentement, collectez le mucus extrait et rincez le collecteur une fois avec 3 ml de solution d'échantillonnage (vous pouvez également utiliser un cathéter pédiatrique pour vous connecter à une seringue de 50 ml Collecteur alternatif).

4. Crachats de toux profonde: Après que le patient a une toux profonde, recueillir les expectorations de toux dans un tube en plastique à visser de 50 ml contenant 3 ml de solution d'échantillonnage. Si les expectorations ne sont pas collectées dans la solution d'échantillonnage, vous pouvez ajouter 2 à 3 ml de la solution d'échantillonnage ou ajouter un volume égal de jus digestif d'expectorations avant le test. Formule de solution de stockage de jus digestif d'expectoration:

Ingrédients	Par bouteille
Dithiothréitol	0,1 g
Chlorure de sodium	0,78 g
Chlorure de phosphore	0,02
Hydrogénophosphate disodique	0,112 g
Dihydrogénophosphate de potassium	0,02 g
Eau	7,5 ml
pH 7,4 ± 0,2 (25 °C)	

Avant utilisation, diluer la solution mère à 100 ml avec de l'eau déionisée. Les expectorations peuvent également être liquéfiées avec un volume égal d'expectorations contenant 1 g / L de tampon phosphate protéinase K.

5. Liquide de lavage bronchique: insérez la tête du collecteur dans la trachée (environ 30 cm de profondeur) à partir de la narine ou de la cavité trachéale, injectez 5 ml de sérum physiologique, activez la pression négative, tournez la tête du collecteur et sortez lentement. Recueillir le mucus extrait et rincer le collecteur une fois avec la solution d'échantillonnage (vous pouvez également utiliser un cathéter pédiatrique pour vous connecter à une seringue de 50 ml au lieu de collecter).

6. Liquide de lavage alvéolaire: Après une anesthésie locale, insérez un bronchoscope par la bouche ou le nez à travers le pharynx dans la branche du lobe médian du poumon droit ou la langue pulmonaire gauche, et insérez la pointe dans l'ouverture de la branche bronchique. Ajoutez lentement de la physiologie de stérilisation à travers le trou de biopsie trachéale 30 ~ 50 ml d'eau salée, 100 ~ 250 ml au total, ne doivent pas dépasser 300 ml.

7. Échantillons de matières fécales: prendre 1 ml de solution de traitement des échantillons, prélever des échantillons de selles de la taille du soja et les ajouter au tube, souffler doucement et aspirer 3-5 fois, laisser reposer à température ambiante pendant 10 minutes, centrifuger à 8000 tr / min pendant 5 minutes et aspirer le surnageant pour détection. La solution de traitement des échantillons de selles peut être préparée seule: 1,211 g de Tris, 8,5 g de chlorure

de sodium, 1,1 g de chlorure de calcium anhydre ou 1,47 g de chlorure de calcium avec de l'eau cristalline, dissous dans 800 ml d'eau désionisée et ajusté le pH au pH 7.5, compléter à 1000 ml avec de l'eau déionisée.

Il est également possible de préparer des suspensions de selles en dissolvant des échantillons de selles en utilisant une solution de HANK ou une autre solution saline isotonique, une solution de culture tissulaire ou une solution tampon de phosphate. Si le patient présente des symptômes de diarrhée, prélever 3 à 5 ml d'échantillons de selles, mélanger en pipetant doucement, centrifuger à 8000 tr / min pendant 5 minutes et prélever le surnageant pour une utilisation ultérieure.

8.Écouvillon anal: utilisez un coton-tige stérile pour insérer délicatement 3 à 5 cm dans l'anus, puis retirez-le délicatement, placez-le immédiatement dans un tube d'échantillonnage à bouchon à vis extérieur de 15 ml contenant 3 à 5 ml de solution de conservation du virus, jetez la queue et tournez Serrez le capuchon du tube.

9. Échantillons de sang: Il est recommandé d'utiliser un vaisseau sanguin sous vide contenant un anticoagulant EDTA pour recueillir 5 ml d'échantillons de sang.En fonction du type de réactif d'extraction d'acide nucléique sélectionné, le sang total ou le plasma est utilisé pour l'extraction d'acide nucléique. Si le plasma doit être séparé, le sang total est centrifugé à 1 500 à 2 000 tr / min pendant 10 minutes et le surnageant est recueilli dans un tube en plastique stérile à vis.

