

全国艾滋病检测技术规范

National Guideline for Detection of HIV/AIDS

（2020 年修订版）



中国疾病预防控制中心

二〇二〇年三月

全国艾滋病检测技术规范

National Guideline for Detection of HIV/AIDS

(2020 年修订版)

中国疾病预防控制中心

二〇二〇年三月

概述

《中国遏制与防治艾滋病“十三五”行动计划》要求我国艾滋病防治要实现“三个 90%”的防治目标，即诊断发现并知晓自身感染状况的感染者和病人的比例达 90% 以上，符合治疗条件的感染者和病人接受抗病毒治疗的比例达 90% 以上，接受抗病毒治疗的感染者和病人治疗成功率达 90% 以上。国家十部委联合下发的《遏制艾滋病传播实施方案（2019—2022 年）》也将三个 90% 作为艾滋病防治的具体指标，其中首先强调的是检出 90% 的 HIV 感染者。检测是艾滋病防治的第一步，扩大检测也是我国长期实施的艾滋病防治策略，只有及时诊断和发现 HIV 感染者，才能启动抗病毒治疗，减少 HIV 传播并改善病人的预后；只有在 HIV 病毒载量、CD4 细胞计数及 HIV 耐药及时检测的保障下，抗病毒治疗才能有效实施并取得预期效果。检测也是监测和血液安全的重要技术保障，评估疫情和防治效果、新发感染判断、血液安全筛查等都依赖检测结果。检测是艾滋病防治不可或缺的科学工具和技术支撑，做好检测工作对我国艾滋病防治具有非常重要的意义。

近年来，国内外艾滋病检测技术都有了长足进展，诊断试剂性能显著提高，新的检测策略不断出现并逐步推广应用。同时，防治工作的发展也给检测提出了新的挑战，例如，如何提高对急性期、HIV 抗体阴性核酸阳性感染者诊断能力；如何在使用暴露前后预防、急性期治疗等新型防治策略、病毒标志物应答受到干扰时进行准确诊断；如何对输入性抗体等新情况实施检测等等。《全国艾滋病检测技术规范》自 1997 年颁布第一版后，分别于 2004、2009 和 2015 年进行了更新，每次修订都立足于技术进步和防治需求，适时引入新方法和标准，提出新的应用策略，引领和推动了我国 HIV 检测技术的普及、提高及规范化应用，满足了防治工作需要。2020 年，中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心组织专家对《全国艾滋病检测技术规范》再次进行了修订，充分考虑了 HIV 检测技术和策略的进步及防治工作的发展，使之能够对我国艾滋病检测工作继续发挥引领和带动作用。

前 言

艾滋病在我国的流行已数十年，随着感染者和临床病人的不断增加、感染人群的变化，艾滋病检测工作量逐渐加大，对监测和检测的需求也不断增加，承担艾滋病检测的实验室已遍及全国各级医疗、疾病预防控制、采供血、妇幼保健机构，出入境检验检疫、军队等各个系统。为了尽早发现 HIV 感染者和艾滋病病人，及早提供咨询、治疗，同时为适应基层艾滋病检测工作需求，在新的形势下，根据《中国遏制与防治艾滋病“十三五”行动计划》、《遏制艾滋病传播实施方案（2019—2022 年）》等国家艾滋病防治的重要方针政策和十三五防治工作重点，在广泛征求各省、市疾病预防控制中心和医疗机构等专家意见的基础上，在国家卫健委相关部门的指导和支持下，艾滋病专家的参与下，中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心组织专家对《全国艾滋病检测技术规范（2015 年版）》进行了修改、增补和完善，先后组织了 4 轮专家讨论会，经过 2 轮征求意见和修改，编制出《全国艾滋病检测技术规范（2020 年版）》（以下简称《规范》）。

本《规范》修订工作立足于我国目前的检测状况，参考发达国家的现行指南，本着既满足目前艾滋病检测工作的实际需求，又体现检测技术发展的原则，主要对以下几个方面内容进行了修订、增补和完善：（1）新增了检测总流程图、检测样本类型、自我检测及传递检测流程、输入性抗体核酸检测及流程和 HIV-2 核酸检测；（2）优化了抗体检测流程和不确定结果的随访要求；（3）强化了核酸检测的诊断价值和生物安全；（4）完善了新发感染检测策略、核酸检测策略、婴幼儿诊断及各类检测报告。

所有附表的检测报告仅供实验室参考使用。

本《规范》由中国疾病预防控制中心批准，下发至全国艾滋病检测实验室及有关单位。本《规范》将为国家、相关部委下发的艾滋病防治工作各项政策法规的有效实施提供强有力的技术支持，并具体指导艾滋病检测实验室技术人员开展日常工作。

本《规范》起草单位：中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心。

本《规范》参加编写单位：中国人民解放军军事科学院军事医学研究院、上海市疾病预防控制中心、中国医科大学、云南省疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心

中心、河南省疾病预防控制中心、北京市红十字血液中心、国家卫生健康委临床检验中心、江苏省疾病预防控制中心、安徽省疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京地坛医院、首都医科大学附属北京佑安医院、北京市疾病预防控制中心、中华人民共和国北京海关、浙江省疾病预防控制中心。

本《规范》编写组人员：蒋岩、韩孟杰、汪宁、李敬云、钟平、尚红、邵一鸣、肖瑶、邢文革、姚均、潘品良、邱茂锋、金聪、吕毅、马艳玲、梁姝、王哲、葛红卫、王盈、王露楠、徐晓琴、吴建军、张福杰、吴昊、苏雪丽、廖玲洁、张绍福、张佳峰。

本《规范》技术统筹联系人：肖瑶。

本《规范》自发布之日起实施，同时终止《全国艾滋病检测技术规范(2015年版)》。

本《规范》适用于全国艾滋病检测实验室。

本《规范》解释权属于中国疾病预防控制中心。

致谢：感谢世界卫生组织驻华代表处、中华预防医学会在《规范》修订过程中给予技术和人力等方面的支持。

目 录

第一章 样本的采集和处理	1
1 范围	1
2 样本种类及相应的用途	1
3 操作步骤	1
3.1 采样前准备	1
3.2 样本的采集和处理	2
3.3 样本的保存	3
3.4 样本的运送	4
3.5 样本的接收	4
参考文献	5
第二章 HIV 抗体抗原检测	6
1 范围	6
2 HIV 抗体抗原检测实验室要求	6
3 HIV 抗体抗原检测目的和要点	6
3.1 HIV 抗体检测的目的	6
3.2 HIV 抗原检测的目的	6
3.3 HIV 抗体抗原检测的要点	6
4 常规 HIV 抗体或 HIV 抗体抗原联合检测方法	7
4.1 试剂和样本	7
4.2 方法	7
5 常规 HIV-1p24 抗原检测方法	9
5.1 试剂	9
5.2 样本	9
5.3 方法	9
6 结果报告	10
6.1 HIV 筛查检测报告	10
6.2 HIV 抗体确证检测报告	10
6.3 HIV-1p24 抗原检测报告	11

