DOI:10.16016/j.1000-5404.201501146

特别报道

埃博拉病毒病实验室检测方案的规划与实践

黄 庆[1],张宏雁[1],毛 青[1],枉 前[2],游建平[1] (中国人民解放军首批援利医疗队;400038 重庆,第三军医大学西南医院[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院[2])

[摘要] 埃博拉病毒的实时反转录PCR检测结果是目前确诊埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)的金标准。EVD患者的血液、多种体液和分泌物具有高度传染性,因此,EVD待检者(包括:EVD疑似病例、EVD可能病例和EVD确诊病例)临床样本的采集、转运、检测和结果解读等每一个环节的安全防控均十分重要。本研究就作者在中国埃博拉治疗中心(Ebola Treatment Center, ETC)的工作实践与经验,探讨了EVD病原体实验室检测相关的诊断标准、操作流程、安全防护等方面的问题,为制定EVD实验室检测的标准或指南提供参考。

[关键词] 埃博拉病毒;埃博拉病毒病;实验室检测
[中图法分类号] R373.9; R446.5 [文献标志码] A

Program planning and practice of laboratory examination for Ebola virus disease

Huang Qing[1], Zhang Hongyan[1], Mao Qing[1], Wang Qian[2], You Jianping[1] (Medical Contingent of the Chinese PLA to Liberia; [1]Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Qualitative real-time reverse-transcription PCR (RT-PCR) targeting Ebola virus RNA is considered as the golden standard of laboratory diagnosis for Ebola virus disease (EVD). Since the blood samples, various body fluids and secretions of EVD patients are of highly contagiousness, it is very important to implement security control during the procedures of collection, transportation and detection of specimens, and interpretation of test results for the patients for virus detection, including those suspected, possible, and confirmed. Based on our working experience and practice in the China Ebola Treatment Center, we brought forward our points of views on the detailed diagnostic standards, operating processes, security and protection protocols and other aspects for laboratory examination of the pathogen. We hope our current views would be helpful for the establishment of standards or guidelines for laboratory examination of Ebola virus and clinical diagnosis of EVD.

[**Key words**] Ebola virus; Ebola virus disease; laboratory test

Corresponding author: Huang Qing, Tel: 86-23-65460802, E-mail: Dr. Q. Huang@gmail.com

埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)是埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)感染引起的急性烈性传染病。EBOV为RNA病毒,核酸水平采用实时反转录PCR(real-time reverse transcription PCR, Real-time RT-PCR)检测其RNA是目前诊断EVD的公认方法,也是利比里亚首都蒙罗维亚地区所有EVD病原体检测中心唯一开展的EBOV检测项目。WHO、美国疾病控制与预防中心(centers for disease control and prevention,

[通信作者] 黄 庆,电话:(023)65460802, E-mail: Dr. Q. Huang@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150126.1924.004.html(2015-01-26)

CDC)所颁布 EVD 实验室检测指南,明确指出 EBOV 的实时 RT-PCR 检测是所有 EVD 待检者必须检测的项目,在利比里亚首都蒙罗维亚地区,其检测结果是目前排除或确诊 EVD 的唯一实验室依据[1-3]。

EVD 感染的发生源于直接接触 EVD 患者的血液、多种体液或分泌物、排泄物(粪便、尿液、唾液和精液),或者直接接触 EVD 患者的感染性物质(如脏衣物、床单或用过的针头)污染的环境,并主要通过破损皮肤或黏膜传播 EBOV[2-3]。EVD 病原体检测所需样本主要是血液和唾液,均属于 EBOV 高传染性样本。因此,如何做好样本采集、转运和检测过程中的生物安全防护,确保卫生工作者的安全,是 EVD 病原体实验室检测的重要环节。目前,尽管 WHO 和美国 CDC 等对 EVD 病原体的检测和相关防护提供了操作指南草案,但对于如何实施却并未提供具体的方案[1-3]。本文就中国埃博拉治疗中心(Ebola Treatment Center, ETC)在 EVD 待检者(persons under investigation, PUI;包括 EVD 疑似病例、可能病例、确认病例)的样本采集、转运、检测和结果解读等方面的实际运行情况进行较为详细的描述,并进一步讨论了如何在有限条件下扩大临床检测项目,为 EVD 患者的临床治疗提供更多实验室依据。

