**附件2**

**埃博拉出血热实验室检测方案（第三版）**

埃博拉出血热是一种严重的急性传染病，可发生人-人传播和院内感染,病死率高。直接接触传播是本病最主要的传播途径。可以通过接触病人或被感染动物的体液、分泌物、排泄物及其污染物等而感染。埃博拉出血热的早期临床表现和其他一些病毒性出血热相似，需要通过实验室进行确诊。在目前阶段，以对病人血液标本检测为主。为及时检测和确认埃博拉出血热病例，规范实验室检测程序，提高检测质量，为指导病例的管理和出院提供依据，特制定本方案。

1. **检测对象**

包括留观病例、疑似病例和确诊病例，病例定义参见国家卫生计生委制定的《埃博拉出血热相关病例诊断和处置路径》。

**二、标本采集、保存和运输**

（一）标本采集

用分离胶无菌真空促凝管采集静脉血，每管3mL，标记后4℃保存，填写标本采集登记表（附表1）。留观病例、疑似病例采集发病3日后静脉血2管，送具有埃博拉出血热检测资质的实验室进行埃博拉病毒检测；确诊病例采集恢复期血标本，送国家疾控中心病毒病所进行检测。

（二）标本保存、运送

未分离血清的全血标本应4℃保存，并尽快送具有埃博拉出血热检测资质的实验室分离血清、检测；血清标本长期保存应置于-70℃或以下冰箱， 1周内保存可置-20℃冰箱。

标本运输应按照相关生物安全规定，采取A类包装，低温冷藏运输，避免反复冻融（附件1）。

**三、检测内容**

 埃博拉病毒核酸检测、埃博拉病毒抗原检测和IgM、IgG抗体检测。

**四、实验室检测方法**

（一）病原学检测

1．核酸检测：是目前早期诊断、早期发现埃博拉出血热病例的主要检测方法。为提高检测的敏感性和特异性，用实时荧光PCR 方法针对埃博拉病毒2个不同的基因进行检测，在病例筛查时，任一基因检测阳性均可判为埃博拉病毒阳性；在确诊病例出院时，需针对2个基因的检测同时阴性，方可判定为阴性（附件2）。传统RT-PCR因易出现污染，较少使用，但可以获得病毒基因序列。发病后3天内，患者血标本中埃博拉病毒核酸检出率低，检测阴性不能排除埃博拉病毒感染，应结合病例的流行病学史和临床表现进行综合判断。发病后3～10天血标本病毒核酸检出率高。

2. 病毒抗原检测：用酶联免疫法检测埃博拉病毒抗原。病毒抗原检测阳性可确诊（附件3）。发病后3天内，血标本中埃博拉病毒抗原检出率低，检测阴性不能排除埃博拉病毒感染，发病后3～10天血标本病毒抗原检出率高。

（二）血清学检测

1. 血清特异性IgM抗体：采用捕获法ELISA方法检测。IgM抗体阳性可确诊（附件4）。

2.血清特异性IgG抗体：目前采用间接法ELISA检测IgG抗体。单份血清埃博拉病毒IgG抗体阳性提示曾感染埃博拉病毒，双份血清埃博拉病毒IgG抗体阳转或恢复期滴度较急性期4倍或者以上增高者可确诊（附件5）。

（三）结果的报告、复核和反馈

埃博拉病毒检测机构应将所有阳性和部分阴性血清标本送中国疾病预防控制中心病毒病所进行复核检测。实验室检测结果应及时反馈标本送检单位，并尽快上报上级主管部门（附表2）。

**五、生物安全**

按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》等相关规定要求，做好生物安全工作。

1. 实验室检测

1．凡涉及埃博拉病毒的分离、培养和动物实验，需在生物安全4级（BSL-4/ABSL-4）实验室内进行。涉及未经培养有感染性材料的实验活动，需在BSL-3实验室内进行。血清学检测应在BSL-3实验室内进行，且标本应首先60℃ 1小时灭活，再进行后续实验操作。核酸检测时,需在BSL-3实验室生物安全柜内将核酸提取裂解液加入标本中,充分裂解后，完成病毒RNA提取。对装有病毒RNA的样品管外表面进行彻底消毒后，可在BSL-3实验室以外进行扩增检测。

2．在进行感染性材料操作时，每次标本份数不宜过多，每份标本量不宜过大。

（二）生物安全防护

在实验室处理感染性标本时，应严格按照操作规范在BSL-3实验室内进行。实验室工作人员应穿着遮盖全身的个人防护装备，包括防渗漏防护服、N95或以上口罩、护目镜、防护面具、防护手套等，当需进行感染性标本离心、较大量标本（≥10 mL）分装处理等操作时应使用正压头盔。

实验人员有体表开放式伤口时不宜参加实验活动。

涉及感染性材料的离心应使用有密封盖的离心桶或转头进行标本离心，应在生物安全柜内打开离心转头放入或取出装有标本的离心管。

在标本的采集、包装和实验室检测等过程中所产生的医疗废物，可能具有生物危险性，应当按照《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》等相关规定及时处理。

