

---

# 甘肃省疾控中心中东呼吸综合征防控应急预案（试行）

## 1 总 则

### 1.1 编制目的

为做好中东呼吸综合征防控工作，提高中东呼吸综合征的应对能力和防控水平，及时、有效地采取各项防控措施，做到早发现、早报告、早隔离、早治疗，控制疫情的传播、蔓延，保障广大人民群众的身体健康和生命安全，维护社会的稳定。

### 1.2 编制依据

根据《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》、《国家突发公共卫生事件应急预案》、《全国不明原因肺炎病例监测、排查和管理方案》、《甘肃省突发公共卫生事件应急预案》等编制。

### 1.3 工作原则

坚持统一领导，部门配合；快速反应，科学应对；预防为主，防治结合的原则。

### 1.4 疫情分级

1.4.1 特大疫情（Ⅰ级） 是指国内其他省份没有发现中东呼吸综合征确诊病例，在我省境内首先发生 1 例及以上确诊病例，疫情有扩散趋势。

1.4.2 重大疫情（Ⅱ级） 是指国内其他省份已经发现中东呼吸综合征确诊病例，在我省境内发生 1 例及以上确诊病例。

1.4.3 较大疫情（Ⅲ级） 是指适用于以下三种情形时，在我省境内发生 1 例及以上中东呼吸综合征疑似病例。①境外发现中东呼吸综合征散发病例，但尚未证据表明病毒已经具备人传人的能力；②境外发生中东呼吸综合征人传人疫情，境内未发现病例；③境内发现中

---

东呼吸综合征散发病例，但尚未证据表明病毒已经具备人传人的能力。

## **1.5 适用范围**

本预案适用于本中心的中东呼吸综合征防控应对准备及应急处置工作。

## **2 组织体系及职责**

### **2.1 应急组织机构及职责**

中心在突发公共卫生事件应急处理领导小组领导下，成立应急处理工作小组，根据职责分工和领导小组指派，负责开展本省中东呼吸综合征疫情应急处置工作。

#### **2.1.1 应急处理领导小组**

中心突发公共卫生事件应急处理领导小组全面负责中心中东呼吸综合征疫情的应急处理工作，指导各业务科室做好中东呼吸综合征的监测与防控工作；组织评估预防控制措施的效果，完善防控方案。协调有关部门保障应急药品、消杀药械、检测试剂等物资的储备和供应。为省卫生厅确定事件等级和发布信息提供依据。

#### **2.1.2 应急处理工作小组**

由现场流调处理组、病原检测组、消毒组、宣教组和后勤保障组组成。负责制定我省中东呼吸综合征疫情流行病学调查方案、监测方案，评估和预测本省疫情。

现场流调处理组：参与并指导基层现场流行病学调查及疫情处置，指导省内中东呼吸综合征预防控制，负责本省中东呼吸综合征疫情及监测资料的收集、汇总分析、反馈和上报；组织对整个应急处理工作的评估及调查报告的起草、上报。

病原检测组：负责标本检测；指导各级疾控中心及医疗单位对疑似病例、密切接触者等标本的采集、保存、运送；确保实验室生物安

---

全。

消毒组：指导人员的个人防护、疑似和确诊病例可能污染场所的消毒处理、医院消毒隔离等预防控制措施；负责中心所有现场调查处理人员的个人防护和消毒处理；开展对疫情处理过程中预防性消毒及疫区消毒效果的评价。

宣传教育组：开展中东呼吸综合征防控知识的宣传；组稿宣传中心在开展中东呼吸综合征防控工作时的进展；配合专业科室做好全省中东呼吸综合征防控人员的技术培训，热线咨询电话服务。

后勤保障组：负责中心应急物资（防护用品、消杀药品）、设备、车辆等方面的保障。

## **2.2 日常管理与专业工作部门**

### **2.2.1 应急处理办公室**

协调专业科室对报告的中东呼吸综合征病例、不明原因肺炎病例进行排查、监测；组织制定我省中东呼吸综合征技术处置方案或预案；做好全省医疗卫生人员中东呼吸综合征应急防控知识的培训；应急物资储备以及应急预案的演练。

### **2.2.2 急性传染病防制科**

负责全省不明原因肺炎病例（疑似中东呼吸综合征疫情）的报告，监测资料的收集、汇总分析及上报，指导或参与开展现场流行病学调查处理（包括疑似中东呼吸综合征病例的流行病学调查，密切接触者追踪和医学观察），指导相关人员做好生活环境、物品的卫生学处理和疫情现场处置人员的个人防护。

### **2.2.3 病原生物实验室**

负责全省中东呼吸综合征病例、不明原因肺炎病例标本的采集、送检、实验室检测；检测出的阳性标本送中国疾病预防控制中心复核检测；检测阴性的标本，卫生部和中国疾病预防控制中心认为需要送

---

检的，也要送中国疾病预防控制中心复核。指导基层医疗卫生与疾控部门做好标本的采集、保存和送检工作。保障实验室生物安全。

#### 2.3.4 其他科室

服从应急处理领导小组的指挥，做好应急工作的准备。

### 3 监测、预警与报告

#### 3.1 监测：

按照《全国不明原因肺炎病例监测实施方案（试行）》的要求，加强不明原因肺炎的监测，特别是在赴沙特朝觐人员回国时安排部署全省的监测工作，要求各地疾控中心深入各级医疗单位进行督导和检查方案的执行及不明原因肺炎报告的情况。发现可疑疫情及时开展流行病学调查与核实。

在接到疑似/确诊中东呼吸综合征病例报告后，应在 2 小时内派出现场流调处理组对疑似病例及密切接触者进行流行病学调查和标本采集，及时将调查信息向省卫生厅、中国疾病预防控制中心报告，并通报病例所在地疾病预防控制中心。

负责指导当地疾控中心对密切接触者的调查、标本采集及管理；负责指导基层疾控中心人员的防护及消毒处置，指导定点医院的个人防护与院内感染控制。

实验室接到疑似病例标本后，立即开展中东呼吸综合征核酸的检测，应将检测结果及时报告省卫生厅及病例所在的定点医院。

配合国家或参与省级专家组工作，根据病例的流行病学史、临床表现、实验室检查结果进行诊断或排除。

#### 3.2 评估与预警

根据中东呼吸综合征疫情全球及我国疫情信息资料，结合我省疫情情况、实验室监测数据等信息进行科学分析、综合评估，早期发现潜在隐患以及可能发生的突发事件，做出预警、预测和预报。

---

### 3.3 报告

中心应急办或急传科接到中东呼吸综合征疫情报告后，应及时对中东呼吸综合征疫情进行核实，收集中东呼吸综合征病例的基本信息，及时报告中心领导，通知相关科室予以准备。同时上报省卫生厅与中国疾控中心。

## 4 应急反应

### 4.1 应急反应原则

在应急处理中要采取边调查、边处理、边核实的方式，以有效措施控制事态发展。相应的科室做好应急处理所需的人员与物资准备，服从中心应急处理领导小组的统一指挥和调度。

### 4.2 应急响应

#### 重大、特大突发事件应急响应

中心突发公共卫生事件应急处理领导小组工作全面启动，负责组织和协调各方面工作，及时派出专业技术人员赴现场开展流行病学调查，标本的采集，密切接触者的追踪、隔离，疫区、疫源地隔离区的划定，制定各项预防控制措施等。