1 EVD 实验室检测的方案规划

1.1 样本类型与诊断价值

根据蒙罗维亚地区统一使用的实验室表单所示内容, EVD 待检者的样本类型主要有 4 类:全血、死亡后心脏血、皮肤活检和唾液棉签。全血主要是针对活着的 EVD 待检者,通常采集外周血,分离血清或血浆用于检测 EBOV 检测。血清可采用含有促凝剂的真空采血管或普通采血管。血浆样本首选的抗凝剂为 EDTA,其次为多聚茴香脑磺酸钠或柠檬酸抗凝剂。不可采用肝素抗凝剂,因为肝素可强烈抑制几乎所有的耐热 DNA 聚合酶的活性,从而导致 PCR 扩增失败而出现假阴性结果[2,4]。此外,美国 CDC 临时草案指出[2],血样本应当置于塑料管,勿采用玻璃管,我们认为,其主要原因在于玻璃管更易残留 RNA 酶,从而导致 EBOV 降解。死亡 EVD 待检者的首选样本类型为心脏血液,其主要原因在于心脏血液在患者死亡后数小时内仍然能够保持非凝集状态,其次是口腔唾液棉签或皮肤活检。其中,心脏血的采集标准和要求与外周血全血一致。

在具体的实施流程中,我们对活着的 EVD 待检者均采集 EDTA 抗凝血,所用采血管为塑料管。此外,死亡的 EVD 待检者均采集 EDTA 抗凝心脏血,少部分患者因心脏血采集困难,从而选择了口腔唾液棉签。从中国 ETC 的 10 余例死亡病例及蒙罗维亚两家实验室 2 000 余 EVD 待检者检测结果分析表明,无论是心脏血还是唾液棉签,死亡病例的 EBOV 阳性检出率很低,90% 以上 EVD 待检者死亡病例检测结果为阴性。我们分析主要原因有以下两点:一是患者死亡后,随着机体细胞的破坏,EBOV 快速降解,从而导致结果出现假阴性;二是埃博拉疫情发生后,利比里亚的基础医疗几乎被摧毁,部分死亡病例并非死于 EVD。由于无实验室检测 EVD 待检者的其他相关检测项目,故无法获得实验室诊断数据支撑上述结论。

1.2 样本的采集与安全防护

1 ~ 10 个 EBOV 就能够通过破损皮肤、黏膜或眼睛感染接触者。EVD 患者血液中的埃博拉病毒滴度可达到 10^8 copy/mL 或更高,因此,即使是纳升级微滴大小的污染血液都具有高度传染性[5]。美国 CDC 及 WHO 均推荐医护人员在采血过程中要严格执行防护标准,必须穿戴个人防护装备(personal protective equipment, PPE)[1-3]。中国 ETC 规定,临床样本采集者的 PPE 穿脱标准及流程均按照临床医生和护士的标准实施。采血员穿戴 PPE 的主要特殊之处在于:必须穿戴第 3 层手套,且每采集完 1 位待检者的样本,均需要手消毒、更换第 3 层手套,方能采集下一位待检者。

中国 ETC 为样本采集在污染区准备了专用采血车,配有锐器盒、采血针(包括真空采血针或注射器)、装有 0.5% 含氯消毒制剂的喷雾器、手套、止血带、安尔碘皮肤消毒剂。在样本采集流程中,采血员遵循了 2 个基本原则:①严格执行手卫生制度、避免交叉污染。主要流程细节包括:采血员穿上 PPE 后,严格执行“三区两带”的单向流程,携带采血车进入病房采血,每采集 1 位待检者,立即将其样本置于样本罐或样本袋密封暂存,然后返回污染区公共走廊,7 步法洗手和更换第 3 层手套,并将采血针或注射器针头丢弃于锐器盒,更换的手套、止血带、消毒棉签等则丢弃于采血车上的生物安全专用垃圾袋。之后同样方法对另一患者采血。通过上述手段,一方面可确保采血员自身安全,另一方面,可避免不同 EVD 待检者之间的交叉感染。采血顺序依次是 EVD 疑似、可能和确诊病例。

②同一类型病例则遵循轻症者优先采血原则。

1.3 样本的保存、转运与安全防护

在利比里亚首都蒙罗维亚地区有独立的3个实验室进行EBOV实时RT-PCR检测,因此,ETC均需要用生物安全运输箱保存和转运EVD待检样本。美国CDC及WHO联合制定的EVD实验室诊断草案指出,生物安全运输箱应至少有3层容器:内层用于放置样本,须具备密封和防漏装置;中间层具有防水和防漏功能;外层是刚性外包装,并附有生物危害标志及其他相关信息标签[2]。我们认为,上述设计的主要依据在于:样本意外破损时,内层的密封和防漏装置可将泄漏物质留滞于该层容器内,避免样本泄漏所致污染;中间层可进一步防止样本泄漏,同时,防止外部液体倒流入内层,避免样本与环境之间的相互污染;外层主要用于长途运输,如果是短途转运的话,可考虑省略此外包装,但应附有生物危害标志。