实验室检测埃博拉病毒相关感染性标本的实验活动发生意外时，应及时启动相关应急预案（附件6）。

附件：

附件1. 埃博拉出血热相关标本采集、包装、运输技术指南

附件2．埃博拉病毒核酸检测方法

附件3．埃博拉病毒核蛋白抗原检测方法（双抗体夹心法ELISA）

附件4．埃博拉病毒IgM抗体检测方法（抗体捕捉法ELISA）

附件5．埃博拉病毒IgG抗体检测方法（间接法ELISA）

附件6. 埃博拉出血热相关标本实验活动意外应急预案

附表：

附表1．埃博拉出血热送检材料一览表

附表2．埃博拉出血热实验室检测结果一览表

**附件1**

**埃博拉出血热相关标本采集、包装、运输技术指南**

埃博拉出血热(Ebola hemorrhagic fever)是由埃博拉病毒(Ebola virus)引起的一种急性出血性传染病。人主要通过接触病人或感染动物的体液、分泌物和排泄物等而感染，临床表现主要为突起发热、出血和多脏器损害，病死率可高达50%-90%。本病潜伏期为2～21天，通常为8～10天。2014年，在几内亚、利比里亚和塞拉利昂等西非国家发生历史上最严重的埃博拉出血热暴发疫情。

为指导医疗机构和疾病预防控制机构工作人员对埃博拉出血热相关标本的采集、包装和运输工作，保证生物安全，特制定本指南。

**一、生物安全防护**

1、所有样本的采集或处理应遵守《医院感染管理规范》和《病原微生物实验室生物安全管理条例》等相关生物安全规定，在标准预防的基础上采用飞沫和接触隔离的预防措施。

2、采集样本时，应严格按照BSL-3级实验室规定做好个人防护。应穿戴医用防护服、可遮盖口鼻的医用防护口罩(N95)、戴双层防护手套、护目镜、防护面具、鞋套或橡胶靴等。

**二、标本采集**

（一）采集时间

一般发病后2周内，可在患者血标本中检测到病毒核酸和抗原，发病后3～10天的标本核酸和抗原的检出率高。在发病后数月内，可在特定分泌物中持续检出病毒。最早可从发病后2天的患者血清中检出特异性IgM抗体，IgM抗体可维持数月。发病后7-10天可检出IgG抗体，康复者IgG抗体可维持数年。发病10-14天以后的标本病毒特异性抗体的检出率高。因此，应根据不同检测目的确定采样时间，留观病例、疑似病例诊断埃博拉病毒感染应采集发病3天以后的血标本。

（二）标本采集

1. 采血场所除了病人常规护理的材料外，应备有手套、防护服和防护面具等，同时备有洗手的设施和装有消毒液的桶。

2.采集埃博拉出血热患者血样会给医护人员带来风险，应由经过生物安全防护培训的人员执行，采血时应2人在场。

3.采用分离胶无菌真空促凝管采集静脉血，每管3mL，采集后用封口膜封闭管口，标记清楚后放入自封袋或50mL离心管内，并在自封袋或离心管外表面再清楚标记，4℃保存，填写标本采集登记表。

4、留观病例和疑似病例应在发病3天后，采集静脉血2管，送指定的具有埃博拉出血热检测资质的实验室进行埃博拉病毒检测。

5、确诊病例采集恢复期血标本，包括并不限于出院前标本2份，每份2管，采集时间间隔不少于48小时，送国家疾控中心病毒病所进行埃博拉病毒检测，用于指导病例管理。

**四、标本包装、运输**

（一）所有疑似埃博拉病毒相关感染性标本的运输应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》和《人间传染的病原微生物名录》等相关规定，采取A类包装，符合UN2814要求。按照三重包装系统包装：第一层包装为自封袋或50mL离心管；第二层包装为防水、防漏的安全壳容器；第三层为运输包装组成。样本应用吸水纸等包裹，固定在防漏自封袋或离心管内。然后放置在坚固、防水、防漏的第二层安全壳容器中，用吸水纸等填充物将内有标本的自封袋或离心管固定好，然后装入第三层包装。安全壳容器和外包装须与IATA危险物品条例包装制度650相符合。

（二）填写标本说明两份，写明标本的详细情况、运送者及接收者地址，将标本说明密封在塑料袋里，用胶布分别粘在外层包装的里面和外面并留档以便追踪，方便实验室操作人员查对标本数量。