### 4.3 应急反应措施

应根据以下不同情况采取相应的应对措施。

#### 4.3.1 本地尚未发现中东呼吸综合征疫情，应该采取以下措施：

(1) 密切关注国内外中东呼吸综合征疫情动态，做好疫情预测预警，开展疫情风险评估。

(2) 做好各项技术及物资准备。

(3) 开展常规监测、特别是加强不明原因肺炎病例、不明原因死亡病例的监测。

(4) 开展中东呼吸综合征防治知识的培训和健康教育，提高公众防控中东呼吸综合征知识与能力。

---

4.3.2 本地出现中东呼吸综合征疑似病例，属较大疫情（Ⅲ级），应采取以下措施：

（1）启动中东呼吸综合征应急监测，实行中东呼吸综合征病例零报告制度。

（2）按照中东呼吸综合征病例流行病学调查方案迅速开展流行病学调查工作，并及时采集疑似病人标本进行检测。

（3）按照密切接触者判定标准和处理原则，确定密切接触者，并做好医学观察。

（4）按照职责分工，做好疫点内人群居住和聚集场所的消毒处理工作。

4.3.3 国内其他省份已经发现中东呼吸综合征确诊病例，本地出现 1 例及以上确诊病例，属重大疫情（Ⅱ级）；国内其他省份没有发现中东呼吸综合征确诊病例，本地首先发生 1 例及以上确诊病例，疫情有扩散趋势，属特大疫情（Ⅰ级）。应采取以下措施：

（1）启动中东呼吸综合征应急监测，实行中东呼吸综合征病例零报告制度。

（2）按照中东呼吸综合征病例流行病学调查方案迅速开展流行病学调查工作，并及时采集病人标本进行检测。

（3）按照密切接触者判定标准和处理原则，确定密切接触者，并做好医学观察。

（4）按照职责分工，做好疫点内人群居住和聚集场所的消毒处理工作。

（5）配合国家及控中心专家组开展工作。

（6）实行疫情值班，保障疫情信息畅通。

（7）进一步加强健康教育，提高公众卫生意识和个人防护意识，做好公众心理疏导工作，避免出现社会恐慌。

---

## 5 应急处理工作评估

中东呼吸综合征应急反应终止后,对中东呼吸综合征的应急处理情况进行评估,完成评估报告。评估报告内容主要包括事件情况、现场调查处理概况、所采取措施及其效果评价、应急处理过程中存在的问题和取得的经验及改进建议。评估报告上报省卫生厅和中国疾病预防控制中心。

## 6 应急保障

### 6.1 组织保障

中心突发公共卫生事件领导小组负责中东呼吸综合征疫情的应急管理工作。

应急办负责中东呼吸综合征疫情的应急工作的组织协调。急传科、消毒病媒科、病原生物实验室负责中东呼吸综合征的日常管理及监测、检测、预警和应急处理工作。

### 6.2 技术保障

中心要加强有关专业技术人员的业务培训,提高流行病学调查、监测、消毒处理和实验室检验的能力;建立符合实验室生物安全有关规定和要求的中东呼吸综合征检测实验室,配备技术水平高、责任心强的技术人员承担检测工作。同时要健全实验室安全管理制度,使生物安全管理做到科学化、规范化、制度化。

### 6.3 后勤保障

中心应急办和各专业科室要根据实际,科学制定储备计划。各种药品、试剂、防护用品等要及时更新;各种器械、设备要经常调试,确保突发事件处置的及时有效。车辆管理科根据应急需要,优先安排突发公共卫生事件应急处理工作的需要。

## 7 附则

### 7.1 预案的管理

---

本预案由甘肃省疾控中心制定，根据形势变化和实际中发现的问题及时进行更新、修订和补充。

#### 7.2 预案的解释部门

本预案由甘肃省疾控中心负责解释。

#### 7.3 预案实施时间

本预案自印发之日起实施。

- 附：1. 中东呼吸综合征流行病学调查指导原则（试行）  
2. 中东呼吸综合征病例个案调查表  
3. 中东呼吸综合征病例密切接触者医学观察登记表  
4. 中东呼吸综合征疫情现场消毒技术方案（试行）  
5. 中东呼吸综合征病例实验室检测技术指南

---

## 中东呼吸综合征流行病学调查指导原则

### 一、目的

流行病学调查是传染病预防控制的关键措施和重要工作环节。做好中东呼吸综合征流行病学调查对于指导疫情的预防和控制至关重要，其主要目的是：

1. 核实诊断，查找传染源和传播途径；
2. 确定和追踪密切接触者及一般接触者，进行分类管理，防止疾病的进一步传播；
3. 掌握疫情波及范围和影响因素，为疫情的处理提供依据；
4. 为进一步阐明疾病自然史、流行病学特征及规律提供研究线索。

### 二、工作内容

1. 病例的个案调查；
2. 有症状者及密切接触者的处置；
3. 资料管理和利用。

### 三、病例定义

（一）中东呼吸综合征病例定义：

1、疑似病例，同时具备下述 2 个条件：

1) 临床表现，同时符合如下 3 项：

- 发热 ( $38 \geq ^\circ\text{C}$ )；
- 具有肺炎或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 影像学证据，或尸检显示存在原因不明肺炎或 ARDS 病理学改变；
- 没有其他诊断能够充分解释疾病表现。

2) 流行病学史：发病前 10 天内，曾密切接触过疑似病例或确诊病例，或者发病前 10 天内去过或正在阿拉伯半岛地区 (包括沙特、卡

---

塔尔、约旦、也门、阿曼、阿联酋、科威特、伊拉克等)。

2、确诊病例:疑似病例标本中分离到该中东呼吸综合征,或经 RT-PCR 检测中东呼吸综合征特异性基因片段阳性。

### (二) 有症状者

同时符合以下三种条件:

- 1、腋下水银温度计测体温超过 38 摄氏度,伴有咳嗽;
- 2、有呼吸短促或呼吸困难等症状;
- 3、10 日内有受染地区旅行史。

### (三) 密切接触者

密切接触者是指在未采取有效防护情况下接触中东呼吸综合征可疑病例的人群,具体包括:诊断、治疗或护理、探视中东呼吸综合征病例的人员;与病例共同生活、工作的人员;或接触过病例的呼吸道分泌物、体液的人员,经流行病学调查核实的其他在未采取有效防护情况下接触中东呼吸综合征可疑病例的人。航空器上密切接触者的定义为:以病例为中心左右各 1 位,前后排各 3 位。

## 四、工作程序和方法

### (一) 病例的个案调查

1. 疾病预防控制机构接到中东呼吸综合征病例(或疑似病例)报告后,应于最短时间内派出流调人员对报告病例进行流行病学个案调查。原则上每例病人至少由 2 名专业人员共同完成调查。

2. 对病例进行个案调查时,尽可能由病人自己回答调查者所提的问题,对于不详或有可疑的地方可通过病人家属或医生等其他知情者补充或核实。如病人病情较重或死亡,无法直接调查时,应通过其亲友、同事或其他知情人了解情况,完成调查。