我们在具体实施过程中,先后使用过两种类型的生物安全运输箱,分别是自备的一次性生物安全运输箱和蒙罗维亚3家实验室共用的重复使用的生物安全运输箱。一次性生物安全运输箱是国产的UN2814类冷藏箱,属于A类样本生物安全运输箱。内层容器是样本运输罐,内置有海绵试管托架和防水防漏吸附棉;中间层容器是聚酯材质密封容器,防止在运输中由于震动、温度、湿度、压力改变而造成泄露,同时,可放置制冷模块,以保持转运过程中的低温;外层是牛卡纸板外包装箱。该生物安全运输箱完全符合美国CDC提出的草案标准[2]。蒙罗维亚实验室提供的反复使用的生物安全运输箱仅有2层容器,内层是密封样本袋,用于放置采血管及唾液棉签等生物样本;外层是聚酯材质密封容器,内置制冷模块。该生物安全运输箱缺少美国CDC草案所提到的外层刚性外包装[2]。如前所述,由于此地区的样本均是短途运输,因此,均未使用外层容器。

在前期样本送检过程中,中国ETC均采用自备的一次性生物安全运输箱,并且,放入了制冷模块,从而达到美国CDC草案所提到的2~8 ℃的保存与转运条件[2]。但此运输箱的后续处理比较麻烦,需要焚烧或掩埋等手段,因此,利比里亚国家参考实验室(Liberia National Reference Laboratory)的工作人员建议使用他们统一提供的上述重复使用的生物安全运输箱,且室温条件下进行短时间样本保存和转运并不影响实验结果。

EBOV具有高度传染性,这也正是医务人员成为EVD高感染风险人群之一的原因[1-3]。如何保证在转运过程中样本不污染环境和不感染包括转运人员在内的医务人员,无论是WHO还是美国CDC均未提供相关的具体操作指南[1-3]。我们在具体实施过程中,提出并遵循“不触碰、严消毒”的原则,充分保证中间层和外层容器外表面的清洁。具体做法(图1):在污染区和清洁区交界处设置“样本交接点”;由样本交接员自清洁区携带无内层容器的生物安全运输箱至样本交接点;然后,采血员将装有样本的内层容器在样本交接点放入中间层容器,在此过程中,采血员不得触碰中间层容器的任何部位,如有意外触碰,则立即对触碰点采用0.5%含氯消毒剂喷洒;样本交接员合上中间层容器盖子,再由采血员用0.5%含氯消毒剂喷洒中间层容器外表面;如有外层容器,则由样本交接员将中间层容器放入外层容器后,再由采血员用0.5%含氯消毒制剂喷洒外层容器外表面。在整个流程中,采血员着全套PPE,样本交接员可只穿戴手套、防水服和口罩。但是,在采血员放置样本、消杀运输箱外表面等操作步骤时,样本交接员必须站在至少2 m之外的地方。

1.4 样本检测结果的判读

WHO指南指出,EVD确诊患者必须是两次连续检测结果持续阴性方可被认为治愈,且两次采样至少间隔48 h[1]。美国CDC草案指出了实时RT-PCR检测结果解读的2个要点[2]:首先,若症状出现时间<72 h,即使实时RT-PCR检测结果是阴性,仍不能排除EBOV感染;如果在发病72 h之后,患者仍然有症状,则必须再采样检测EBOV,但是,如果患者症状消失,则无需重复检测。其次,如果症状出现时间超过72 h,实时RT-PCR检测结果阴性,则可直接排除埃博拉病毒感染。

由此可见,埃博拉病毒检测有一个关键的时间节点,即病程72 h。主要原因在于,部分患者在发病之初的72 h内,EBOV滴度可能达不到实时RT-PCR的最低检测限,从而导致检测结果为阴性。在美国CDC早期的实验室检测指南中甚至提到有可能在症状出现3~10 d后才能从患者血液中检测到EBOV。在中国ETC收治的5例EVD确诊病例中,就有3例患者的首次检测结果为阴性,2 d后复检方为阳性,提示了患者症状出现至病毒检测阳性确实存在一个窗口期。这个特殊的窗口期就要求ETC必须认真对待每一位EVD疑似或可能病例,不能因为1次检测结果阴性就排除