7 输入性抗体的检测	11
8 质量控制	11
参考文献	11
第三章 基于抗体的 HIV-1 新发感染检测	13
1 范围	13
2 实验室要求	13
3 目的和应用	13
4 新发感染检测方法和检测要点	13
4.1 检测方法	13
4.2 检测试剂	14
4.3 检测样本	14
4.4 实验操作、结果处理和解释	15
5 质量控制	15
5.1 人员培训	15
5.2 样本质控	15
5.3 试剂质控	16
5.4 实验过程质控	16
参考文献	16
第四章 HIV-1 核酸检测	18
1 范围	18
2 核酸检测的意义	18
2.1 感染诊断	18
2.2 血液筛查	18
2.3 抗病毒治疗效果监测	18
3 HIV 核酸检测实验室要求	19
3.1 实验室的设计及工作基本原则	19
3.2 实验室人员和要求	19
3.3 实验室生物安全	19
4 HIV-1 核酸检测方法及程序	19
4.1 HIV-1 核酸定性检测	19

4.2 HIV-1 核酸定量检测.....	20
4.3 集合核酸定性检测 (Pooling PCR)	21
4.4 HIV-1 核酸即时检测(molecular point-of-care Testing, POCT).....	22
5 质量保证和质量控制.....	22
5.1 实验室分区和环境.....	22
5.2 仪器设备质量控制.....	22
5.3 检测过程质量控制.....	23
5.4 外部质量控制.....	23
参考文献.....	23
第五章 艾滋病病毒感染检测策略及流程.....	24
1 范围	24
2 定义.....	24
3 艾滋病实验室检测策略	24
3.1 疫情监测相关的检测策略、流程及结果报告.....	24
3.2 临床诊断相关的检测策略、流程及结果报告.....	25
3.3 血液筛查相关的检测策略及结果报告.....	34
3.4 婴儿 HIV-1 感染早期诊断相关的检测流程及结果报告.....	36
4 艾滋病检测现场应用策略.....	38
4.1 自愿咨询与检测策略.....	38
4.2 医务人员主动提供检测和咨询.....	38
4.3 自我检测策略.....	38
参考文献.....	39
第六章 HIV-1 基因型耐药检测.....	41
1 范围.....	41
2 HIV-1 基因型耐药检测的意义.....	41
2.1 个体耐药检测.....	41
2.2 群体耐药监测.....	41
3 HIV-1 基因型耐药检测实验室要求.....	42
3.1 实验室功能分区.....	42
3.2 实验室人员和要求.....	42

3.3 设施和设备.....	42
4 HIV-1 基因型耐药检测方法.....	42
4.1 样本.....	42
4.2 检测原理.....	42
4.3 检测方法.....	42
4.4 耐药分析.....	43
4.5 结果报告和解释.....	43
5 质量保证与质量控制.....	44
5.1 室内质控.....	44
5.1.1 检测过程质量控制.....	44
5.2 外部质控.....	44
参考文献.....	45
第七章 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测	46
1 范围.....	46
2 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的意义	46
2.1 HIV 感染免疫状态和临床分期.....	46
2.2 疾病进展监测.....	46
2.3 机会性感染的风险评估.....	46
2.4 抗病毒治疗适应症选择及疗效评价.....	46
2.5 免疫重建监测.....	47
3 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测实验室要求.....	47
3.1 人员.....	47
3.2 功能分区.....	47
3.3 设施和设备.....	47
4 常规 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的方法和程序	48
4.1 样本采集、运输和接收.....	48
4.2 方法.....	48
4.3 试剂.....	50
4.4 实验资料的记录.....	50
4.5 结果报告.....	50

5 质量控制	50
参考文献	52
第八章 HIV-1 的分离培养	53
1 范围	53
2 HIV-1 分离培养的意义	53
3 实验室要求	53
3.1 实验室	53
3.2 设备	53
3.3 样本及试剂	53
3.4 耗材	53
4 HIV-1 分离培养的方法及程序	53
4.1 样本	53
4.2 靶细胞制备	53
4.3 建立共培养	53
4.4 监测病毒生长	54
4.5 病毒鉴定	54
4.6 判定结果和解释	54
5 质量控制	54
6 生物安全	54
参考文献	55
附表 1 HIV 筛查检测报告	56
附表 2 HIV 抗体确证检测报告	57
附表 3 HIV-1 核酸检测报告	58
附表 4 HIV 抗体确证检测报告（特定条件）	59
附表 5 CD4+CD8+T 淋巴细胞检测报告	60
附表 6 HIV-1 耐药基因型检测报告	61
附表 7 婴儿艾滋病病毒感染早期诊断检测报告	62
附件 1 输入性 HIV 抗体检测及流程	63
1 范围	63
2 检测的意义	63

3 实验室要求.....	63
4 检测方法及程序.....	63
5 结果解释和报告.....	64
6 质量控制.....	65
参考文献.....	65
附件 2 实验室室内质量控制	66
1 质量控制的基本原理.....	66
2 艾滋病检测实验室室内质量控制.....	69
2.1 酶免或发光法检测的室内质量控制.....	69
2.2 快速法检测质控.....	71
附件 3 HIV-2 核酸检测.....	72
1 范围.....	72
2 检测的意义.....	72
2.1 HIV-2 感染诊断.....	72
2.2 抗病毒治疗疗效监测.....	72
3 实验室要求.....	72
4 检测方法.....	72
4.1 样本.....	73
4.2 核酸提取.....	73
4.3 核酸检测.....	73
5 结果判定.....	75
5.1 商品化试剂盒.....	75
5.2 实验室自建方法.....	75
6 质量控制.....	76
参考文献.....	76

第一章 样本的采集和处理

1 范围

本章规定了用于人免疫缺陷病毒（HIV）检测的全血、血清、血浆、淋巴细胞富集液、口腔黏膜渗出液、尿液、干血斑和血液制品原料等样本的采集和处理方法，适用于 HIV 抗体、抗原、核酸、基因亚型和耐药检测、CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞数测定及 HIV 分离培养。

2 样本种类及相应的用途

2.1 全血、血清、血浆、口腔黏膜渗出液、尿液、干血斑以及血液制品原料样本可用于 HIV 抗体检测。

2.2 全血、血清、血浆、病毒培养上清液以及血液制品原料样本可用于 HIV 抗原检测。

2.3 抗凝全血可用于 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞数测定。

2.4 血浆、干血斑可用于 HIV-1 病毒载量、基因亚型和基因型耐药检测。

2.5 全血、淋巴细胞富集液、外周血单个核细胞（PBMC）、血浆以及血液制品原料可用于 HIV 核酸定性与定量、基因型检测和 HIV-1 分离培养。

3 操作步骤

3.1 采样前准备

根据检测项目的具体要求，确定采集样本的种类、处理、保存及运输的时限和方法，按照临床采血技术要求操作，遵守生物安全相关要求。采样前应检查所需物品是否已备齐，是否在有效期内，有无破损，是否足量，特别应检查受检者信息与样本容器表面的标记是否一致，并注明样本采集时间及唯一编码。采集血液样本宜选择合适的室内（外）空间，受检者坐（卧）于合适的位置。准备采血用具、皮肤消毒用品、采血管及试管架、硬质废弃物容器等。口腔黏膜渗出液样本应使用试剂盒提供的专用采样工具，尿液样本建议使用可保持尿液稳定的专用采尿管。收集血液制品原料样本时，应详细记录制品的来源、生产日期、批号、使用者等信息。