3. 按照《中东呼吸综合征病例个案调查表》进行个案调查,个案调查基本内容:病人的基本情况、临床表现,以及患者发病前后的活

---

动情况和与其有过密切接触的人员情况。调查表填写要完整，字迹要清晰。

4. 疾病预防控制机构在接到病例的订正报告或转归报告时，应及时做好随访和相关信息的补充调查，进一步完善个案调查表。

5. 对病人进行随访时，要注意了解病人健康恢复情况。

## （二）有症状者处置

对同意到口岸所在地定点医院接受诊治的，检验检疫部门立即通知卫生部门，移交指定医院诊治。卫生部门在接到口岸检验检疫部门报告后，应尽快接运，原则上不超过 2 小时。

不同意到口岸所在地定点医院接受诊治的，通知口岸所在地 CDC 采样进行实验室检测，原则上接到通知后不超过 2 小时采样。为有症状者提供《就诊方便卡》后放行，详细登记个人信息，个人信息转交当地卫生部门追踪观察。

## （三）密切接触者处置

密切接触者要详细登记个人信息，有症状者转运至指定医院隔离诊治；无症状者实施居家医学观察，并由当地 CDC 进行随访；对无固定居所的人员，卫生部门可在住地或指定的医学观察点进行医学观察。所有密切接触者均实施医学观察，由密切接触者当时所在地 CDC 进行随访 10 天，每日填写《中东呼吸综合征病例密切接触者医学观察登记表》。

## （四）流调注意事项

1. 流调人员应遵循高传染性严重呼吸道感染疾病指南要求做好个人防护，流调人员及参与病例救护的医务人员穿戴全套个人防护装备（N95 口罩、护目镜、防护服和手套）。

2. 流调人员调查时应注意发现病人隔离管理和消毒、防护等方面存在的薄弱环节，并给予必要的指导。

---

#### （五）资料的分析、管理和利用

1. 病例和密切接触者的流行病学调查资料实行计算机个案化管理，调查表的数据库要逐级上报。

2. 各级疾病预防控制机构要加强对流行病学调查资料的质量控制和分析利用，并及时向上级疾控机构和同级卫生行政部门报告分析结果，以指导疫情控制工作。

3. 流行病学调查原始资料和汇总分析结果以及调查报告均要及时整理归档。

附 2 :

## 中东呼吸综合征病例个案调查表

国标码□□□□□□

病例编码□□□□

### 1. 一般情况:

1.1 姓名: \_\_\_\_\_

1.2 国籍: \_\_\_\_\_

1.3 身份证或护照号码: □□□□□□□□□□□□□□□□□□

1.4 性别: (1)男 (2)女 ☐

1.5 年龄(岁): \_\_\_\_\_ □□

1.6 职业:

1.6.1 医院工作人员: ☐

(1)医 生 (2)护 士 (3)护工 (4)检 验 (5)行政管理人员 (6)其他\_\_\_\_\_

1.6.2 非医院工作者: ☐

(1)幼托儿童 (2)散居儿童 (3)学 生 (4)教 师 (5)保育保姆

(6)餐 饮 业 (7)商业服务 (8)工 人 (9)民 工 (10)农 民

(11)牧 民 (12)渔(船)民 (13)干部职员 (14)离退人员 (15)家务待业 (16)其 他

1.7 现居住地(详填): \_\_\_\_\_省\_\_\_\_\_市\_\_\_\_\_县(区)\_\_\_\_\_乡(街道)\_\_\_\_\_村

1.8 联系电话\_\_\_\_\_

1.9 工作单位: \_\_\_\_\_

1.10 户口所在地(详填): \_\_\_\_\_省\_\_\_\_\_市\_\_\_\_\_县(区)\_\_\_\_\_乡(街道)\_\_\_\_\_村

1.11 既往病史

1.11.1 基础疾病(糖尿病、高血压、心脏病、肾病等) (1)有 (2)无 (3)不详

1.11.2 既往是否曾患 SARS (1)是 (2)否 (3)不详

### 外籍人员补充信息:

1.12 入境时间: \_\_\_\_\_

1.13 入境口岸: \_\_\_\_\_

1.14 入境后住地\_\_\_\_\_

1.15 入境航班\_\_\_\_\_

## 2. 发病与就诊情况

### 2.1 发病情况

2.1.1 发病时间：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日 ☐☐☐☐☐☐☐☐

2.1.2 首发症状（描述）：\_\_\_\_\_

2.2 发病地点：\_\_\_\_\_省\_\_\_\_\_市\_\_\_\_\_县(区)

2.3 就诊情况（从发病到入院的就诊经过）

诊日期	诊医院和科室	断病名	治疗的医 人员	接诊、 医护

### 2.4 入院情况

2.4.1 入院日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日 ☐☐☐☐☐☐☐☐

2.4.2 所住医院名称：\_\_\_\_\_

2.4.3 住院号： ☐☐☐☐☐☐☐☐

2.4.4 入院诊断：(1)疑似病例(2)临床诊断病例(3)实验室诊断病例（4）其它

2.5 报告时间：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 3. 临床表现：

首发症状(描述)：\_\_\_\_\_

3.1 发热 (1)有 (2)无 ☐

3.1.1 体温(最高)\_\_\_\_\_℃

3.1.2 体温(入院时)\_\_\_\_\_℃

3.2 咳嗽 (1)有 (2)无 ☐

3.2.1 咳痰 (1)有 (2)无 ☐

3.3 上呼吸道卡他症状 (1)有 (2)无 ☐

3.4 胸闷 (1)有 (2)无 ☐

3.5 呼吸困难 (1)有 (2)无 ☐

3.6 腹泻 (1)有 (2)无 ☐

#### 4 临床及实验室检查:

##### 4.1 血常规

初诊时: 白细胞计数:  $\times 10^9/L$  中性粒细胞: % 淋巴细胞计数: %

入院时: 白细胞计数:  $\times 10^9/L$  中性粒细胞: % 淋巴细胞计数: %

##### 4.2 胸部X线检查

初诊时: 日期: \_\_\_\_年\_\_月\_\_日 结果描述: \_\_\_\_\_

入院时: 日期: \_\_\_\_年\_\_月\_\_日 结果描述: \_\_\_\_\_

##### 4.3 病原学检测结果:

标本类型	采样时间	检测项目及结果			
		PCR	RT-PCR	核酸检测	病毒分离
粪便					
咽试液					
痰					
血液					

注: ①阴性 ②阳性 ③未检测

#### 5. 流行病学史调查:

调查日期: \_\_\_\_\_

##### 5.1 发病前十天内逐日活动情况 (填写下表)

日期	活动内容	活动地点	接触人员 (有无接触发热等可疑病人)

注: 每一项活动内容或活动地点单独填写一项

5.2 请详细描述发病前二周内特殊活动情况 (如到医院、去外地、聚餐、聚会、外人来访等)。

5.3 发病前2周内是否接触过冠状病毒病人或/和疑似冠状病毒感染患者:

(1)是 (2)否 ☐

若是,请填写下表

患者姓名	发病时间	临床诊断	与患者关系	最后接触时间	接触方式	接触频率	接触地点

注:1. 与患者关系: (1)家庭成员 (2)同事 (3)社会交往 (4)共用交通工具 (5)其它

2. 接触方式: (1)与病人同进餐 (2)与病人同处一室 (3)与病人同一病区  
(4)与病人共用食具、茶具、毛巾、玩具等 (5)接触病人分泌物、排泄物等  
(6)诊治、护理 (7)探视病人 (8)其他接触