EBOV感染的可能性。

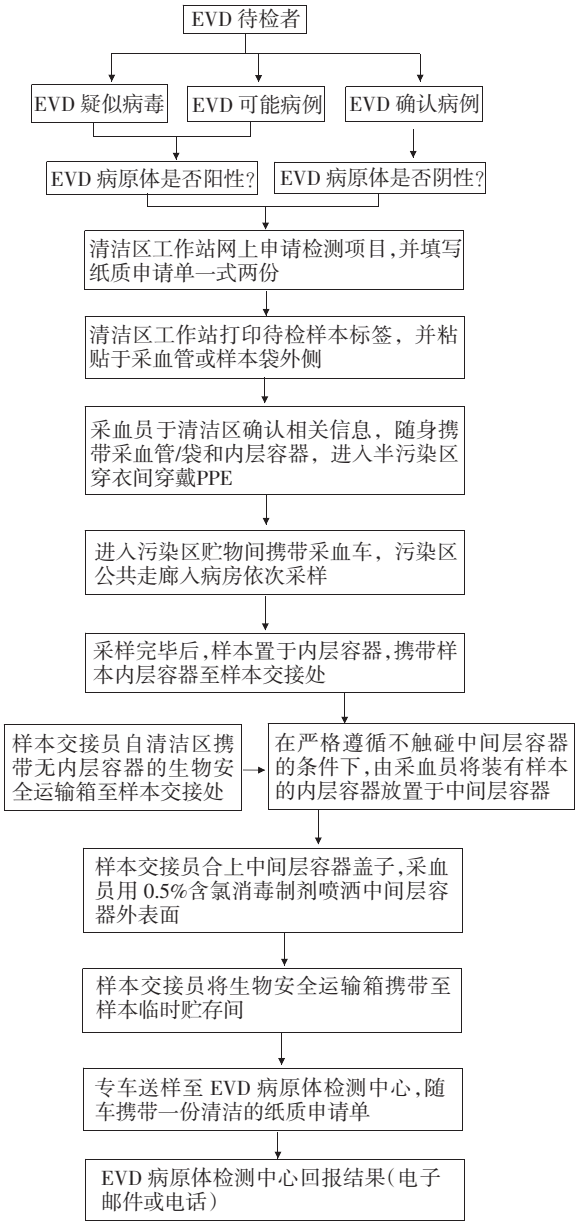


图1 EVD待检者样本采集、保存与转运流程示意图

同时,我们和蒙罗维亚地区其他ETC一样,对EVD确诊病例出院实施以下实验室诊断标准:患者症状消失48 h左右采第1次样,如果检测结果呈阴性,则在72 h后采第2次样,如果继续呈阴性,则患者可在次日出院。

目前,在蒙罗维亚地区的3家检测中心均采用实时RT-PCR检测EBOV,该方法是一种定性检测,结果报告为阴性或阳性,但各实验室在结果报告清单中有时会告知实时RT-PCR的循环阈值(cycle threshold, Ct)。由于实时RT-PCR的Ct值可在一定程度上反映患者血液中病毒滴度,即Ct值越低,病毒滴度越高,反之亦然。根据中国ETC收治的5例患者检测结果而言,病毒滴度与患者病情的严重程度和进展速度呈正相关关系,病毒滴度越高,患者的初始症状越重,病情进展也更为迅速,但因病例数少,尚缺乏有统计学意义的数据支撑。该结论提示,如果对患者血液中的EBOV进行定量检测,其检测结果能更好地为临床治疗提供决策依据。

1.5 拓展项目的开展及意义

电解质平衡、肝功能、心肺功能的实验室检测可为EVD患者的病情评估和临床治疗提供十分重要的依据[5-7]。同时,利比里亚各种传染性疾病仍然较为常见,其中恶性疟疾是最常见的一种传染病。但是,利比里亚基础医疗条件差,对EVD待检者均只提供EBOV检测这一基本项目。因此,如何开展实验室的其他检测项目成为大家共同关注的问题[5-7]。在中国ETC,为了有效排除EVD待检者患疟疾的可能性,我们在病房采集血样的同时采用床旁快速检测(point-of-care test,POCT)试剂对每位新入院的EVD待检者检测恶性疟、三日疟、卵形疟、间日疟4种疟疾,检测结果表明收治的EVD待检者中确有恶性疟,并进行了抗疟治疗。