3.1.1 样本的编码和记录

3.1.2 应制定样本编码的标准操作程序（SOP），规定样本编码的原则和方法，保证每一份样本具有唯一性编码（编号）。

3.1.3 采血前，先对试管或滤纸进行标记，核对后编码。要将标签贴在试管的侧面，推荐使用预先印制好的、专门用于冷冻储存的耐低温标签。干血斑滤纸应使用具有资质的产品。

3.1.4 口腔黏膜渗出液样本应采集口腔黏膜渗出液，不是唾液。

3.1.5 尿液样本准备好带有唯一编码的采尿管或者尿杯，并保留唯一编码。

3.1.6 应使用专门的样本记录本或登记表记录样本，同时录入电脑保存。

3.2 样本的采集和处理

3.2.1 血液

3.2.1.1 抗凝全血：消毒局部皮肤，用加有抗凝剂（EDTA 钠盐或钾盐、枸橼酸钠、肝素钠）的真空采血管抽取适量静脉血，或用一次性注射器抽取静脉血，转移至加有抗凝剂的试管中，轻轻颠倒混匀 10-15 次，备用。

3.2.1.2 末梢全血：消毒局部皮肤（成人和 1 岁以上儿童可选择耳垂、中指、无名指或食指，1 岁以下儿童采用足跟部）。用采血针刺破皮肤，用无菌纱布擦掉第一滴血。收集滴出的血液，备用。

3.2.1.3 血浆：根据检测需要，选择含适宜抗凝剂的采血管，按照采血管说明采集静脉血，分离血浆；或将采集的抗凝全血 1500~3000r/min 离心 15 分钟，上层即为血浆，吸出置于合适的容器中，备用。

3.2.1.4 血清：根据检测需要，按照采血管说明采集静脉血，分离血清；或用不含抗凝剂的真空采血管抽取适量静脉血，或用一次性注射器抽取静脉血，转移至无抗凝剂或含促凝剂的试管中放置 1~2 小时，待血液凝固、血块收缩后再用 1500~3000r/min 离心 15 分钟，吸出血清，置于合适的容器中，备用。

3.2.1.5 淋巴细胞富集液：将采集的抗凝全血 1500~3000r/min 离心 15 分钟，吸取血浆层下的淋巴细胞富集液，置于合适的容器中，备用。

3.2.1.6 外周血单个核细胞（PBMC）：使用淋巴细胞分离液，进行密度梯度离心，吸出 PBMC 层，置于合适的容器中，备用。

3.2.1.7 抗凝剂的选择：根据检测要求选用适当的抗凝剂，如 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞数测定可选用 EDTA 钾盐或钠盐、枸橼酸钠、肝素钠（如果血液不用于核酸检测）；

HIV-1 分离、核酸定性/定量检测可选用 EDTA 钾盐或钠盐或枸橼酸钠。

3.2.1.8 样本采集后处理、保存、运输的时限和条件，因不同的检测项目而异，应参见相应检测项目要求。

3.2.1.9 采血完成后的穿刺针头必须丢弃于尖锐危险品容器内，妥善处理，防止发生职业暴露。

3.2.2 干血斑

3.2.2.1 根据需要，可将采集的各种血液样本制备成干血斑，用于检测。最常用的是用抗凝全血、末梢全血和血浆制备干血斑。

3.2.2.2 用移液器从样本管中吸取 100 μ L 抗凝全血（或血浆），对准滤纸印圈的中心处，将样本滴在滤纸上；或将穿刺后自皮肤伤口流出的末梢全血直接滴加在滤纸印圈的中心处。

3.2.2.3 根据需要，连续在数个印圈上滴加样本。

3.2.2.4 于室温下自然干燥至少 4 小时（潮湿气候下至少干燥 24 小时），不要加热或堆叠血斑，勿与其它界面接触。

3.2.2.5 血斑充分干燥后，将其放入密封袋中，每张干血斑单独保存，避免血斑之间的相互污染，同时放入干燥剂及湿度指示卡，密封包装，保存备用。

3.2.3 尿液和口腔黏膜渗出液

3.2.3.1 尿液：按照试剂盒说明书要求采集样本。尿液样本可采集随机尿，女性经期应取中段尿。

3.2.3.2 口腔黏膜渗出液：按照试剂盒说明书要求采集样本。

3.3 样本的保存

3.3.1 用于抗体和抗原检测的血清或血浆样本，短期（1 周）内进行检测的可存放于 2~8℃，一周以上应存放于-20℃以下。

3.3.2 用于核酸检测的血浆和血细胞样本，4 天内进行检测的可存放于 2-8℃；3 个月以内应存放于-20℃以下；3 个月以上应置于-70℃以下保存。

3.3.3 口腔黏膜渗出液样本应即刻使用，需要保存应以产品说明书为准。尿液快速检测样本保存条件以产品说明书为准。

3.3.4 尿液样本，使用专用采尿管，室温下可保存 2 周；三个月之内存放宜在 2~8℃；长期保存（三个月以上）的样本冻存条件、是否添加防腐剂等以产品说明书为准。

3.3.5 用于 CD4+T 淋巴细胞检测的全血样本，室温保存，时间不超过 48 小时。如

果用 CD45 设门，样本保存不超过 72 小时。

3.3.6 筛查结果为阳性的样本应及时进行补充试验；筛查结果为阴性的样本，可根据具体需要决定保存时间，建议至少保存 1 个月。艾滋病检测确证实验室收到的筛查阳性样本，无论补充试验结果如何，均应保存剩余样本，保存时间根据需要确定，建议至少保存 3 年，特殊用途或专项项目的样本根据具体要求确定保存时间。补充试验结果为阳性的样本按照国家生物样本管理的有关规定执行。

3.4 样本的运送

3.4.1 全血、血浆的运送应符合生物安全要求，参照《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》（卫生部第45号令, 2006年2月1日执行）。

3.4.2 血液样本运送时应采用三层容器对样本进行包装，随样本应附有与样本唯一性编码相对应的送检单。送检单应标明受检者姓名、样本种类等信息，并应放置在第二层和第三层容器之间。

3.4.2.1 第一层容器：直接装样本，应防渗漏。样本应置于带盖的试管内，试管上应有明显的标记，标明样本的唯一性编码或受检者姓名、种类和采集时间。在试管的周围应垫有缓冲吸水材料，以免碰碎。