3. 接触频率描述: (1)经常 (2)有时 (3)偶尔

4. 可能的接触地点: (1)家 (2)工作单位 (3)学校 (4)集体宿舍 (5)医院  
(6)室内公共场所 (7)其他

5.4 发病前两周内接触动物(罕见动物、禽类)情况: (1)是 (2)否

接触动物情况			接触方式				
时间	地点	动物名称	销售	屠宰	烹饪	吃	其他(注明)

5.5 发病后至隔离治疗前逐日活动情况

日期	活动内容	活动地点	接触人员

5.6 发病后至住院前密切接触者:

5.6.1 家庭、亲友

接触者姓名	性别	年龄	关系	接触情况	住址(或工作单位)	电话号码


5.6.2 工作单位或主要活动场所联系人：

单位名称	地址及联系电话	主要联系人	接触者名单

6. 转归与最终诊断情况（随访或根据医疗报告完成）：

6.1 最后诊断：(1)疑似冠状病毒感染 (3) 实验室诊断病例

(4)排除（其它疾病名\_\_\_\_\_） ☐

排除依据：

6.2 转归：(1)痊愈 (2)死亡 若病例死亡, 则填写 6.2.1

6.2.1 病例死亡时间\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日 ☐☐☐☐☐☐☐☐

7. 调查小结：

补充调查（时间、内容等）：

调查单位：\_\_\_\_\_

调查时间：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日 调查者签名：\_\_\_\_\_

附 3:

# 中东呼吸综合征病例密切接触者医学观察登记表

省/市/自治区 \_\_\_\_\_ 市/州/地区 \_\_\_\_\_ 县/区 \_\_\_\_\_ 医学观察地点: \_\_\_\_\_

[illegible]

注：暴露类型：1. 接触疑似病例      2. 接触确诊病例

症状：指咳嗽等急性呼吸道症状，和/或肺炎或 ARDS 的临床表现

医学观察实施责任人\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_

---

附 4:

## 中东呼吸综合征疫情现场消毒技术方案（试行）

### 一、消毒原则

（一）消毒范围与对象 现场消毒的范围和对象为疑似病人排出的中东呼吸综合征污染的物品和环境等。但不必对室外环境进行大面积消毒，防止过度消毒现象的发生。

（二）消毒方法的选择 应首选物理消毒方法，采用化学消毒方法时，要注意选择合格的消毒剂。

### 二、消毒措施

#### （一）随时消毒

1. 随时消毒：是指对患者污染的物品和场所及时进行的消毒处理。飞机客舱、开辟清洁区、现场流调和采样、医学排查室、疑似病人转运车辆等可能被污染的各种场所应做好随时消毒。随时消毒特别要注意下列物品和场所：诊疗用品、生活用具、衣服、生活污水、污物、分泌物或排泄物及其污染的场所和物品、特别要注意对相关人员的及时清洗或消毒。

2. 医护人员和流调样品采集人员应按照有关要求，做好个人卫生防护诊疗、护理工作结束后应洗手并消毒。消毒人员要跟随流调和样品采集人员，对活动过的场所进行随时消毒，工作结束后，对流调和样品采集人员的防护服、手套、鞋的外表等进行随时消毒，不得有遗漏。

3. 对飞机上发现病例或疑似病例，应迅速采取隔离措施，将病人转移到机舱后部，其他乘客应距其 3 排座椅的距离。患者、乘务人员和乘客应立即带上医用防护口罩。患者最好使用单独的卫生间，无集中收集

---

排泄物的，应排入密闭容器内，到达目的地后由专门的消毒清洁人员进行消毒处理。运送病人或疑似病人的专门救护车还应及时对分泌物或排泄物及其污染的场所和物品进行消毒处理。

## （二）终末消毒

终末消毒是指传染源（包括病人和隐性感染者）离开有关场所后进行的彻底消毒处理，应确保终末消毒后的场所和其中的各种物品不再有病原体的存在，飞机的终末消毒要特别注意。

### 1. 医学排查室的消毒

疑似病人离开医学排查室后，应及时做好终末消毒。终末消毒的对象包括：住室地面、墙壁，桌、椅等家具台面，门把手，患者餐饮具、衣服、被褥等生活用品，厕所、卫生间等。

### 2. 飞机及转运车辆的消毒

患者离开后应对飞机及转运车辆进行终末消毒，消毒对象包括：舱室空气、内壁、座椅、桌面等物体表面，食饮具，病人所用寝（卧）具等纺织品，患者排泄物、呕吐物及污染物品及场所、飞机的卫生间。

### 3. 医疗机构的消毒

医疗机构发热门诊、感染科门诊等每日工作结束后，以及隔离病房在患者康复、死亡或离开后，均应做好终末消毒工作，包括：地面、墙壁，桌、椅、床头柜、床架等物体表面，患者衣服、被褥等生活用品及相关诊疗用品等。

### 4. 终末消毒程序

（1）出发前，应检查所需消毒用具、消毒剂和防护用品，做好准备工作。

（2）消毒人员到达疫点后，首先查对地址和名称，并说明来意，做好防疫知识宣传，禁止无关人员进入消毒区域内。

（3）对脱掉的外衣应放在自带的塑料袋中。穿工作衣、隔离服、

---

胶鞋(或鞋套),戴上 N95 口罩、帽子、防护眼镜、一次性乳胶手套等。

(4) 仔细了解病人活动场所、用过的物品、吐泻物、污染物倾倒或存放地点等,据此确定消毒范围和消毒对象。

(5) 进入较大的疫点时,应先用喷雾消毒的方法在地面消毒出一条 1.5 米左右宽的通道,供消毒前的测量、采样和其他处理用。

(6) 对室内(车内)物体表面进行消毒,应按照先上后下,先左后右的方法,依次进行喷雾消毒剂消毒或使用消毒剂进行擦拭。

(7) 病人用过的餐(饮)具、污染的衣物可在疫点进行煮沸消毒或浸泡消毒。

(8) 疫点消毒工作完毕,按防护用品穿脱顺序依次脱下,一次性物品按医疗废物处理,重复使用的用消毒剂擦拭或浸泡消毒。

(9) 填写疫点终末消毒工作记录。

(10) 离开现场前,嘱其在达到消毒作用时间后开窗通风,清水擦拭打扫。

## 5. 消毒人员注意事项

(1) 出发前,要检查应携带的消毒工具是否齐全无故障,消毒剂是否足够。

(2) 应尽量采用物理法消毒。在用化学法消毒时应尽量选择对相应致病微生物杀灭作用良好,对人、畜安全,对物品损害轻微,对环境影响小的消毒剂。

(3) 工作人员在工作中要注意个人防护,严格遵守操作规程和消毒制度,以防受到感染。

(4) 消毒过程中,不得随便走出消毒区域,禁止无关人员进入消毒区内。

(5) 消毒应有条不紊,突出重点。凡应消毒的物品,不得遗漏。严格区分已消毒和未消毒的物品,勿使已消毒的物品被再次污染。

---

(6) 携回的污染衣物应立即分类作最终消毒。

(7) 清点所消耗的药品器材，加以整修、补充。

(8) 填好的消毒记录应及时上报。

### 三、现场适用消毒剂的确

根据《疫源地消毒技术规范》、《疫源地消毒剂卫生要求》(GB27953-2011)以及中国疾控中心对中东呼吸综合征疫情应对工作指南，该中东呼吸综合征抗力比较脆弱，在体外仅可存活约 24 小时，普通消毒剂均能轻易将其灭活。因此，确定现场适用的消毒剂为高、中效类消毒剂。