（三）样本运输之前，应按相关生物安全规定和样本接收单位生物安全管理部门联系，办理相关手续，运送日期确定后立即将运送的时间和运输方式通知接收单位。

**五、样本保存和销毁**

（一）埃博拉病毒阳性血标本，应根据《病原微生物实验室生物安全管理条例》等相关生物安全规定保存，实行“双人双锁”和取样“审批”管理。

（二）埃博拉病毒阴性血标本，应在排除埃博拉病毒感染后，转入其他血清库保存或销毁。

（三）所有感染性血清销毁时，均应在在生物安全柜内待其自然融化，60℃ 1小时灭活后，在生物安全柜内，打开样本管，置于有效消毒剂内浸泡，然后高压灭活。

（四）所有销毁样本均应在相应数据库清单内标明，并记录销毁的时间和操作人，阴性样本销毁记录应保存1年以上，阳性样本的销毁记录应保存5年以上。

**附件2**

**埃博拉病毒核酸检测方法**

**1目的**

埃博拉病毒核酸的提取及PCR检测。

**2 适用范围**

适用于检测血标本中埃博拉病毒核酸。

**3 实验前准备**

核对被检样品，包括患者的姓名、编号及检测项目等。

**4检测仪器设备和材料**

实时定量核酸扩增检测仪，常规核酸扩增检测仪，RNA提取试剂盒，一步法RT-PCR扩增试剂盒，一步法实时定量RT-PCR扩增试剂盒等。

**5实验步骤**

5.1实验准备

5.1.1提取埃博拉病毒RNA要求在BSL-3级实验室内操作。

5.1.2进入实验场所之前，要事先准备好所需试剂、样品。预约实验场所。

5.2 RNA的提取

使用QIAamp Viral RNA Mini试剂盒提取血清标本中病毒RNA（使用其他试剂盒或方法提取病毒RNA的应参照相应试剂盒说明书或实验室操作手册）。

5.2.1吸取560μl包含载体RNA的AVL缓冲液(核酸提取裂解液)至1.5ml的离心管中。

5.2.2向上述的液体中加入140μl样品，盖好盖后，轻轻的上下颠倒混匀10次，室温孵育10分钟，简单离心使离心管顶端液体落到底部。

5.2.3在样品中加入560μl 96～100％的乙醇，轻轻的上下颠倒混匀10次，再简单离心。

5.2.4小心将630μl液体加入QIAamp小柱中，盖好盖， 8000rpm/min离心1min,弃去收集管，将柱子置于一新的2ml收集管上。

5.2.5打开QIAamp小柱的盖子，重复步骤5.2.4，直至完成全部样品离心。

5.2.6打开盖子，向柱中加入500μl AW1 缓冲液，盖好盖， 8000rpm/min离心1min，弃去收集管，将柱子置于一新的2ml收集管上。

5.2.7打开盖子，加入500μl AW2 缓冲液，盖好盖，14000rpm/min离心3min。

5.2.8将柱子置于一新的2ml收集管上，空离1min。

5.2.9将柱子置于一新的1.5ml离心管上，加入50μl AVE洗脱缓冲液，室温孵育1min,离心8000rpm/min 1min。离心液即为病毒RNA，立即检测或-70℃以下保存。

**5.3实时荧光定量RT-PCR法检测埃博拉病毒核酸**

为增加埃博拉病毒核酸检测的敏感性和特异性，在用实时荧光定量 PCR 方法对标本进行检测时，应采用针对埃博拉病毒2个不同的基因同时进行检测，可采用并行的单重PCR或多重PCR方法进行检测。

5.3.1单重PCR参考引物与探针

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物/探针 | 序列 | 荧光标记 |
| 检测埃博拉病毒核蛋白的引物和探针 |
| ZEBONP-F | CGCCGAGTCTCACTGAATCTG |  |
| ZEBONP-R | AGTTGGCAAATTTCTTCAAGATTGT |  |
| ZEBONP-P | CGGCAAAGAGTCATCCCAGTGTATCAAGTA |  FAM/BHQ-1 |
| 检测埃博拉病毒糖蛋白的引物和探针 |
| ZEBOGP-F | TGGGCTGAAAAYTGCTACAATC  |  |
| ZEBOGP-R | CTTTGTGMACATASCGGCAC  |  |
| ZEBOGP-P | CTACCAGCAGCGCCAGACGG | FAM/BHQ-1 |

5.3.2 实时荧光定量RT-PCR扩增

实时荧光定量RT-PCR扩增反应配置体系：

RNA模板5µl，酶（25x）1µl，缓冲液12.5µl，引物（10µM）各1µl，探针（10µM）0.5µl，加水至总体积25µl。

推荐反应条件为50℃30min，95℃10min，95℃15s、60℃45s反应40个循环。

5.3.3 结果判断

以定量荧光PCR反应的前3～15个循环的荧光信号作为本底信号，以本底信号标准差的10倍作为荧光阈值，标本扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值（Ct值），以Ct<35荧光信号数据线性化处理后对应循环数生成的曲线图成“S”形的标本，可判断为相应的埃博拉病毒核酸检测阳性。

5.3.4 意义

荧光定量PCR是一种灵敏、特异、低污染的病毒核酸检测方法，可以检测标本中的埃博拉病毒。病例筛查时2个检测基因中，任一基因检测阳性均具有确诊意义。首例病例确诊应按照国卫发明电[2014]48号《埃博拉出血热病例诊断程序》进行。在病例管理时，需2个基因同时检测阴性，方可判定为阴性。

**5.4一步法常规RT-PCR方法检测埃博拉病毒核酸**

如果采用常规RT-PCR的方法检测埃博拉病毒核酸，建议针对病毒基因组2个不同的基因片段同时进行检测,并完成基因序列分析。

5.4.1 参考引物序列

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **引物** | **序列** | **片段大小** |
|  检测埃博拉病毒糖蛋白的引物 |
| ZEBOV-GPF  | TGGGCTGAAAACTGCTACAATC |  |
| ZEBOV-GPR | TTTTAGTTTCCCAGAAGGCCCA | 570bp |
| 检测埃博拉病毒RNA聚合酶的引物 |
| ZEBOV-LF1 | ATCGGAATTTTTCTTTCTCATT  |  |
| ZEBOV-LR1 | ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG  | 414bp |
| ZEBOV-LF2 | GTCAAAGCATTTCCTAGCAACATGATGG  |  |
| ZEBOV-LR2 | ATAATAATCACTCACATGCATATAACA | 282bp |