3.4.2.2 第二层容器：容纳并保护第一层容器，可以装若干个第一层容器。要求不易破碎、带盖、防渗漏、容器的材料要易于消毒处理。

3.4.2.3 第三层容器：容纳并保护第二层容器的运输用外层包装箱。外面要贴上醒目的标签，注明数量、收样和发件人及联系方式，同时要注明“小心轻放、防止日晒、小心水浸、防止重压、禁止倒立”等字样，还应易于消毒。

3.4.2.4 用于抗体检测的血清和血浆样本应在冻存条件下运送。用于 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞测定的样本应在室温下（18~25℃）运送。用于病毒载量检测的样本应在 -20℃ 以下运输。干血斑和尿液样本应在室温下（18~25℃）运送，可通过邮寄方式运送。血液制品样本的运送按照血液制品有关使用说明执行。

3.4.2.5 运送样本必须有记录。

3.5 样本的接收

3.5.1 样本包裹必须在具有处理感染性材料条件的实验室内、由经过培训的工作人员打开，打开包裹时应穿戴防护衣、戴手套、口罩和防护眼镜，在生物安全柜中打开，用后的包裹应及时进行消毒。

3.5.2 核对样本与送检单，检查样本管有无破损和溢漏。如发现溢漏应立即将尚存

留的样本移出，消毒样本管和盛器，同时报告实验室负责人和上一级实验室技术人员。

3.5.3 检查样本的状况，记录血液样本有无严重溶血、微生物污染、血脂过多以及黄疸等情况。记录干血斑和尿液样本包装是否完整，如果污染过重或者不符合接收要求，应将样本安全废弃。并立即将样本情况通知送样人，要求重新采集样本。

3.5.4 接收样本时应填写样本接收单。

参考文献

1. 《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》中华人民共和国卫生行业标准 WS-293-2019。
2. Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers, Sex Transm Dis. December 2017; 44(12):739-746.
3. Consolidated Guidelines on HIV Testing Services. WHO July 2015.
4. 《HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南》，中国疾病预防控制中心，2013 年版。
5. 《HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南》，中国疾病预防控制中心，2013 年版。
6. 《艾滋病病毒感染者及艾滋病患者 CD4+T 淋巴细胞检测质量及保证指南》中国疾病预防控制中心，2013 年版。
7. 《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》，卫生部第 45 号令，2006 年 2 月 1 日。

第二章 HIV 抗体抗原检测

1 范围

本章规定了 HIV 抗体抗原检测的实验室要求、目的和要点、检测方法、结果报告及质量控制。适用于各级各类医疗、疾病预防控制、检验检疫、采供血及卫生保健等机构的艾滋病检测实验室。

2 HIV 抗体抗原检测实验室要求

应符合国家对实验室生物安全的有关要求。

实验室的质量控制按本规范相关章节规定执行。

3 HIV 抗体抗原检测目的和要点

3.1 HIV 抗体检测的目的

3.1.1 HIV 抗体检测可用于诊断、血液筛查、监测等。

3.1.2 以诊断为目的的检测是为了确定个体 HIV 感染状况，包括临床检测、自愿咨询检测、根据需要进行的体检等。

3.1.3 以血液筛查为目的的检测是为了防止输血传播 HIV，包括献血/浆者筛查和原料血浆筛查。

3.1.4 以监测为目的的检测是为了解不同人群 HIV 感染率及其变化趋势，包括各类高危人群、重点人群和一般人群。

3.2 HIV 抗原检测的目的

3.2.1 HIV-1 感染窗口期、HIV-1 抗体不确定或 HIV-1 阳性母亲所生婴儿的鉴别诊断。

3.2.2 第四代 HIV 检测试剂（抗体抗原检测试剂）阳性结果的辅助诊断。

3.2.3 HIV-1 分离培养、病毒复制状况的监测。

3.2.4 HIV 疫苗临床试验受试者 HIV 感染的鉴别诊断。

3.3 HIV 抗体抗原检测的要点

3.3.1 根据目的选择检测方法及检测策略。

3.3.2 严格遵守实验室标准操作程序（SOP）。

3.3.3 结果判定以试剂盒说明书为标准。

3.3.4 筛查试验呈反应性，需做补充试验；筛查试验无反应，不应做抗体确证试验。

3.3.5 对筛查及补充试验对象均应做好检测前后咨询工作。

4 常规 HIV 抗体或 HIV 抗体抗原联合检测方法

4.1 试剂和样本

必须是经国家药品监督管理局注册、在有效期内的试剂。推荐使用临床质量评估敏感性和特异性高的方法及试剂。

根据试剂盒说明书选用合适的样本。现常用的样本类型包括血清、血浆、全血、干血斑、口腔黏膜渗出液和尿液。

4.2 方法

4.2.1 筛查试验

4.2.1.1 酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunoassay, ELISA)

这类试验可使用血液（包含血清、血浆和干血斑）、尿液样本，既可检测 HIV 抗体，也可联合检测 HIV 抗体抗原（同时检测血液中 HIV-1p24 抗原和 HIV-1/2 抗体）。HIV 抗原/抗体包被于固相载体，加入待检样本和酶标记的 HIV 抗原/抗体，加底物显色，用酶标仪测定结果。有效试验的阴性和阳性对照必须符合试剂盒说明书规定。

4.2.1.2 化学发光或免疫荧光试验 (Chemiluminescence Immunoassay/Immunofluorescence Assay, CLIA/IFA)

这类试验采用发光或荧光底物，可使用血液（包含血清和血浆）样本，既可检测抗体，也可联合检测抗体抗原（同时检测血液中 HIV-1p24 抗原和 HIV-1/2 抗体）。HIV 抗原/抗体包被于固相载体，加入待检样本和酶或荧光标记的 HIV 抗原/抗体，加发光或荧光底物，用发光或荧光仪测定结果。有效试验的阴性和阳性对照必须符合试剂盒说明书规定。

4.2.1.3 快速检测 (Rapid Test, RT) 及其它试验

这类试验可使用血液、尿液、口腔黏膜渗出液等类型样本，包括检测抗体和同时检测抗体和抗原，操作简便快速，适用于应急检测、门诊急诊检测、自愿咨询检测 (VCT) 及检测点等，获得资质的自我检测快速试剂适用于个体自助检测。一般可在 10~30 分钟内得出结果。

免疫层析试验：以硝酸纤维膜为载体，HIV 抗原线状固定在膜上，待检样本沿着固相载体迁移，阳性结果在膜上抗原部位显示出有色条带。有效试验的质控带必须显

色。反应时间在 30 分钟以内。抗体抗原快速检测法是待检样本中的 HIV 抗体、HIV-1 p24 抗原分别与样本垫中的 HIV-1/HIV-2 抗原、HIV-1 p24 单克隆抗体结合形成复合物，在毛细作用下沿着硝酸纤维膜向上移动，至相关抗体、抗原包被区域后，分别与之结合，组成有色复合物线条。质控线用于检测过程质量控制，肉眼判读检测结果。