### 四、中东呼吸综合征污染对象的消毒方法

**1、室内空气消毒：**开窗通风，保持室内空气流通，每日通风 2～3 次，每次不少于 30min。交通工具以自然通风为主，有条件的可采用空调等机械通风措施，在无人条件下，也可采用移动式循环风空气消毒机、紫外线对室内空气进行消毒。

**2、地面、墙壁消毒：**可使用喷雾消毒或表面擦拭消毒方法。选用 500 mg/L 二氧化氯消毒剂，作用 0.5h；或选用 500 mg/L-1000 mg/L 含氯消毒剂，作用 1h，用量为 100ml/m<sup>2</sup>～300ml/m<sup>2</sup>。地面消毒先由外向内喷雾一次，待室内消毒完毕后，再由内向外重复喷雾一次。

**3、衣服、被褥等纺织品消毒：**可煮沸消毒 10mi 或用有效氯为 250mg/L 的含氯消毒剂浸泡 15min；或阳光下暴晒半天以上。

**4、病人排泄物和呕吐物消毒：**患者的排泄物、呕吐物等最好用固定容器盛放。稀薄的排泄物、呕吐物，2 L 加漂白粉 50g 或含有效氯 20g/L 消毒剂溶液 2L，搅匀放置 2h。

成型粪便：50g/L 有效氯消毒剂溶液 2 份加入 1 份粪便中，混匀后，作用 2h。

尿液：每 2 L 加入漂白粉 5g 或 10g/L 有效氯消毒剂溶液 100mL

---

混匀放置 2h。

**5、餐(饮)具消毒:** 首选煮沸消毒 15min, 也可用有效氯为 500mg/L 含氯消毒剂溶液浸泡 0.5h, 再用清水冲洗净。

**6、诊疗用品、家用物品、家具消毒:** 可用 500 mg/L 二氧化氯消毒剂作用 0.5h 或有效氯为 500mg/L 的含氯消毒剂进行浸泡、喷洒或擦洗消毒, 作用 0.5h, 清水擦拭干净。

**7、手的消毒:** 用含酒精速干手消毒剂进行手消毒。也可用 0.5% 碘伏溶液涂擦 2 遍, 作用 1 min~3 min。或 0.5% 氯己定醇溶液作用 10 min~15 min。

**8、交通工具消毒:** 可用有效氯为 500mg/L-1000 mg/L 的含氯消毒剂溶液擦拭或喷洒至表面湿润, 作用 0.5h, 清水擦拭干净。也可用 0.5% 的洗必泰或 0.2% 的季铵盐消毒液擦拭座椅、桌面、舱室内壁。

**9、病人尸体消毒:** 口、鼻、耳、肛门、阴道要用浸过 5g/L 过氧乙酸溶液的棉球堵塞, 再用 5g/L 过氧乙酸溶液浸湿的布单严密包裹, 尽快火化。

**10、垃圾消毒:** 可燃物尽量焚烧, 也可喷洒 10g/L 含氯消毒剂, 作用 1h, 消毒后深埋。

## **五、注意事项**

1、选择具有卫生部批准文号的消毒剂, 并在有效期之内。消毒剂的使用剂量以及方法以使用说明书为准。

2、随时消毒和终末消毒工作由接受过培训的专业人员进行。并做好个人防护。

---

附 5:

## 中东呼吸综合征实验室检测技术指南

为指导全国中东呼吸综合征的实验室检测工作，特制定本指南。

### 一、标本采集

**1、采集对象：**中东呼吸综合征疑似病例、临床诊断病例及需要进一步研究的确证病例；其它需要进行中东呼吸综合征诊断或排除者。

### 2、标本采集要求

2.1 从事中东呼吸综合征检测标本采集的技术人员应经过生物安全培训（培训合格）和具备相应的实验技能。在标本采集过程中，采样人员可参照人感染高致病性禽流感H5N1的防护措施进行安全防护。

2.2 住院病例的标本由所在医院医护人员在当地疾控机构专业人员指导下采集。

2.3 密切接触者标本由当地疾控机构负责采集。

2.4 根据实验室检测工作的需要，结合病程再次采样。

### 3、标本采集种类

每个病例应尽可能同时采集上、下呼吸道标本；需要排除中东呼吸综合征死亡病例的则依据《传染病病人或疑似传染病病人尸体解剖查验规定》（中华人民共和国卫生部令第43号）中人感染高致病性禽流感的相关规定采集尸体标本，没有条件进行尸体解剖的，可采集呼吸道灌洗液或经皮穿刺采集肺组织标本。

3.1 上呼吸道标本：包括咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物、咽漱液、深咳痰液。

---

3.2 下呼吸道标本：包括呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺组织活检标本。

3.3 尸检标本：病人死亡后应依法尽早进行解剖，在严格按照生物安全防护的条件下，进行尸检，主要采集肺、气管组织标本，条件下也可采集肾脏的组织标本。

3.4 血清标本：每一病例必须采集血清标本，须采集急性期、恢复期双份血清。第一份血清应尽早（最好在发病后7天内）采集，第二份血清应在发病后第3~4周采集。采集量要求5ml，以空腹血为佳，建议使用真空采血管。

## 4 标本采集方法

4.1 咽拭子：用2根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子同时擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子头浸入含3ml采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。

4.2 鼻拭子：将1根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子轻轻插入鼻道内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。取另一根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子以同样的方法采集另一侧鼻孔。上述两根拭子浸入同一含3ml采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。

4.3 鼻咽抽取物或呼吸道抽取物：用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取粘液或从气管抽取呼吸道分泌物。

将收集器头部插入鼻腔或气管，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出，收集抽取的粘液，并用3ml采样液冲洗收集器1次（亦可用小孩导尿管接在50ml注射器上来替代收集器）。

4.4 咽漱液：用10ml不含抗菌素的采样液漱口。漱口时让患者头部微后仰，发“噢”声，让洗液在咽部转动。然后将咽漱液收集于50ml无菌的螺口塑料管中。无条件的可用平皿或烧杯收集咽漱液并转入

---

10ml螺口采样管中。

4.5 深咳痰液：要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于50ml含3ml采样液的螺口塑料管中。

4.6 呼吸道灌洗液：将收集器头部从鼻孔或气管插口处插入气管（约30cm深处），注入5ml生理盐水，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出。收集抽取的粘液，并用采样液涮洗收集器1次（亦可用小孩导尿管接在50ml注射器上来替代收集）。

4.7 胸水：在B超定位下进行胸腔穿刺，抽取胸水5ml，置于无菌的塑料螺口管中。

4.8 肺组织活检标本：在超声或X线定位下，经皮穿刺取肺组织活检标本，置于含3ml采样液的塑料螺口管中。

4.9 尸检标本：每一采集部位分别使用不同消毒器械，以防交叉污染；每种组织应多部位取材，各部位应取20～50g，淋巴结取2个。

4.10 血清标本：用真空负压采血管采集血液标本5ml，室温静置30分钟，1500～2000rpm离心10分钟，收集血清于2ml无菌螺口塑料管中。

## 5、标本包装

标本采集后在生物安全二级实验室生物安全柜内分装成一式三份。一份当地省级疾控中心检测用，一份送中国疾病预防控制中心检测，一份保存以备复核。

5.1 所有标本应放在大小适合的带螺旋盖内有垫圈、耐冷冻的样本采集管里，拧紧。容器外注明样本编号、种类、姓名及采样日期。

5.2 将密闭后的标本放入大小合适的塑料袋内密封，每袋装一份标本。

## 6、标本保存

---

用于病毒分离和核酸检测的标本应尽快进行检测,24小时内能检测的标本可置于4℃保存,24小时内无法检测的标本则应置于-70℃或以下保存。如无-70℃保存条件,则于-20℃冰箱暂存。血清可在4℃存放3天、-20℃以下长期保存。标本运送期间应避免反复冻融。标本应设立专库或专柜单独保存。