5.4.2 PCR扩增

采用参考引物对埃博拉病毒不同检测靶标进行PCR扩增。首先根据所采用的试剂盒说明书推荐反应条件，将病毒RNA逆转录为cDNA。PCR扩增参考反应条件为94℃预变性2min，然后 94℃变性30s，55℃退火30s， 72℃延伸1min，反应40个循环，最后72℃延伸10min。如为套式PCR则开展第二轮扩增。

第二轮分型PCR扩增体系配置采用正向引物ZEBOV-LF2与反向引物ZEBOV-LR2。推荐反应条件为 94℃预变性2min，然后 94℃变性30s，55℃退火30s， 72℃延伸1min，反应30个循环，最后72℃延伸10min。

5.4.3 1.5%浓度琼脂糖电泳分析。

5.4.4 结果判读

a阳性：电泳显示相应大小DNA片段。

b阴性：无特异性核酸片段扩增。

5.4.5 意义

阳性结果可以初步判断埃博拉病毒感染,排除交叉污染。获得病毒特异性基因序列具有确诊意义。

**6清场与消毒**

6.1 操作结束后，及时清理生物安全柜内的物品，用0.5%次氯酸钠溶液和75%乙醇擦试外表面后，移出生物安全柜放入冰箱中。

6.2 未使用完的感染性生物材料销毁或放入BSL-3级实验室－70℃冰箱，并如实填写操作和处理记录。

6.3 实验区内的污染材料高压处理（121℃高压20min）后，再进行集中高压处理。

**附件3**

**埃博拉病毒核蛋白抗原检测方法（双抗体夹心法ELISA）**

**1 目的**

双抗体夹心法ELISA检测血清中埃博拉病毒核蛋白抗原。

**2 适用范围**

适用于人血清中埃博拉病毒核蛋白抗原的检测。

**3 实验前准备**

3.1 核对被检样品，包括患者的姓名、编号及检测项目等。

3.2检测前将60℃ 1小时灭活的待测样品置于BSL-3实验室生物安全柜内。

3.3在洗扳机废液收集桶内加入10%有效氯的消毒剂，加入量为废液桶总体积的5% 。

**4 检测项目**

本方法检测项目为检测血清中埃博拉病毒核蛋白抗原。

**5 检测仪器设备和材料**

加样器、温箱、洗板机、含波长450nm的酶标仪、埃博拉病毒抗原检测试剂盒（双抗体夹心法ELISA）。

**6操作步骤（具体请参照试剂盒说明书开展）**

6.1 将试剂盒在冰箱中取出，放置室温平衡30分钟，使用前将试剂轻轻震荡混匀。

6.2 配液：将新鲜配制的注入洗板机的洗液桶内。

6.3 编号：将样品对应微孔板编号，每板设阴性对照3孔，模拟阳性对照2孔和空白对照1孔。

6.4 加稀释液：每孔加稀释液20µL，空白孔除外。

6.5 加样：分别在相应孔加入待测样品或阴阳性对照各100µL，空白孔除外。

6.6 温育：用封板膜封板后，置37℃温育60分钟。

6.7 加酶：每孔加酶标试剂50µL，空白孔除外，轻轻震荡混匀。

6.8 温育：用封板膜封板后，置37℃温育30分钟。

6.9 洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤5遍。

6.10显色：每孔加入显色剂A、B液各50µL，轻轻震荡混匀，37℃避光显色30分钟。

6.11测定：每孔加终止液50µL，10分钟内测定结果。设定酶标仪波长于450nm处（建议使用双波长450nm/600-650nm检测），用空白孔调零后测定各孔A值。