明胶颗粒凝集试验（Particle Agglutination Test, PA）：是 HIV 抗体检测的一种简便方法。将 HIV 抗原致敏的明胶颗粒与待检样本作用。当待检样本含有 HIV 抗体时，明胶颗粒与抗体发生凝集反应，根据凝集情况判读结果。PA 试剂有两种：同时检测 HIV-1 和 HIV-2 抗体以及分别检测 HIV-1 和 HIV-2 抗体。有效试验的阴性和阳性对照需符合试剂盒说明书的规定。

免疫渗滤试验：斑点 ELISA 和斑点免疫胶体金（或胶体硒）快速试验均以硝酸纤维膜为载体，HIV 抗原点状或线状固定在膜上，加待检样本，利用微孔滤膜的可滤过性，使抗体抗原反应。阳性结果在膜上抗原部位显示出有色斑点或条带。反应时间在 10 分钟以内。有效试验的质控点必须显色。

4.2.2 抗体确证试验

4.2.2.1 免疫印迹试验（Western Blot, WB）

WB 可使用血清、血浆和干血斑样本，采用间接法检测样本中的抗 HIV-1/HIV-2 特异性抗体。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳把分子量大小不等的 HIV-1 蛋白分离开来，然后再把这些分离的不同蛋白带转移到硝酸纤维素膜上（或 PVDF 膜）。将此膜切割成条状，每一膜条上均含有经电泳分离过的 HIV 抗原。待测样本经适当稀释后，加至硝酸纤维素膜上，恒温振荡，使其充分接触反应，血清中若含有 HIV 抗体，就会与膜条上抗原带相结合。加入抗人-IgG 酶结合物和底物后，根据出现条带情况，按照试剂盒说明书的判定标准，判断待测样本为 HIV 抗体阳性、阴性或不确定。

4.2.2.2 重组/线性免疫印迹试验（Recombination immunoblot assay/Line Immunoassay, RIBA/LIA）

RIBA/LIA 可使用血清、血浆和干血斑样本，采用间接法检测样本中的 HIV-1/HIV-2 特异性抗体。试剂盒的膜条上包被有 HIV-1/HIV-2 不同的重组抗原或合成多肽抗原，加入待测样本后，其中的相应抗体与抗原发生特异性的免疫反应，随后加入酶标记抗人 IgG（碱性磷酸酶标记）与 HIV 特异性 IgG 抗体相结合，加入显色底物后，在碱性磷酸酶的催化下，特异性抗体的结合部位出现肉眼可见的条带，按照试剂盒说明书判定标准，判断待测样本为 HIV 抗体阳性、阴性或不确定。

5 常规 HIV-1p24 抗原检测方法

原理一般是抗体夹心法，包括酶联免疫吸附试验（ELISA 法）、酶联荧光分析法（ELFA）、电化学发光法（ECLIA）等。

5.1 试剂：应使用经国家药品监督管理局注册的试剂。

5.2 样本：血清、血浆或病毒培养上清液。

5.3 方法

5.3.1 定性检测

5.3.1.1 筛查试验

(1) 酶联免疫吸附实验（ELISA）：HIV-1p24 抗原的抗体包被固相反应孔（管）的底部，待测样本中 p24 抗原与包被抗体形成抗体抗原复合物，再加入酶（HRP）标记的 p24 抗体与抗原结合，加底物显色，在酶标仪上读取结果。有效试验的阴性和阳性对照必须符合试剂盒说明书规定。

(2) 酶联荧光分析法（ELFA）：待测样本中的 p24 抗原与包被在固相孔（管）内的 p24 抗体结合，并被生物素标记的 p24 抗体识别。经过碱性磷酸酶复合物孵育后加底物，酶复合物催化底物水解成荧光产物，此荧光可在 450nm 波长处检测。对每份样本的固相孔（管）测量两次，第一次是加入底物前的背景读数，第二次是酶复合物催化底物水解后的读数。仪器自动分析计算相对荧光值（RFV）并自动报告判读结果。有效试验的阴性和阳性对照必须符合试剂盒规定。

(3) 电化学发光法（ECLIA）：待测样本中的 p24 抗原与包被抗体的磁性微粒和发光剂标记的 p24 抗体在反应管中温育，形成磁性微珠包被抗体-抗原-发光剂标记抗体复合物。将复合物吸入流动室用 TPA（tripropylamine 三丙胺）缓冲液冲洗，流经电极表面时，结合了的磁性微珠被电极下的磁铁吸附，而游离的磁性微珠及发光剂标记抗体被冲走。同时在电极加电压，启动电化学发光反应，使发光试剂标记物和 TPA 在电极表面进行电子转移，产生电化学发光。仪器根据发光值（COI）判读结

筛查试验依据试剂盒说明书提供的标准，判断有反应或无反应。

5.3.1.2 中和试验

中和试验使用与 HIV-1p24 抗原筛查试验相同的方法，主要是 HIV-1p24 抗原检测的补充试验（也可做 HIV-1RNA 的定性或定量检测），以排除 HIV-1p24 抗原筛查试验的假阳性。

中和试验包括了酶联免疫吸附实验（ELISA 法）、酶联荧光分析法（ELFA）和电化学发光法（ECLIA）。其原理是待检样本先与中和剂（p24 抗原的抗体）共同孵育，如果样本中存在 p24 抗原，中和抗体将与之结合形成复合物，而不能与固相载体上的捕获抗体结合。根据试剂盒说明书提供的方法计算中和率，一般判定原则是如果中和率大于 50%，认为样本中的 p24 抗原是真阳性；如果中和率小于 50%，认为 p24 抗原的反应性可能是假阳性，需要做 RNA 检测或随访做进一步确证。

5.3.2 HIV-1p24 抗原的定量检测

将 p24 抗原的标准物质稀释成包含 0.0 和 125pg/ml 或 0.0 和 125IU/ml 两个浓度在内的 6 个不同浓度的系列标准，进行检测。横坐标为 p24 抗原的浓度（pg/ml 或 IU/ml），纵坐标为 OD 值（酶联荧光分析法为 RFV 值、电化学发光法为 COI 值），绘制出标准曲线。测出未知样本的反应值（OD 值、或 RFV 值、或 COI 值）以后，可在标准曲线上查出抗原的浓度。如果未知样本的反应值超出标准曲线上最高抗原浓度的反应值，则需用正常人血清稀释样本后再行检测。

自动化检测试剂及其配套的仪器，可根据储存于仪器中的标准曲线自动计算反应值并自动报告 p24 抗原的浓度（pg/ml 或 IU/ml）。

6 结果报告

6.1 HIV 筛查检测报告

HIV 筛查检测报告使用附表 1（HIV 筛查检测报告）。筛查试验无反应，报告为“HIV 抗体阴性”。筛查试验有反应，必须进行复检（使用原有试剂双孔/双份检测或使用原有试剂加另一种试剂检测）：两次均无反应，报告为“HIV 抗体阴性”；两次均有反应，或一个有反应一个无反应，需进一步进行“补充试验”（补充试验及其结果报告见第五章 3.2.3）；复检试验根据检测方法，可报告为“HIV 感染待确定”、“HIV 抗体待确定”或“HIV 抗原待确定”，不能出具阳性报告。