## **7、标本送检**

### **7.1 上送标本**

检测结果阳性或可疑的原始标本或分离物应及时送中国疾病预防控制中心复核和进一步检测;省级疾病预防控制机构实验室检测阴性,但有明确流行病学证据的病例的标本应送中国疾病预防控制中心进一步检测。

### **7.2 标本运送的生物安全要求**

按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院424号令)和《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定》(中华人民共和国卫生部第45号令)等有关规定执行。

### **7.3 标本送检的程序**

各省(区、市)需要向中国疾病预防控制中心送检标本的具体要求见《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定》(中华人民共和国卫生部第45号令),具体程序可参考《疑似人感染高致病性禽流感/不明原因肺炎病例标本送检、接收、检测和结果报告反馈工作流程》(中疾控疾发[2005]526号)。

## **二、一步法RT-PCR方法检测新型冠状病毒核酸标准操作程序**

### **1、目的**

规范一步法RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸的工作程序,保证实验结果的正确可靠

---

## 2、范围

适用于一步法RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸

## 3、职责

检测人员：负责按照本检测细则对被检样本进行检测

复核人员：负责对检测操作是否规范以及检测结果是否准确进行  
复核

部门负责人：负责对科室综合管理和检测报告的审核

## 4、样品接收和准备

4.1 核对被检样本姓名、性别、年龄、编号及检测项目等

4.2 待检样本的状态如有异常，需注明

4.3 待检样本应存放于-70℃

## 5、本方法检测项目为新型冠状病毒核酸测定(一步法RT-PCR 方法)

## 6、检测仪器设备和材料

6.1 PCR 仪

6.2 计时器

6.3 加样器（100 μ l，1000 μ l），准确度±2%

6.4 微型振荡器

6.5 一次性手套

6.6 含氯消毒剂

## 7、检测环境条件

实验应在20℃-25℃室温中进行

## 8、诊断试剂材料

8.1 引物：

引物（扩增片段大小为200bp）：

F-1: TGCTAAGAATAGAGCTCGCACTGTT

---

R-1: ACCCATAAGATGCGGATTATCAACA

8.2 QIAamp Viral RNA mini kit

8.3 PCR 反应管： 0.2 μl PCR 反应管。

8.4 DEPC 水

8. QIAGEN one-step RT-PCR kit

## 9、检测步骤

9.1 病毒核酸(RNA)的制备：

9.1.1 样本要求：咽拭子（或其他呼吸道样品）；全血或血清。

9.2 提取试剂准备（在使用前进行）：

9.2.1 Buffer AVL 工作液的制备

将试剂盒提供的Buffer AVL 液1ml 加入到1 管冻干的Carrier RNA中， 混合均匀， 彻底溶解Carrier RNA。在第1 次使用前将溶解的Carrier RNA 加入到1 瓶Buffer AVL 中， 制成Buffer AVL 工作液，保存于2-8℃（稳定性为6 个月）。在2-8℃条件下， Buffer AVL/Carrier RNA 混合物可能会析出沉淀， 可在使用前80℃温育使之融解。

9.2. 2 Buffer AW1 工作液的制备

试剂盒中Buffer AW1 以浓缩液的状态提供。第1 次使用前， 按照试剂瓶上的说明向其中加入规定量的无水乙醇制备成工作液。

BufferAW1 工作液在室温条件下可稳定保存1 年。

9.2. 3Buffer AW2 工作液的准备。

试剂盒中Buffer AW2 以浓缩液的状态提供。第1 次使用前， 按照试剂瓶上的说明向其中加入规定量的无水乙醇制备成工作液。

Buffer AW2 工作液在室温条件下可稳定保存1 年。

9.3 病毒核酸(RNA)提取步骤：

---

所有试剂在使用前应平衡至室温；所有离心步骤应在室温下进行。

9.3.1 取n 个1.5ml 灭菌离心管， 作好标记。n=样本数。

9.3.2. 每个离心管加560  $\mu$ l Buffer AVL 工作液。

9.3.3. 将140  $\mu$ l 待测样本及对照样本加到上述离心管中，振荡混匀15 秒，室温孵育9 分钟。

9.3.4. 短暂离心后加入560  $\mu$ L 无水乙醇，振荡混匀15 秒，再短暂离心。

9.3.5. 取步骤9.3.4.得到的混合物630  $\mu$  L，加入到QIAamp RNA 提取柱中（带有2ml 的集液管），盖上管盖，6000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.6. 更换新的集液管， 将9.3.4. 剩余的样本加入到QIAamp RNA提取柱中，盖上管盖，6000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.7. 更换新的集液管，打开管盖，加入500  $\mu$  L Buffer AW1 工作液。6000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.8. 更换新的集液管，打开管盖，加入500  $\mu$  L Buffer AW2 工作液。以20000 $\times$ g 离心3 分钟。

9.3.9. 更换新的集液管，以20000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.9. 将QIAamp RNA 提取柱置于新的1.5ml 离心管上，小心的打开管盖，加入60 $\mu$ l 洗脱液Buffer AVE，盖上管盖，室温条件下孵育1min，6000 $\times$ g 离心1 分钟，收集滤出液，做好标记，4℃保存备用。

9.4 一步法RT-PCR 检测：

9.4.1 一步法 RT-PCR 反应液的准备：每个待检样本反应液的组成为：

5X QIAGEN one-step RT-PCR buffer: 5  $\mu$  L

---

dNTP(10mM of each ) : 1  $\mu$  L

QIAGEN one-step enzyme mix: 1  $\mu$  L

引物 (5mM): 1  $\mu$  L (F1 与R1 各0.5  $\mu$  L) ,

加水至20  $\mu$  L

9.4.2 加样: 每反应管中加入核酸5  $\mu$  L, 盖紧管盖, 置于PCR 检测仪上。

9.4.3 扩增条件设定:

50 $^{\circ}$ C, 30min; 95 $^{\circ}$ C, 15min, 94 $^{\circ}$ C, 30s, 55 $^{\circ}$ C, 30s, 72 $^{\circ}$ C, 30s  
共40循环, 72 $^{\circ}$ C10min。

9.4.4 行2%琼脂糖胶, 每个样品上样5  $\mu$  L, 观察结果

## 10 结果判断

在琼脂糖胶可见200bp 处有明显条带

## 三、荧光定量实时PCR 方法检测2012 新型冠状病毒核酸标准操作程序

### 1、目的

规范荧光定量实时PCR 方法检测新型冠状病毒核酸的工作程序, 保证实验结果的正确可靠

### 2、范围

适用于荧光定量实时PCR 方法检测新型冠状病毒核酸

### 3、职责

检测人员: 负责按照本检测细则对被检样本进行检测

复核人员: 负责对检测操作是否规范以及检测结果是否准确进行  
复核

部门负责人: 负责对科室综合管理和检测报告的审核

### 4、样品接收和准备

---

4.1 核对被检样本姓名、性别、年龄、编号及检测项目等

4.2 待检样本的状态如有异常，需注明

4.3 待检样本应存放于-70℃

5、本方法检测项目为新型冠状病毒核酸测定(荧光定量实时PCR 方法)