6.12清洗、消毒洗扳机：按洗扳机内置程序分别采用蒸馏水、20%乙醇和75%乙醇进行清洗消毒，30分钟后，再用蒸馏水清洗。

**7结果判定**

7.1 临界值计算：临界值=0.10+阴性对照孔A值均值（阴性对照孔A值低于0.05者以0.05计算）。

7.2 阴性对照的正常值范围：阴性对照孔A≤0.1。

7.3 阳性对照的正常值范围：A≥0.50。

7.4阳性判定：样品A值≥临界值者为埃博拉病毒抗原阳性。

7.5阴性判定：样品A值＜临界值者为埃博拉病毒抗原阴性。

**8意义**

阳性结果可以判断为埃博拉病毒感染，但阴性结果并不排除埃博拉病毒感染的可能，应结合病例的流行病学史和临床表现进行综合判断。

**9 清场与消毒**

9.1 操作结束后，及时清理生物安全柜内的物品，用0.5%次氯酸钠溶液和75%乙醇擦试外表面后，移出生物安全柜放入冰箱中。

9.2 将未使用完的感染性生物材料销毁或放入BSL-3级实验室－70℃冰箱，并如实填写操作和处理记录。

9.3 将实验区内的污染材料高压处理（121℃高压20min）后，再进行集中高压处理。

**附件4**

**埃博拉病毒IgM抗体检测（抗体捕捉法ELISA）**

**1 目的**

检测埃博拉病毒特异性IgM抗体。

**2 适用范围**

适用于人血清中埃博拉病毒特异性IgM抗体的检测。

**3 样品接收和准备**

3.1核对被检样品，包括患者的姓名、编号及检测项目等。

3.2检测前应将60℃ 1小时热灭活的待测样品置于BSL-3实验室生物安全柜内。

3.3在洗扳机废液收集桶内加入10%有效氯的消毒剂，加入量为废液桶总体积的5% 。

**4 检测项目**

本方法检测项目为检测血清中病毒特异性IgM抗体。

**5 检测仪器设备和材料**

加样器、温箱、洗板机、含波长450nm的酶标仪、埃博拉病毒IgM抗体检测试剂盒等。

**6检测步骤（具体请参照试剂盒说明书开展）：**

6.1 将试剂盒在冰箱中取出，放置室温平衡30分钟，使用前将试剂轻轻震荡混匀。

6.2 配液：将新鲜配制的注入洗板机的洗液桶内。

6.3加稀释液：每孔加入样品稀释液100μl，空白及阴阳性对照孔除外。

6.4加样：在相应孔中加入待测样品10µl，轻轻振荡混匀。阴、阳性对照加100µl。

6.5温育：用封板膜封板后，置37℃温育30分钟。

6.6洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤5遍。

6.7加酶：每孔加入酶标试剂100μl，空白孔除外。

6.8温育：操作同6.5。

6.9洗板：操作同6.6。

6.10显色：每孔加入显色剂A、B液各50µl，轻轻振荡混匀，37℃避光显色15分钟。

6.11测定：每孔加终止液50µl，轻轻振荡混匀，10分钟内测定结果。设定酶标仪波长于450nm处，用空白孔调零点后测定各孔A值。

6.12清洗、消毒洗扳机：按洗扳机内置程序分别采用蒸馏水、20%乙醇和75%乙醇进行清洗消毒，30分钟后，在用蒸馏水清洗。

**7结果判定**

7.1 临界值计算：临界值=0.10+阴性对照孔A值均值（阴性对照孔A值低于0.05者以0.05计算）。

7.2 阴性对照的正常值范围：阴性对照孔A≤0.1。

7.3 阳性对照的正常值范围：A≥0.50。

7.4阳性判定：样品A值≥临界值者为埃博拉病毒IgM抗体阳性。

7.5阴性判定：样品A值＜临界值者为埃博拉病毒IgM抗体阴性。

**8意义**

阳性结果可以判断为埃博拉病毒感染，但阴性结果并不排除埃博拉病毒感染的可能，应结合病例的流行病学史和临床表现进行综合判断。

**9 清场与消毒**

9.1 操作结束后，及时清理生物安全柜内的物品，用0.5%次氯酸钠溶液和75%乙醇擦试外表面后，移出生物安全柜放入冰箱中。

9.2 未使用完的感染性生物材料销毁或放入BSL-3级实验室－70℃或以下冰箱，并如实填写操作和处理记录。

9.3 将实验区内的污染材料高压处理（121℃高压20min）后，再集中高压处理。

**附件5**

**埃博拉病毒IgG抗体检测方法（间接法ELISA）**

**1 目的**

检测埃博拉病毒特异性IgG抗体。

**2 适用范围**

适用于人血清中埃博拉病毒特异性IgG抗体的检测。

**3 实验前准备**

3.1核对被检样品，包括患者的姓名、编号及检测项目等。

3.2检测前应将60℃ 1小时热灭活的待测样品置于BSL-3实验室生物安全柜内。

3.3在洗扳机废液收集桶内加入10%有效氯的消毒剂，加入量为废液桶总体积的5% 。

**4 检测项目**

本方法检测项目为检测血清中埃博拉病毒特异性IgG抗体。

**5 检测仪器设备和材料**

加样器、温箱、洗板机、含波长450nm的酶标仪、埃博拉病毒IgG抗体检测试剂盒等。

**6 检测步骤（具体请参照试剂盒说明书开展）**

6.1 将试剂盒在冰箱中取出，放置室温平衡30分钟，使用前将试剂轻轻震荡混匀。

6.2 配液：将新鲜配制的注入洗板机的洗液桶内。

6.3加稀释液：每孔加入样品稀释液100μl，空白孔除外。

6.4加样：在相应孔中加入待测样品或阴、阳性对照10µl，轻轻振荡混匀。