HIV 抗体筛查检测报告需由检测者和签发者签字。

6.2 HIV 抗体确证检测报告

6.2.1 WB 及 RIBA/LIA 报告

HIV 抗体 WB 及 RIBA/LIA 检测报告使用附表 2（HIV 抗体确证检测报告）。根据检测结果及试剂盒说明书判断和解释结果。HIV 抗体确证检测报告应在收到样本后的 5 个工作日内发出。

(1) 符合 HIV-1 抗体阳性判断标准，报告“HIV-1 抗体阳性”，并按规定做好检测后咨询和疫情报告。符合 HIV-2 抗体阳性判断标准，报告“HIV-2 抗体阳性”，并按规定做好检测后咨询和疫情报告。

(2) 符合 HIV-1 抗体阴性判断标准，报告“HIV-1 抗体阴性”。如疑似窗口期感染，建议进一步做 HIV-1 核酸检测或 2-4 周后复检。

(3) 符合 HIV-1 抗体不确定判断标准，报告“HIV-1 抗体不确定”，进一步做核酸检测，或 2-4 周后复检，根据复检结果进行判断。

(4) HIV 抗体确证检测报告应在收到样本后的 5 个工作日内发出。

6.3 HIV-1p24 抗原检测报告

应按照试剂盒说明书报告和解释结果。

6.3.1 对于定性检测，HIV-1 p24 抗原筛查试验有反应的样本，必须经过中和试验确证以后才能判断阳性或阴性。

6.3.2 HIV-1 p24 抗原阳性仅作为 HIV 感染的辅助诊断依据。

6.3.3 HIV-1 p24 抗原阴性结果不能排除 HIV 感染。

7 输入性抗体的检测

输入性抗体检测，指人体输入 HIV 抗体阳性的血浆或其他血液成分、免疫球蛋白或其他血液制品后，对接受者、提供者和制品的检测，包括抗体和核酸检测，检测技术及质控遵循本规范中抗体和核酸检测的相关要求。根据检测结果及流行病学调查结果综合判断是否输入了 HIV 抗体、输入性 HIV 抗体在体内的动态变化、以及是否可检出核酸、是否发生了 HIV 感染等。输入性 HIV 抗体和核酸检测及流程见附件 1。

8 质量控制

质量控制是指为确保实验检测工作正常进行而在每次实验检测过程中采取的各种措施。实施质量控制是为了保证检测的结果可信，具体是将质控品和待检测样本一起检测，通过对质控品检测结果的分析，了解实验条件是否正常，判定本次实验结果是否有效。具体方法见附件 2。

参考文献

1. 《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》中华人民共和国卫生行业标准，

- WS293-2019) 。
2. Eleanor R. Gray, Robert Bain, Olivia Varsaneux et al:p24 revisited:a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis,AIDS 2018, 32:2089-2102.
 3. Niel Constantine,HIV Viral Antigen Assays, HIV InSite Knowledge Base Chapter, September 2001,<http://hivinsite.ucsf.edu>.
 4. NIAIDVirologyManualfor HIV Laboratory, NIH Publication, Jan 1997 No. 97-3828.

第三章 基于抗体的 HIV-1 新发感染检测

1 范围

本章规定了基于抗体的 HIV-1 新发感染检测的实验室要求、目的和应用、检测方法和要点、结果处理和解释及质量控制。适用于开展 HIV-1 新发感染检测的各类实验室。

2 实验室要求

接受过 HIV-1 新发感染检测培训并考核合格的艾滋病检测实验室，方可开展本项检测。进行新发感染检测的实验室必须参加中国疾控中心艾防中心组织的能力验证，考核不合格实验室需仔细分析原因，进行纠正后再次进行考核，合格后方可继续开展有关检测工作。

3 目的和应用

HIV-1 新发感染检测用于区分新近感染者和长期感染者，新近感染通常指感染一年以内。HIV-1 新发感染检测可用于估计国家和地区 HIV 新发感染率、特定人群的 HIV 新发感染率、以及监测哨点的新发感染率，为分析艾滋病流行特点和变化趋势提供科学依据。此外，新发感染检测还可用于评估干预措施的效果、分析新发感染的热点地区和热点人群、以及指导对新近感染者进行溯源等防控工作。

4 新发感染检测方法和检测要点

4.1 检测方法

目前国内外用于新发感染检测的方法，主要是 HIV-1 限制性抗原亲和力酶联免疫方法（HIV-1LAg - Avidityenzyme immunoassay, LAg-Avidity EIA）。其原理是：人体在感染 HIV 后产生的 HIV-1 特异性抗体，对抗原的识别和结合能力随着感染时间的延长而增加，即亲和力逐渐增加。亲和力新发感染检测方法仅适用于 HIV-1 抗体阳性样本。通常只应用于群体监测，不能用于个体诊断。方法学评价显示：与之前的 BED-CEIA 方法相比，LAg - Avidity EIA 方法的假阳性率较低，受疾病状态，如 CD4 细胞计数，抗病毒治疗等因素的影响较小。近年出现的基于亲和力检测原理的快速新

发感染检测方法，已经过美国疾控中心评估，结果初步显示快速新发感染检测试剂与基于酶联免疫方法的新发感染检测试剂具有相似的检测性能。因快速新发感染检测具有快速、简便等优点，未来其需求和应用将会显著增加。此外，还有一些正在研发的新型新发感染检测方法，比如基于抗体亲和力检测的免疫渗滤快速检测方法；基于重组蛋白捕获酶联免疫试验的新发感染检测方法；基于多种重组抗原同时进行 HIV 检测分型和新发感染检测的酶联免疫或悬液芯片检测方法；以及基于病毒核酸序列变异水平的新发感染检测方法等。

4.2 检测试剂

首选推荐基于 LAg - Avidity EIA 方法的试剂，也可使用基于 BED-CEIA 等方法的经评估合格的其他试剂。

4.3 检测样本

来源于哨点监测、病例报告系统或研究项目中当年新诊断的 HIV-1 抗体阳性样本。

4.3.1 样本的入选标准和排除标准

4.3.1.1 入选标准

(1) 基于抗体的 HIV-1 新发感染检测，必须应用当年新诊断感染者的 HIV-1 抗体阳性的血清、血浆或干血斑样本。

(2) 每份样本量不少于 1mL。样本要求清亮、无严重溶血、没有交叉污染，必须保存在-20℃以下，反复冻融次数不多于三次。

4.3.1.2 排除标准

- (1) 艾滋病病人的样本。
- (2) 接受抗病毒治疗的感染者样本。

4.3.2 注意事项

4.3.2.1 HIV 抗体确证实验结果不确定的样本不用于基于抗体的新发感染检测，需在随访确证 HIV 抗体阳性后进行新发感染检测。

4.3.2.2 如果同一人在 1 年以内出现两份或两份以上确认阳性样本，应将第一份样本纳入新发感染检测，后续样本不进行新发感染检测。

4.3.2.3 对于哨点监测的样本，进行新发感染检测的样本量必须占应检测阳性样本的 85%以上。

4.3.2.4 哨点监测的样本必须具有哨点问卷编号,并尽可能补充病例报告系统卡片 ID 号。

4.3.2.5 病例报告样本应当填写病例报告系统卡片 ID 号。

4.4 实验操作、结果处理和解释

实验操作、结果处理和解释以试剂盒说明书为准。以下介绍 HIV-1 限制性抗原亲和酶联免疫方法的检测结果处理和解释。

4.4.1 计算标准 OD 值 (OD_n)