10. Échantillons de sérum: des échantillons de sang de 5 ml ont été prélevés à l'aide d'un tube de prélèvement sanguin à pression négative sous vide, laissés à température ambiante pendant 30 minutes, centrifugés à 1500-2000 tr / min pendant 10 minutes, et le sérum a été recueilli dans un tube en plastique à vis stérile.

Autres matériaux: collectés selon les exigences de conception.

(5) Emballage des échantillons.

Les échantillons sont emballés dans une armoire de biosécurité dans un laboratoire secondaire de biosécurité après collecte.

1.Tous les échantillons doivent être placés dans un tube de prélèvement d'échantillons approprié avec un bouchon à vis et un joint à l'intérieur, résistant au gel et serrés. Le numéro d'échantillon, le type, le nom et la date d'échantillonnage sont indiqués à l'extérieur du récipient.

2.Emballez les échantillons scellés dans des sacs scellés avec un échantillon par sac. Les exigences d'emballage des échantillons doivent répondre aux normes correspondantes du Règlement technique pour la sécurité du transport aérien des marchandises dangereuses.

3.Pour le transport des échantillons externes, un emballage à trois couches doit être effectué en fonction du type d'échantillons et des substances infectieuses de type A ou B.

(6) Conservation des échantillons.

Les échantillons destinés à l'isolement du virus et à la détection des acides nucléiques doivent être testés dès que possible. Les échantillons qui peuvent être détectés dans les 24 heures

peuvent être stockés à 4 ° C; les échantillons qui ne peuvent pas être détectés dans les 24 heures doivent être stockés à -70 ° C ou moins (si 70 ° C conditions de stockage, puis temporairement stocké dans -20 ° C réfrigérateur). Le sérum peut être conservé à 4 ° C pendant 3 jours et peut être conservé longtemps en dessous de -20 ° C. Une bibliothèque ou un comptoir spécial doit être mis en place pour conserver les spécimens séparément. Évitez les cycles répétés de gel-dégel pendant le transport des échantillons.

(7) Envoi du spécimen pour examen.

Les échantillons doivent être envoyés au laboratoire dès que possible après le prélèvement. Si un transport longue distance est nécessaire, il est recommandé d'utiliser la réfrigération comme la glace carbonique pour la conservation.

1. Envoi du spécimen

Des échantillons de cas d'infection de conglomération de diverses provinces (régions autonomes et municipalités relevant directement du gouvernement central) sont soumis à l'Institut de prévention et de contrôle des maladies virales du Centre chinois de contrôle et de prévention des maladies pour examen et examen, et un formulaire de soumission d'échantillon est joint (voir le tableau ci-joint).

2. Transport d'agents pathogènes et d'échantillons

2.1 Transport domestique

La classification de l'emballage de transport des nouvelles souches de coronavirus ou d'autres matières biologiques potentiellement infectieuses appartient à la classe A, le numéro UN correspondant est UN2814, et l'emballage répond aux exigences de l'emballage de classification PI602 du document OACI Doc9284 «Règlement technique pour la sécurité du transport aérien des marchandises dangereuses»; environnement L'échantillon appartient à la catégorie B, le numéro ONU correspondant est UN3373 et l'emballage est conforme aux exigences d'emballage de classification PI650 du document OACI Doc9284 «Règlement technique pour la sécurité du transport aérien des marchandises dangereuses»; pour le transport par d'autres moyens de transport, il est possible de se référer à l'emballage standard ci-dessus. Les nouvelles souches du nouveau coronavirus ou d'autres matières potentiellement infectieuses doivent être transportées conformément au «Règlement sur la gestion du transport des espèces ou des échantillons de micro-organismes pathogènes hautement pathogènes (poisons) qui infectent les humains» (original du décret n ° 45 du ministère de la Santé) pour le «Permis de transport».