6.5温育：用封板膜封板后，置37℃温育30分钟。

6.6洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤5遍。

6.7加酶：每孔加入酶标试剂100μl，空白孔除外。

6.8温育：操作同6.5。

6.9洗板：操作同6.6。

6.10显色：每孔加入显色剂A、B液各50µl，轻轻振荡混匀，37℃避光显色15分钟。

6.11测定：每孔加终止液50µl，轻轻振荡混匀，10分钟内测定结果。设定酶标仪波长于450nm处，用空白孔调零点后测定各孔A值。

6.12清洗、消毒洗扳机：按洗扳机内置程序分别采用蒸馏水、20%乙醇和75%乙醇进行清洗消毒，30分钟后，在用蒸馏水清洗。

7结果判定

7.1 临界值计算：临界值=0.10+阴性对照孔A值均值（阴性对照孔A值低于0.05者以0.05计算）。

7.2 阴性对照的正常值范围：阴性对照孔A≤0.1。

7.3 阳性对照的正常值范围：A≥0.50。

7.4阳性判定：样品A值≥临界值者为埃博拉病毒IgG抗体阳性。

7.5阴性判定：样品A值＜临界值者为埃博拉病毒IgG抗体阴性。

**8意义**

阳性结果，表明曾受到埃博拉病毒感染；双份标本检测，恢复期血清抗体阳转，或抗体滴度比急性期抗体滴度有4倍及以上升高可判定埃博拉病毒感染。

**9 清场与消毒**

9.1 操作结束后，及时清理生物安全柜内的物品，用0.5%次氯酸钠溶液和75%乙醇擦试外表面后，移出生物安全柜放入冰箱中。

9.2 未使用完的感染性生物材料销毁或放入BSL-3级实验室－70℃及以下冰箱，并如实填写操作和处理记录。

9.3 将实验区内的污染材料高压处理（121℃高压20min）后，再集中高压处理。

**附件6**

**埃博拉出血热相关标本实验活动意外应急预案**

**1 总则**

1.1目的

为有效预防、及时发现和控制发生在实验室范围内的埃博拉病毒相关实验活动意外，最大限度的减轻意外事件对实验室人员和环境造成的危害，指导和规范生物安全工作，保障实验室工作人员身体健康和环境安全，保障埃博拉病毒实验室相关检测活动的顺利进行，特制定本预案。

本预案为发生实验室意外时的一般处置办法，各单位可根据各自生物危害评估方案确定处置措施。

1.2编制依据

《中华人民共和国传染病防治法》。

《突发公共卫生事件应急条例》。

《实验室生物安全手册》（第三版）。

1.3原则

以“安全第一、预防为主”为应急处置原则。

* 1. 适用范围

发生以下紧急情况时启动本预案

1.4.1埃博拉病毒的实验室污染事件。

1.4.2工作人员发生埃博拉病毒实验室暴露。

1.4.3埃博拉病毒被泄露出实验室。

1.4.4由于停电、火灾等不可预测因素所引起的实验室其他污染事件。

**2 应急组织体系及职责**

2.1 应急指挥机构

在本单位生物安全委员会或相应部门的统一领导下，各行政职能部门配合下，生物安全管理部门负责组织、协调实验室意外突发事件的应急处理工作，并制定应对意外事故的应急预案。

2.2实验室管理部门

单位实验室管理部门应制定本部门的应对意外事故处理的应急预案，并开展生物安全培训，组织实验室相关人员进行实地演练。

2.3实验室负责人

实验室负责人应对急救用品进行检查和补充，组织实验室内部人员进行生物安全培训与考核。

**3预防和预警机制**

**3.1预防**

3.1.1加强实验室生物安全规范化操作管理，按《实验室生物安全通用要求（GB19489-2008)》做出明确规定。

3.1.2建立实验室应急物资和设备的储备，配置个人防护、消毒药品和医疗救援药品，定点存放和定人定期维护保养。

3.1.3埃博拉病毒相关感染性材料需登记使用，提高警惕，加强安全保卫，防止埃博拉病毒相关感染材料失窃。

3.1.4建立实验室工作人员健康档案，定期体检。发现与实验室生物安全有关的人员感染或伤害应立即报告。

3.1.5加强对实验操作人员的生物安全业务培训和演练。

**3.2预警**

3.2.1建立有效的预警机制，为埃博拉病毒相关感染性材料建立档案和使用记录，发现失窃，立即报告（见处理程序）。

3.2.2完善实验室人员健康档案，发现与实验室生物安全有关的人员感染或伤害立即报告。

3.2.3定期开展自查，及时发现各类安全隐患，发出预警通报。

**4.突发事件的报告及应急响应**

**4.1报告人**

4.1.1实验室工作人员为法定报告人。

4.1.2除实验室工作人员外，任何单位和个人如发现有实验室感染事故均可报告。

4.1.3任何单位和个人不得隐瞒、缓报、谎报、或者授意他人隐瞒、缓报、谎报。

**4.2报告程序和方式**

4.2.1报告程序：发生实验室意外事故时，在妥善处理的同时，向实验室负责人口头报告，实验室负责人应立即向单位生物安全管理部门和负责人报告，并如实填写事故记录和事故处理记录。单位生物安全管理部门核实事故后2小时内向上级卫生主管部门进行汇报，对事故做出危险程度评估，对可能暴露人员进行评估和随访。积极配合有关专业技术部门的调查和处置。事故处理后，生物安全管理部门应及时对事故的经过以及事故的原因和责任进行实事求是的分析，找出事故的根源，总结教训写出书面总结，吸取经验教训。