1) 计算中值 OD 值: 校准品、阳性对照、和待检样本的中值 OD 值为 3 次 OD 值排序后中间的值, 阴性对照的中值 OD 值为 2 个阴性对照 OD 值的均值。

2) 计算 OD_n 值

对照的 OD_n 值 = 对照的中值 OD 值 / 校准品的中值 OD 值

初筛试验: 各样本的 OD_n 值 = 各样本的 OD 值 / 校准品的中值 OD 值

确认试验: 各样本的 OD_n 值 = 各样本的中值 OD 值 / 校准品的中值 OD 值

4.4.2 获得质控有效的实验结果

阳性对照和校准品的中值 OD 值以及两个阴性对照的 OD 值必须都在试剂盒说明书提供的质控范围内, 并且所有对照和校准品的 OD_n 值必须都在试剂盒说明书提供的质控范围内, 该试验的质控才有效, 否则需要重新进行检测。

4.4.3 结果的解释

初筛试验: 样本进行单孔检测。当样本的 OD_n 值 > 2.0 时, 该样本判为长期感染样本, 不需要进行确认试验; 当 OD_n 值 ≤ 2.0 时, 该样本需纳入确认试验。

确认试验: 初筛试验中 OD_n 值 ≤ 2.0 的样本应进行三孔重复检测, 当 OD_n 值 ≤ 1.5 时, 该样本判为近期感染样本, 当 OD_n 值 > 1.5 时, 该样本判为长期感染样本。

5 质量控制

5.1 人员培训

进行新发感染检测的实验人员必须经过严格的技术培训, 每个技术人员正式开展新发感染检测工作之前, 至少要独立做 5 次预实验, 除阴性对照外, 其他样本 OD_n 值的 CV 值均应小于 15%。

5.2 样本质控

所有样本的采集、运输、检测及保存必须严格按照本规范执行。检测之前要确保

样本信息正确、样本需完全融化、充分混匀。

5.3 试剂质控

5.3.1 试剂内对照

每个新发感染检测试剂盒内均含有厂家提供的阴性对照、低值阳性对照、高值阳性对照和校准品，用于判断每次实验的有效性，要求每次实验的 OD 值和 ODn 值均需在要求的质控范围内，否则结果视为无效，必须重新进行检测。每次检测样本时，必须有试剂盒内部对照，而且只能应用在同批号的试剂盒中，并对内部对照建立 Levey-Jennings 质控图，以保证检测的准确性和精确性。

5.3.2 试剂外质控

新发感染检测试剂必须按照要求运输和保存。采购后，需进行平行实验验证，确保符合质量要求之后，才可进行实验。此外，开启试剂盒时，需在包装盒上注明开启日期，同时注意在有效期内使用，禁止使用过期试剂。

5.4 实验过程质控

实验过程中，环境条件（主要指室温）要恒定（15-30℃）。严格按照试剂盒说明书操作，控制每一步骤的孵育时间和温度。时间应准确计量，禁止估算。必须定时维护和校准仪器设备，尤其是加样器、洗板机、孵育箱，以保证结果准确性。保留所有原始实验记录，并有检测人以及复核人签字。如果同一份样本的初筛实验和确认实验的 ODn 值相差较远，一致性较差，需要 3 孔复检，做第三次检测，以两次一致性较好的结果为最终结果。

参考文献

1. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI surveillance. 2011.
2. Technical update on HIV incidence assays for surveillance and monitoring processes. WHO/UNAIDS. 2015.
3. Meeting report: HIV incidence assays. UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI surveillance. 2016.
4. Meeting report: HIV incidence measurement and data use. WHO. 2018.
5. UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI surveillance. When

- and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. 2011. Available.
6. Guidelines for the use of the BED assay for incidence estimation and surveillance in resource-limited countries. Atlanta, 5 June 2006.
 7. Using the BED HIV-1 Capture EIA Assay to Estimate Incidence Using STARHS in the Context of Surveillance in the United States. Atlanta, Oct 2007.

第四章 HIV-1 核酸检测

1 范围

本章规定了 HIV-1 核酸定性和定量检测（病毒载量）的意义、实验室要求、检测方法、质量控制及结果判定标准，适用于 HIV-1 核酸的定性检测和定量的测定。

2 核酸检测的意义

核酸检测可用于 HIV 感染诊断、血液筛查、病程评估及抗病毒治疗效果监测。

2.1 感染诊断

2.1.1 作为补充试验：用于筛查试验有反应但抗体确证试验不确定或阴性样本的判定；对筛查试验有反应但抗体确证试验不确定或阴性的疑似艾滋病晚期患者需将核酸检测、临床病史和 CD4⁺T 淋巴细胞计数检测结果综合判断。对于抗体筛查试验阴性但免疫功能低下者，也可进行核酸检测，结合临床综合判断。

2.1.2 急性期诊断：对近期有明确流行病学史的个体，包括患有性病或有性病史，有同性和异性性接触不安全性行为，有共用注射器吸毒史，有医源性暴露史，有职业暴露史，HIV/AIDS 患者的配偶或性伴侣，HIV/AIDS 母亲所生子女等，如抗体筛查试验无反应，可通过核酸检测判定是否为急性期感染。核酸检测结果阴性或低于最低检测限不能排除 HIV-1 感染。

2.1.3 HIV-1 暴露婴儿感染早期诊断

HIV-1 感染母亲所生小于 18 个月龄的婴儿，不同时间的两次 HIV-1 核酸检测均为阳性即可作出诊断。18 个月龄以上儿童诊断与成人相同。

2.2 血液筛查：对献血者及采供血机构的原料血浆进行核酸检测，可及时发现窗口期感染，降低输血的“残余危险度”，减少二代传播。

2.3 抗病毒治疗效果监测

HIV 感染者和艾滋病病人经抗病毒药物治疗后，定期进行 HIV-1 病毒载量检测，可判断抗病毒药物治疗的疗效。病毒载量结果动态分析，对决定是否继续使用原定的治疗方案以及是否需要更改治疗方案起到重要作用。一般启动抗病毒治疗 6 个月后进行病毒载量检测，以监测治疗效果，每年应检测一次。治疗前进行检测可了解病人的病毒载量基线，有助于评价治疗后效果。如适时重复检测病毒载量，没有低于检测