2.2 Transport international

Lorsque de nouvelles souches ou de nouveaux échantillons de coronavirus sont transportés à l'échelle internationale, l'emballage doit être normalisé, les procédures pertinentes doivent être traitées conformément au «Règlement sur l'administration de la quarantaine sanitaire des articles spéciaux à l'entrée et à la sortie» et les exigences nationales et internationales pertinentes

doivent être respectées.

2.3 Gestion des souches et des échantillons

Les nouvelles souches de coronavirus et leurs échantillons doivent être gérés par une personne, en enregistrant avec précision la source, le type, la quantité et l'enregistrement des souches et des échantillons, en prenant des mesures efficaces pour garantir la sécurité des souches et des échantillons et en prévenant les abus, les utilisations malveillantes et le vol, perte, accidents, fuites, etc.

2. Tests en laboratoire de nouveaux coronavirus

La méthode de détection conventionnelle des nouvelles infections à coronavirus est la RT-PCR fluorescente en temps réel. La détection de tout nouveau coronavirus doit être effectuée dans un laboratoire qualifié par du personnel formé à la sécurité technique pertinente. La méthode de détection des acides nucléiques dans ce guide vise principalement le cadre de lecture ouvert 1ab (ORF1ab) et la protéine nucléocapside (N) dans le nouveau génome du coronavirus. Les cas positifs confirmés en laboratoire doivent remplir l'une des deux conditions suivantes:

1. Dans le même échantillon, les résultats de la RT-PCR fluorescente en temps réel de deux cibles du nouveau coronavirus (ORF1ab, N) étaient positifs. Si une seule cible a un résultat de test positif, vous devez rééchantillonner et retester. S'il est toujours positif pour une seule cible, il est déterminé comme positif.
2. Les résultats de la RT-PCR fluorescente en temps réel de deux échantillons sont positifs pour une seule cible en même temps, ou les résultats des tests d'une seule cible sont positifs pour deux échantillons du même type d'échantillons, qui peuvent être jugés positifs. Les résultats négatifs des tests d'acides nucléiques ne peuvent pas exclure de nouvelles infections à coronavirus. Et le traitement des échantillons; la raison de la technologie elle-même, comme la mutation du virus, l'inhibition de la PCR, etc.

3. Méthode RT-PCR fluorescente en temps réel pour la détection de nouveaux acides nucléiques de coronavirus

(1) Objet.

Standardiser la méthode RT-PCR fluorescente en temps réel pour détecter les nouvelles procédures de travail des acides nucléiques des coronavirus afin d'assurer la précision et la fiabilité des résultats expérimentaux.

(B) la portée.

Il convient à la détection RT-PCR fluorescente en temps réel de nouveaux acides nucléiques de coronavirus.

(3) Fonctions.

Personnel de test: responsable du test des échantillons testés conformément à ces règles de test.

Réviser: responsable de vérifier si l'opération de test est normalisée et si les résultats du test

sont exacts.

Chef de département: Responsable de la revue des rapports complets de gestion et de tests du département.

(4) Réception et préparation des échantillons.

Vérifiez le nom, le sexe, l'âge, le numéro de série et les éléments de test de l'échantillon à tester; si le statut de l'échantillon à tester est anormal, veuillez l'indiquer;

(5) Test des éléments.

1. Nouveau dosage d'acide nucléique de coronavirus (méthode RT-PCR fluorescente en temps réel)

Des amorces et des sondes ciblant les régions des gènes ORF1ab et N du nouveau coronavirus sont recommandées.

Cible une (ORF1ab):

Amorce sens (F): CCCTGTGGGTTTACACTTAA

Amorce inverse (R): ACGATTGTGCATCAGCTGA

Sonde fluorescente (P):

5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3 '

Cible II (N):

Amorce sens (F): GGGGAAGTTCTCCTGCTAGAAT

Amorce inverse (R): CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG

Sonde fluorescente (P): 5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3 '

Pour l'extraction d'acide nucléique et le système de réaction RT-PCR fluorescent en temps réel et les conditions de réaction, veuillez vous référer aux instructions du kit du fabricant concerné.

2. Jugement des résultats

Négatif: pas de valeur Ct ou $Ct \geq 40$.

Positif: $Ct < 37$, peut être déclaré positif.