4.2.2报告方式 发生实验室意外事故后，实验室所在单位负责人应填报《实验室意外和事故登记表》，并以最快的通讯方式2小时内向上级卫生行政部门报告。

4.3突发事件应急响应。

4.3.1立即停止发生意外事故实验室的实验活动，妥善处理后退出实验室。

4.3.2立即组织专家进入实验室进行调查、评估。

4.3.3对可能的污染情况进行评估。

4.3.4如发生实验室感染事故，立即将被感染人员送定点医院进行医疗观察或预防性治疗，对可能受到感染的人员进行评估和随访；暂停该实验室所有实验活动，开展调查评估，对所有实验室人员进行生物安全培训，完善生物安全体系文件，待潜在危险排除后，方可重启实验活动。

**5应急处理程序**

**5.1由于人员活动造成的意外事故处理方法**

BSL-3实验室意外事故发生后，应立即报告监控室，由监控室通知生物安全员，安全员对事件初步评估判断后，立即报告实验室主任，实验室主任了解情况后报告单位生物安全委员会或相应部门，如需要，打电话120请求急救，送定点医院处理。

**5.1.1感染性锐器意外刺伤或擦伤**

a.发生具有潜在感染性的锐器刺伤、切割伤或擦伤等情况，被视为有极大危险。

b.实验人员立即停止工作，同行操作者及时向监控室报告。监控人员接报后，应立即报告实验室主任和单位负责人，实验室主任评估后，决定是否呼叫120请求急救或采取其他便捷方式，送定点医院处理，并做好相应准备。

c.受伤实验人员脱掉最外层手套，在同操作者的配合下用生理盐水冲洗伤口。

d.使用大量流水尽可能冲掉损伤部位的血液，从急救箱取出急救药品再行包扎。

e.伤口进行适当的包扎后，在同行操作者的配合下，按照《生物安全三级实验室安全手册》的程序退出实验室。

f.由 120急救车或其他安全便捷交通方式，送定点医院急救室，告知医生所受伤的原因及可能污染埃博拉病毒，根据情况进行医学处理，并留院观察。

g.住院后，和同行的另一名操作者一起，记录受伤原因、可能接触的病原微生物，并保留完整的医疗记录。

**5.2在实验室内操作人员突然晕倒的急救**

5.2.1另一名操作人员立即停止工作。

5.2.2向监控室报告，请求人员进入第二缓冲间做好准备工作，外部人员做好救助准备。

5.2.3同行操作人员更换一副新手套，将晕倒的人员扶到坐的姿势，让晕倒的人员的背和头靠在救护者的胸前，救护者的双手和胳膊架在晕倒的人的腋下，在保证无障碍的情况下，将晕倒的人拖到第二缓冲间，脱掉防护眼罩、口罩，尽可能脱掉防护服（包括晕倒的人和自己的防护服）。外边进入人员帮助将晕倒的人搬出实验室。

**5.3感染性样品外溢到皮肤粘膜**

5.3.1如感染性材料外溢到皮肤，视为很大危险，应立即停止工作，在另一操作者的配合下对受溢洒的皮肤，采用75%的酒精进行消毒处理，然后用大量清水或肥皂水彻底冲洗。

5.3.2处理后安全撤离，密切观察3周。

5.3.3填写意外事故报告，并报相关负责人。

**5.4感染性物质溅入眼睛：**

5.4.1眼睛溅入感染性液体，在另一操作者的配合下，用洗眼器进行冲洗，然后用生理盐水或清水冲洗，连续冲洗（注意动作不要过猛，以免损伤眼睛）。

5.4.2在另一操作者的配合下，按照《生物安全三级实验室安全手册》路线退出实验室。

5.4.3拨打120讲明情况，送定点医院留院观察。

5.4.4填写意外事故报告，并报相关负责人。

**5.5衣物污染**

5.5.1当感染性材料溅洒在防护服时，应停止实验活动，由另一操作人员立即对污染人员衣物及所处区域喷洒消毒液，30分钟后，按照BSL-3实验室退出程序，两人同时退出实验室核心区。

5.5.2在缓冲间内被污染人员脱掉防护服，防止感染性材料触及皮肤及进一步扩散。

5.5.3撤离实验室，设立警示标记。

5.5.4如果皮肤接触污染物，立即用自来水冲洗、75%酒精擦拭、冲洗消毒。

5.5.5彻底淋浴，出防护区。

5.5.6 由其他操作人员，穿好个人防护装备，进入试验区，处理污染区域，将已污染的防护服装入垃圾袋中进行高压灭菌处理。

5.5.7用含氯消毒剂消毒发生污染的区域，具体方法见本章节5.7，用含过氧乙酸或过氧化氢的消毒剂进行空间喷洒消毒。

5.5.8相关实验人员应密切观察3周；如果皮肤接触到感染性物质，按照5.3处理。

**5.6外层手套撕破、损坏、被污染或需要更换**

5.6.1在操作埃博拉病毒相关感染性材料时应该佩戴双层手套。在操作过程中，外层手套被污染时应立即用含1%有效氯的次氯酸钠纸巾擦拭手套并脱下后丢弃在生物安全柜中的高压灭菌袋中，并立即戴上新手套继续实验。