## 6、检测仪器设备和材料

6.1 荧光PCR 检测仪（ABI7000）

6.2 计时器

6.3 加样器（100 μ l， 1000 μ l）， 准确度±2%

6.4 微型振荡器

6.5 一次性手套

6.6 含氯消毒剂

## 7、检测环境条件

实验应在20℃-25℃室温中进行

## 8、诊断试剂材料

8.1 引物：

引物（108bp）：

F-2 ACTGTTGCAGGCGTGCCATACTTAGCF

R-2 TAGTACCAATGACGCAAGTCGCTCC

探针：6' -6FAM CTAATCGCCAGTACCATCAG-

8.2 QIAamp Viral RNA mini kit

8.3 PCR 反应管：96 孔PCR 反应板和透明封膜或PCR 反应管和透明盖。

8.4 DEPC 水

8.5AgPath one-step RT-PCR kit

---

## 9、检测原理

Taqman 荧光定量技术是以Taqman 荧光探针为基础，Taqman 荧光探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个荧光发射基团和一个荧光淬灭基团。探针完整时，发射基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR 扩增时，Taq 酶的5'—3' 外切酶活性将探针酶切降解，使荧光发射基团和荧光淬灭基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与PCR 产物形成完全同步。从而实现定量。荧光的强度和放入的目的DNA量直接相关。荧光信号通过使用ABI Prism 7000 或7700 序列检测系统（Applied Biosystems）捕获，允许快速检测96 孔样品。该仪器在PCR 过程中通过分析每个循环作为扩增模板结果的荧光信号来确定目的模板的最初量。达到荧光检测水平花费的循环数越少，最初量越大。引物和探针必须杂交到目的序列上来扩增和发生切割。荧光信号只在探针的目的序列在PCR 中扩增的情况下生成。因为这些条件，所以不会检测到非特异性扩增。

## 10、检测步骤

### 10.1 病毒核酸(RNA)的制备：

10.1.1 样本要求：咽拭子（或其他呼吸道样品）；全血或血清。

### 10.2 提取试剂准备〈在使用前进行〉：

#### 10.2.1 Buffer AVL 工作液的制备

将试剂盒提供的Buffer AVL 液1ml 加入到1 管冻干的Carrier RNA中， 混合均匀， 彻底溶解Carrier RNA。在第1 次使用前将溶解的Carrier RNA 加入到1 瓶Buffer AVL 中， 制成Buffer AVL 工作液，保存于2-8℃（稳定性为6 个月）。在2-8℃条件下， Buffer AVL/Carrier RNA 混合物可能会析出沉淀， 可在使用前80℃温育使

---

之融解。

#### 10.2. 2 Buffer AW1 工作液的制备

试剂盒中Buffer AW1 以浓缩液的状态提供。第1 次使用前， 按照试剂瓶上的说明向其中加入规定量的无水乙醇制备成工作液。

Buffer AW1 工作液在室温条件下可稳定保存1 年。

#### 10.2. 3 Buffer AW2 工作液的准备。

试剂盒中Buffer AW2 以浓缩液的状态提供。第1 次使用前， 按照试剂瓶上的说明向其中加入规定量的无水乙醇制备成工作液。

Buffer AW2 工作液在室温条件下可稳定保存1 年。

#### 10.3 病毒核酸(RNA)提取步骤：

所有试剂在使用前应平衡至室温；所有离心步骤应在室温下进行。

10.3.1 取n 个1.5ml 灭菌离心管， 作好标记。n=样本数。

10.3.2. 每个离心管加560ul Buffer AVL 工作液。

10.3.3. 将140ul 待测样本及对照样本加到上述离心管中，振荡混匀15 秒， 室温孵育10 分钟。

10.3.4. 短暂离心后加入560  $\mu$ l 无水乙醇， 振荡混匀15 秒，再短暂离心。

10.3.5. 取步骤10.3.4. 得到的混合物630  $\mu$ l， 加入到QIAamp RNA 提取柱中（带有2ml 的集液管）， 盖上管盖，6000 $\times$ g 离心1 分钟。

10.3.6. 更换新的集液管， 将10.3.4. 剩余的样本加入到QIAamp RNA提取柱中， 盖上管盖，6000 $\times$ g 离心1 分钟。

10.3.7. 更换新的集液管， 打开管盖， 加入500ul Buffer AW1 工作液。6000 $\times$ g 离心1 分钟。

---

10.3.8. 更换新的集液管， 打开管盖， 加入500ul Buffer AW2 工作液。以20000×g 离心3 分钟。

10.3.9. 更换新的集液管， 以20000×g 离心1 分钟。

10.3.10. 将QIAamp RNA 提取柱置于新的1.5ml 离心管上， 小心的打开管盖， 加入60 μl 洗脱液Buffer AVE， 盖上管盖， 室温条件下孵育1min， 6000×g 离心1 分钟， 收集滤出液， 做好标记， 4℃保存备用。

10.4 荧光定量实时PCR 检测：

10.4.1 实时RT-PCR 反应液的准备：每个待检样本反应液的组成为：

2XRT-PCR buffer: 12.5 μl,

25XRT-PCR enzyme mix:2.5 μl,

引物 (5mM): 1 μl,

探针(5mM): 0.5 μl,

Detection enhancer: 1.67 μl

加水至20 μl

10.4.2 加样：每反应管中加入核酸5 μl， 盖紧管盖或封好透明膜， 置于PCR 检测仪上。

10.4.3 扩增条件设定：

45℃， 10min; 95℃， 10min; 95℃， 15s; 60℃， 1min; 共40 循环。

10.4.4 仪器检测通道选择：

使用ABI7000 荧光PCR 检测仪时选择Fam 荧光信号， 收集设在60℃。

具体设置方法请参照各仪器使用说明书。

---

#### 10.4.5 结果分析阈值设定：

使用ABI7000 荧光PCR 检测仪时荧光PCR 检测仪进行结果分析时，基线〈baseline〉取3-10 或6-15 个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点，也可根据仪器噪音情况调整。