Zone grise: la valeur Ct est comprise entre 37 et 40. Il est recommandé de répéter l'expérience. Si le résultat de rétablissement est une valeur $Ct < 40$, la courbe d'amplification a des pics évidents.

Remarque: Si un kit commercial est utilisé, les instructions du fabricant prévaudront.

4. Exigences pour les expériences de sécurité des agents pathogènes

Selon les caractéristiques biologiques, les caractéristiques épidémiologiques, les données cliniques et d'autres informations sur le nouveau type de coronavirus actuellement disponibles, l'agent pathogène est géré temporairement selon la deuxième catégorie de micro-organismes pathogènes dans le degré de classification des dangers des micro-organismes pathogènes. Les exigences spécifiques sont les suivantes:

(1) Culture de virus.

La culture de virus fait référence à des opérations telles que l'isolement, la culture, le titrage, les

tests de neutralisation, la purification de virus vivants et de leurs protéines, la lyophilisation des virus et les expériences de recombinaison qui produisent des virus vivants. Les opérations ci-dessus doivent être effectuées dans une armoire de biosécurité dans un laboratoire tertiaire de biosécurité. Faire

L'extraction d'acides nucléiques à partir de cultures virales, l'ajout d'agents de lyse ou d'inactivation doivent être effectués dans les mêmes conditions de laboratoire et de protection que la culture virale. Niveau à exploiter. Avant d'entreprendre des activités connexes, le laboratoire doit faire rapport à la Commission nationale de la santé et de la santé pour approbation afin d'obtenir les qualifications nécessaires pour mener à bien les activités correspondantes.

(2) Expériences d'infection animale.

Les expériences d'infection animale se réfèrent à des opérations expérimentales telles que l'infection d'animaux par un virus vivant, l'échantillonnage d'animaux infectés, le traitement et l'analyse d'échantillons infectieux, l'inspection spéciale des animaux infectés, le traitement des excréments d'animaux infectés, etc., et doivent être effectuées dans une enceinte de sécurité biologique dans un laboratoire de biosécurité de troisième niveau. Avant d'entreprendre des activités connexes, le laboratoire doit faire rapport à la Commission nationale de la santé et de la santé pour approbation afin d'obtenir les qualifications nécessaires pour mener à bien les activités correspondantes.

(3) Fonctionnement des matières infectieuses non cultivées.

L'opération de matériel infectieux non cultivé fait référence à des opérations telles que la détection d'antigène viral, les tests sérologiques, l'extraction d'acide nucléique, l'analyse biochimique et l'inactivation d'échantillons cliniques effectués avant l'inactivation de matériel infectieux non cultivé par des méthodes fiables devrait être vivante. Le deuxième niveau de laboratoire de sécurité physique est effectué et la protection personnelle du troisième niveau de laboratoire de biosécurité est adoptée.

(4) Fonctionnement des matériaux inactivants.

Une fois que les matières infectieuses ou les virus vivants inactivés par une méthode fiable, les tests d'acide nucléique, les tests d'antigène, les tests sérologiques et l'analyse biochimique doivent être effectués dans un laboratoire secondaire de biosécurité. Le clonage moléculaire et d'autres opérations ne contenant pas de virus pathogènes vivants, peut être effectué dans un laboratoire de niveau de biosécurité 1.

Annexe

Formulaire d'inspection des nouveaux échantillons de test de coronavirus

Unité d'envoi d'échantillons (cachet):

Date de soumission de l'échantillon:

Expéditeur d'échantillons:

Numéro du spécimen	Type d'échantillon	Nom	Sexe	Âge	Date de morbidité	Date de visite médicale	Date d'échantillonnage	La source d'échantillon provient des cas d'infection de conglomération ou non	Date du test	RT-PCR fluorescente en temps réel		Homologie de la séquence des gènes *		Remarque
										Fluorescence en temps réel		Première génération	Séquençage profond	
										Fabricants de réactifs	Gène cible			

L'homologie de séquence de gène * n'est pas une option obligatoire, elle indique l'achèvement d'une séquence de gène cible spécifique / séquence de génome entier et son homologie avec un nouveau coronavirus.