近期,随着美国在非洲抗击埃博拉的几位医务工作者感染EBOV并返回美国治疗,包括美国CDC、埃默里大学在内的工作人员对如何开展EVD患者的电解质、肝功能、心肺功能实验室检测所需要的实验室条件和实施流程进行了较为详细地探讨,并成功应用于EVD患者的检测[5-7]。相关文献报道提到两个重要观点:一是必须详细评估样本处理和检测过程中产生的飞沫、喷溅物和气溶胶,这些可能携带患者病毒的载体感染实验室人员的危险性极高;二是样本处理和检测过程中的离心和采血管开盖过程是最危险的流程,是产生上述飞沫、喷溅物和气溶胶的核心来源。因此,作者认为,所有的实验操作原则上必须在达到生物安全3级(biosafety level 3, BSL-3)标准的实验室进行,同时,必须具备全排型三级生物安全柜,具有密封盖或密封转子的离心设备,以及具有包括呼吸保护装置的增强型PPE[5-7]。如果达不到BSL-3,部分实验可在达到BSL-2标准的实验室开展,但是不可采用离心方式处理样本,只能通过重力自然沉降方式获得血清或血浆,并且整个处理和检测过程中不得有任何打开采血管盖子的步骤,所用设备必须是全封闭系统,检测完毕

后,必须对设备进行消毒处理[5-7]。作者还提到,可广泛开展POCT检测项目,例如,目前已经可开展干式生化、血气分析及各种感染性病原体的POCT检测项目[5-7]。

2 中国ETC的EVD待检者实验室检测方案与流程实践

目前,尚无EVD待检者样本实验室检测方案与流程具体指南的官方文件或文献报道。中国ETC在具体实践过程中,根据如上所述的EBOV实验室检测的相关理论与注意事项,建立了一套完善的实验室检测方案与流程(图1)。该流程的相关要点与特色主要包括:①整个流程完成人员包括2名采血员、1名样本交接员、1名检验护工,其中,检验护工负责专车转运样本,可由采血员或样本交接员兼任;②采用"军字一号"系统进行网上待检项目申请和结果回报,同时,填写2份纸质申请单,其中1份随样本转运至检测中心,另1份用于记录结果和存档备案;③采血流程严格执行"三区两带"单向作业,严格执行手卫生,避免交叉污染;④在污染区和清洁区交界处设置样本交接点,确保生物安全运输箱的外表层清洁。在中国ETC首批医疗队员2个多月的工作时间内,实现了"零感染"目标,充分说明了该流程的科学性与严谨性。

我们根据自身在中国ETC的实践经验,总结并实施了一套完善的EVD待检者样本采集、保存和转运、检测流程,并在采样时间节点、结果解读、实验室其他辅助检测方面提出了科学、严谨的观点和建议。我们认为,EVD实验室检测方面需注意以下几点:采血流程必须严格执行手卫生,勤换手套,避免交叉感染;设置样本交接点,严格喷洒生物安全运输箱外表层;应采用能准确反映病毒滴度的实时定量RT-PCR方法;床旁采用POCT方式检测疟疾等当地常见传染病有助于诊疗;其他检测项目原则上必须在BSL-3实验室进行;病程72 h是EBOV检测的一个时间节点,出现症状72 h内EBOV检测结果阴性不能排除埃博拉病毒感染;EVD确诊病例连续2次检测结果阴性的时间间隔至少为48 h。

参考文献:

[1] World Health Organization (WHO). Laboratory guidance for the diagnosis of Ebola virus disease[EB/OL](2014-09-19)[2015-01-26]. http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/laboratory-guidance/en/.

[2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim guidance for specimen collection, transport, testing, and submission for persons under investigation (PUIs) for Ebola virus disease (EVD) in the United States[EB/OL](2014-10-20)[2015-01-26]. http://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/laboratories/specimens.html.

[3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). How U.S. clinical laboratories can safely manage specimens from persons under investigation (PUIs) for Ebola virus disease (EVD)[EB/OL](2014-11-10)[2015-01-26]. http://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/laboratories/safe-specimen-management.html.

[4] Huang Q, Yao C Y, Chen B, *et al*. Species-specific identification by inhibitor-controlled PCR of ruminant components contaminating industrial crude porcine heparin [J]. Mol Cell Probes, 2006, 20(3/4):250-258.

[5] Iwen P C, Smith P W, Hewlett A L, *et al*. Safety considerations in the laboratory testing of specimens suspected or known to contain ebola virus[J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143(1):4-5.

[6] Hill C E, Burd E M, Kraft C S, *et al*. Laboratory test support for ebola patients within a high-containment facility [J]. Lab Med, 2014, 45(3):e109-e111.

[7] Iwen P C, Garrett J L, Gibbs S G, *et al*. An integrated approach to laboratory testing for patients with ebola virus disease [J]. Lab Med, 2014, 45(4):e146-e151.

(**收稿**:2015-01-20;**修回**:2015-01-26)

(编辑 王 红,冷怀明)