#### 11、实时RT-PCR 反应系统的质量控制：

反应结果应同时符合以下3 个条件，否则试验结果无效。

11.1. 阴性对照无扩增，为阴性。

11.2. 强阳性对照 $C_t < 25$ 。

11.3. 临界阳性对照： $C_t < 35$ 。

#### 12、结果判断：

12.1 阴性：无 $C_t$  值或 $C_t$  为40。

12.2 阳性： $C_t$  值 $< 37$ ，可报告为阳性。

12.3.  $C_t$  值在37-40 之间的样本建议重做， 若重做结果 $C_t < 40$ ，则该样本判断为阳性， 否则为阴性。

### 四、巢式RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸标准操作程序

#### 1、目的

规范巢式RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸的工作程序，保证实验结果的正确可靠

#### 2、范围

适用于巢式RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸

#### 3、职责

检测人员：负责按照本检测细则对被检样本进行检测

复核人员：负责对检测操作是否规范以及检测结果是否准确进行复核

---

部门负责人：负责对科室综合管理和检测报告的审核

#### 4、样品接收和准备

4.1 核对被检样本姓名、性别、年龄、编号及检测项目等

4.2 待检样本的状态如有异常，需注明

4.3 待检样本应存放于-70℃

#### 5、本方法检测项目为新型冠状病毒核酸测定（巢式RT-PCR 方法）

#### 6、检测仪器设备和材料

6.1 PCR 仪

6.2 计时器

6.3 加样器（10 μl，100 μl），准确度±2%

6.4 微型振荡器

6.5 一次性手套

6.6 含氯消毒剂

#### 7、检测环境条件

实验应在20℃-25℃室温中进行

#### 8、诊断试剂材料

8.1 引物：

第一次PCR 引物（扩增片段大小为200bp）

F-1 TGCTAAGAATAGAGCTCGCACTGTT

R-1 ACCCATAAGATGCGGATTATCAACA

第二次PCR 引物（扩增片段大小为126bp）

F-1 TGCTAAGAATAGAGCTCGCACTGTT

R-2 TAGTACCAATGACGCAAGTCGCTCC

8.2 QIAamp Viral RNA mini kit

8.3 PCR 反应管： 0.2 μl PCR 反应管。

---

8.4 DEPC 水

8.5 QIAGEN one-step RT-PCR kit, Hotstar DNA polymerase

## 9、检测步骤

9.1 病毒核酸(RNA)的制备:

9.1.1 样本: 咽拭子(或其他呼吸道样品); 全血或血清。

9.2 提取试剂准备(在使用前进行):

9.2.1 Buffer AVL 工作液的制备

将试剂盒提供的Buffer AVL 液1ml 加入到1 管冻干的Carrier RNA中, 混合均匀, 彻底溶解Carrier RNA。在第1 次使用前将溶解的Carrier RNA 加入到1 瓶Buffer AVL 中, 制成Buffer AVL 工作液, 保存于2-8℃(稳定性为6 个月)。在2-8℃条件下, Buffer AVL/Carrier RNA 混合物可能会析出沉淀, 可在使用前80℃温育使之融解。

9.2. 2 Buffer AW1 工作液的制备

试剂盒中Buffer AW1 以浓缩液的状态提供。第1 次使用前, 按照试剂瓶上的说明向其中加入规定量的无水乙醇制备成工作液。

Buffer AW1 工作液在室温条件下可稳定保存1 年。

9.2. 3Buffer AW2 工作液的准备。

试剂盒中Buffer AW2 以浓缩液的状态提供。第1 次使用前, 按照试剂瓶上的说明向其中加入规定量的无水乙醇制备成工作液。

Buffer AW2 工作液在室温条件下可稳定保存1 年。

9.3 病毒核酸(RNA)提取步骤:

所有试剂在使用前应平衡至室温; 所有离心步骤应在室温下进行。

9.3.1 取n 个1.5ml 灭菌离心管, 作好标记。n=样本数。

---

9.3.2. 每个离心管加560  $\mu$ l Buffer AVL 工作液。

9.3.3. 将140  $\mu$ l 待测样本及对照样本加到上述离心管中，振荡混匀15 秒，室温孵育9 分钟。

9.3.4. 短暂离心后加入560  $\mu$ l 无水乙醇，振荡混匀15 秒，再短暂离心。

9.3.5. 取步骤9.3.4. 得到的混合物630  $\mu$ l，加入到QIAamp RNA 提取柱中（带有2ml 的集液管），盖上管盖，6000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.6. 更换新的集液管， 将9.3.4. 剩余的样本加入到QIAamp RNA

提取柱中，盖上管盖，6000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.7. 更换新的集液管，打开管盖，加入500  $\mu$ l Buffer AW1 工作液。6000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.8. 更换新的集液管，打开管盖，加入500  $\mu$ l Buffer AW2 工作液。以20000 $\times$ g 离心3 分钟。

9.3.9. 更换新的集液管，以20000 $\times$ g 离心1 分钟。

9.3.9. 将QIAamp RNA 提取柱置于新的1.5ml 离心管上， 小心的打开管盖，加入60 $\mu$ l 洗脱液Buffer AVE，盖上管盖，室温条件下孵育1min，6000 $\times$ g 离心1 分钟，收集滤出液，做好标记，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

9.4 巢式RT-PCR 检测：

9.4.1 第一次 RT-PCR 反应液的准备：每个待检样本反应液的组成为：

5X QIAGEN one-step RT-PCR buffer: 5  $\mu$ l

dNTP(10mM of each ): 1  $\mu$ l

---

QIAGEN one-step enzyme mix:  $1\ \mu\text{l}$

引物1(10mM):  $0.5\ \mu\text{l}$ ,

引物2(10mM):  $0.5\ \mu\text{l}$ ,

加水至 $20\ \mu\text{l}$

9.4.2 加样: 每反应管中加入核酸 $5\ \mu\text{l}$ , 盖紧管盖, 置于PCR 检测仪上。

9.4.3 扩增条件设定:

$50^{\circ}\text{C}$ , 30min;  $95^{\circ}\text{C}$ , 15min,  $94^{\circ}\text{C}$ , 30s,  $55^{\circ}\text{C}$ , 30s,  $72^{\circ}\text{C}$ , 30s 共40 循环,  $72^{\circ}\text{C}$ 10min。

9.4.4 第二次PCR 反应液的准备: 每个待检样本反应液的组成为:

10X buffer:  $2.5\ \mu\text{l}$

dNTP(10mM of each ):  $0.5\ \mu\text{l}$

Hotstar DNA polymerase:  $0.25\ \mu\text{l}$

引物1(10mM):  $0.5\ \mu\text{l}$ ,

引物2(10mM):  $0.5\ \mu\text{l}$ ,

加水至 $20\ \mu\text{l}$

9.4.2 加样: 每反应管中加入第一次PCR 扩增产物 $5\ \mu\text{l}$ , 盖紧管盖, 置于PCR 检测仪上。

9.4.3 扩增条件设定:

$95^{\circ}\text{C}$ , 15min,  $94^{\circ}\text{C}$ , 30s,  $55^{\circ}\text{C}$ , 30s,  $72^{\circ}\text{C}$ , 30s 共30 循环,  $72^{\circ}\text{C}$ 10min。

9.4.4 行2%琼脂糖胶, 每个样品上样 $5\ \mu\text{l}$ , 观察结果

## 10、结果判断

在琼脂糖胶可见120bp 处有明显条带, 为阳性。

---

鉴于我国尚没有中东呼吸综合征阳性标本，上述反应体系条件未进  
行试剂评估，供参考使用。

## 五、实验室生物安全

从事中东呼吸综合征检测的技术人员应经过生物安全培训，并取得相应资格和具备相应的实验技能，在检测的过程中根据风险评估要求采取生物安全防护。不同的标本检测生物安全级别要求如下。

8.1 标本的分装和核酸提取在生物安全二级实验室的生物安全柜内进行；病毒培养物的核酸提取必须在生物安全三级实验室的生物安全柜内进行。

8.2 标本的抗原快速检测应在生物安全二级实验室的生物安全柜内进行。

8.3 中东呼吸综合征的分离、鉴定和中和实验应在生物安全三级实验室里进行。

8.4 采用灭活抗原进行ELISA检测血清抗体时，要求在生物安全二级实验室内操作。采用微量中和试验进行血清抗体检测应在生物安全三级实验室操作。

8.5 阳性标本和分离物的保存及销毁应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》（国务院第 424 号令）执行。