5.6.2手套的更换：在生物安全实验室中使用一次性手套，不可再次使用。手套用后进行高压灭菌消毒然后丢弃。工作人员在完成感染性材料实验离开生物安全柜之前应该脱去外层手套放入生物安全柜内的高压灭菌袋中。然后更换新手套，以避免污染其他物品。

5.6.3脱手套的过程：用一手捏起另一近手腕部处的手套外缘；将手套从手上脱下并将手套外表面翻转入内；用戴着手套的手拿住该手套；用脱去手套的手指插入另一手套腕部处内面；脱下该手套使其内面向外并形成一个由两个手套组成的袋状；丢弃在高温消毒袋中并进行消毒处理。

5.6.4 脱下外层手套，丢弃在高压灭菌袋中。

【注意】以上操作要远离面部。

**5.7感染性材料外溢在台面、地面和其它表面**

5.7.1用纱布或纸巾覆盖污染的场地并吸收溢出物。

5.7.2向纱布上倾倒适当的消毒剂，并立即覆盖周围区域。

5.7.3使用含1%有效氯的次氯酸钠消毒剂时，从溢出区域的外围开始，向中心进行处理。

5.7.4作用30分钟后，将所处理物质清理掉。

5.7.5如果含有锐器，则要使用镊子收集处理过的物品，并将它们置于可防刺透的容器中以待处理。

5.7.6对溢出区域再次清洁并消毒。如有必要，重复第5.7.2～5.7.5步。

5.7.7将污染材料置于防漏、防穿透的废弃物处理容器中。

5.7.8在消毒后，通知实验室负责人，目前溢出区域的清除污染工作已完成。

**5.8危害气溶胶的释放**

5.8.1较大量感染性物质的溅洒、跌落、离心管破裂、超声、匀浆等会产生气溶胶。

5.8.2使用纱布或纸巾覆盖污染的场地并吸收溢出物，喷洒含1%有效氯的次氯酸钠消毒液，并对防护服表面喷洒消毒剂，用含过氧乙酸或过氧化氢的消毒剂进行空间喷洒消毒后，按照BSL-3实验室退场程序退出，贴出危险标识以示禁止入内。

5.8.3 30分钟后由另外人员穿防护服、正压头盔进场处理污染物，将含1%有效氯的次氯酸钠消毒液的布和纸巾及打碎的器皿用镊子夹取玻璃碎片，放入锐器盒内进行高压处理。

5.8.4如果实验表格或其它打印文字材料或手写材料被污染，应把这些材料内容抄到另一表格上，并把原件放到盛有1%有效氯的次氯酸钠消毒液的容器内。

5.8.5在生物安全员的监督下进行空间消毒净化。

5.8.6 暴露人员应进行医学观察。

**6由于实验室设备、火灾或自然灾害造成的意外事故处理方法**

参照《生物安全三级实验室安全手册》规定进行。

**7调查总结**

突发事故发生后要对事故原因进行详细调查，做出书面总结，认真吸取教训，做好防范工作。事故当事人应向实验室生物安全领导小组及相关行政职能部门写详细的事件发生经过的书面报告。实验室负责任人应向实验室生物安全领导小组、相关行政职能部门做结案报告。结案报告包括事件的基本情况、事件产生的原因、应急处置过程中各阶段采取的主要措施及其功效、处置过程中存在的问题及整改情况，并提出今后对类似事件的防范和处置建议。

**8 实验室应具备的急物资**

8.1急救箱，包括常用医用酒精，酒精棉，创可贴（大、小），棉签，胶布，纱布，止血钳；

8.2泡沫式灭火器；

8.3应急处理箱，包括：

8.3.1个人防护材料：能覆盖全身的防渗漏防护服、乳胶手套、N95口罩、防雾护目镜和正压头盔等；

8.3.2处理工具：扫帚、镊子、剪刀、洗眼瓶、记事纸笔、手电、警示牌；

8.3.3医用用品：消毒液、医用胶布、纱布、创可贴；

8.3.4废弃物处理：废物盒、废物袋、锐器盒、吸附棉、擦拭纸。

**9 预案管理与更新**

预案要定期评审，并根据各项重大突发事件的形势变化和实施中发现的问题及时进行修订。

**10 预案实施时间**

本预案自印发之日起实施。

附表1

**埃博拉出血热相关样品送检表**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 姓名 | 性别 | 年龄 | 国籍 | 住址 | 所住医院 | 旅行史1/接触史2 | 诊断类型 | 发病日期 | 采样日期 | 样本种类 | 备注 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

注：1旅行史：21天内到过的疫区国家名称；2接触史：21天内疑似、确诊埃博拉病例接触史（填写有或无，如有接触史，请提供具体信息）；3诊断类型：留观、疑似或确诊病例。

送检单位：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

送检人： \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 送检日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

接收单位：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

接收人：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

附表2

**埃博拉出血热实验室检测结果一览表**

检测单位名称：

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标本编号 | 标本类型 | 采集日期 | 采集人 | 检测结果 | 接收日期 | 检测日期 | 检测人 |
| 核酸检测 | 抗原检测 | IgM | IgG |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

注：对于核酸检测中的序列测定，报送结果中应包括原始测序彩图文件和序列文件的电子版拷贝。

填表时间：\_\_\_\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日单位（盖章）：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_；填表人：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_