限，需要考虑治疗是否失败。此外，HIV-1DNA 定量检测可判定 HIV 储存库含量，可更准确预测 HIV 传播风险和病程进展。HIV-1 DNA 定量高者，传播风险的可能性高，病程进展快而严重，DNA 定量测定为进一步疗效评价提供新的技术手段。

3 HIV 核酸检测实验室要求

HIV 核酸检测应在符合要求的实验室中进行，应制定严格的管理制度和建立与实验和实验室管理相关的标准操作程序。实验人员必须充分了解并严格遵守各项规定和掌握操作技能，并严格遵照执行。核酸定性、定量检测要严格满足分子生物学实验室的要求。

3.1 实验室的设计及工作基本原则

HIV 核酸检测实验室设计及实验室的基本工作原则应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》附件中“医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则”和《HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南》的要求。

3.2 实验室人员和要求

进行 HIV 核酸检测的人员需具有艾滋病核酸检测的上岗资格，接受过市级以上的实验操作技术培训及相关技术设备及检测产品提供商的培训，并接受过实验室生物安全培训。

3.3 实验室生物安全

实验室的安全工作制度或安全标准操作程序，所有操作符合《实验室生物安全通用要求》（GB19489-2008）。

4 HIV-1 核酸检测方法及程序

HIV 核酸检测分为定性和定量试验。HIV 核酸定性检测主要采用实时荧光定量 PCR 方法，HIV 核酸定量检测主要基于靶核酸扩增和信号放大两种方法。定性和定量检测均可用作 HIV 感染诊断，定量检测还可用于抗病毒治疗效果监测。

4.1 HIV-1 核酸定性检测

4.1.1 方法：HIV-1 核酸定性检测包括 RNA 检测和 DNA 检测。RNA 检测主要是检测血浆或血清中的 RNA，DNA 检测主要是检测全血、干血斑或组织细胞中的前病毒 DNA 或总核酸。二者相比，HIV-1DNA 检测的稳定性更好。

目前，HIV 核酸定性检测主要有实时荧光定量 PCR 方法、荧光探针 PCR 法及以

焦磷酸化激活聚合酶（PAP）反应为基础的核酸扩增 PCR 方法。

4.1.2 试剂：必须是经国家药品监督管理局注册、在有效期内的试剂。严格按产品说明书操作。

4.1.3 结果判定与报告：检测结果显示“有反应”或“检测到”，报告本次核酸阳性；检测结果显示“无反应”或“未检测到”，报告本次核酸阴性。核酸定性检测阴性不能排除HIV-1感染，特别是对有高危行为、暴露前或暴露后预防用药的个体，需要根据流行病学史、临床表现和实验室其他相关指标进行诊断。

4.2 HIV-1 核酸定量检测

4.2.1 方法

4.2.1.1 RNA 检测

主要是定量检测血浆中的病毒RNA，检测的主要原理是实时荧光定量PCR（Real Time-PCR）。主要步骤包括提取、纯化血浆中的病毒RNA，逆转录，进行PCR扩增，通过实时荧光定量PCR检测得到结果。

由于HIV-1高度变异，影响HIV-1RNA定量检测的敏感性，且同一样本由于不同试剂的方法学差异（例如，不同的试剂盒之间的扩增片段或荧光探针的差异），可能出现不同的结果，因此应选择能够检测出当地主要HIV-1流行毒株的试剂。评估抗病毒治疗效果和病程进展，对同一病人最好始终使用同一种试剂，有助于合理解读病毒载量的变化。要考虑检测试剂版本的更新情况。不同试剂间的检测结果无固定的转换关系。

4.2.1.2 DNA 检测

包括全血、干血斑、PBMC及组织中DNA检测。血液中总HIV-1DNA含量测定是目前最常用的方法。同定性检测一样，总HIV-1DNA含量测定主要有荧光探针PCR法及以焦磷酸化激活聚合酶（PAP）反应为基础的核酸扩增PCR方法。针对整合的HIV-1DNA的检测方法主要有Alu-gag PCR法，但由于灵敏度低等缺点未在临床上广泛应用。

4.2.2 试剂

必须是经国家药品监督管理局注册、在有效期内的试剂。严格按说明书操作。

4.2.3 结果判定与报告

按照试剂盒说明书判定检测结果：

4.2.3.1 用于HIV-1感染的诊断：检测值 >5000 CPs/ml (或IUs/ml)，报告检测值；检测值 ≤ 5000 CPs/ml (或IUs/ml)，需严格按核酸检测的要求，再次采样检测后报告检

测值。结果 >5000 CPs/ml(或IUs/ml)可以作为诊断依据；结果仍为 ≤ 5000 CPs/ml，则需结合流行病学史、临床病史、CD4+T淋巴细胞计数和HIV-1抗体随访检测结果等进行综合判断。检测值小于检测下线，报告低于检测限。对于暴露前或暴露后预防用药的个体，检测值低于最低检测限不能排除HIV-1感染，需要根据流行病学史、临床表现和实验室其他相关指标进行综合判断。

4.2.3.2 用于治疗效果监测：检测值小于试剂盒检测范围下限，报告低于检测限；检测值大于等于试剂盒检测范围下限，报告检测值。

4.2.3.3 HIV-1DNA定量检测结果的判定，按照试剂盒说明书，检测报告根据临床应用情况决定。

4.3 集合核酸定性检测 (Pooling PCR)

利用核酸检测方法的高度敏感性的优势，对 HIV 抗体检测阴性的高危人群的样本进行集合核酸检测，可及时发现窗口期 HIV-1 感染者。

4.3.1 样本集合程序

4.3.1.1 根据预处理样本量，计算预形成一级和二级集合数量，在登记表格上记录一级和二级集合及对应的原始样本编号。

4.3.1.2 吸取 $130\mu\text{L}$ 样本，移入标记二级集合的离心管中；10 份样本形成一个 $1300\mu\text{L}$ 的二级集合样本，充分涡旋震荡混匀。

4.3.1.3 从 5 个二级集合管中分别吸取 $210\mu\text{L}$ 样本，移入标记有一级集合的离心管中，形成由 50 份样本组成的体积为 $1050\mu\text{L}$ 的一级集合样本，充分涡旋震荡混匀。

4.3.1.4 从每个一、二级集合管中吸取 $1000\mu\text{L}$ 集合样本，分装至另一相应标记的离心管，用超敏感核酸检测试剂进行检测。

4.3.1.5 制备阴性集合外部质控品：使用 50 份 HIV 抗体和核酸阴性样本，按上述步骤，分别集合成 5 个阴性二级集合外部质控品和 1 个一级集合外部质控品。

4.3.1.6 制备阳性集合外部质控品：从 9 份 HIV 抗体且核酸阴性样本和 1 份至少含有浓度为 10^4 CPs/ml HIV-1RNA 的阳性样本中，分别移取 $130\mu\text{L}$ 加入离心管中，形成一个 $1300\mu\text{L}$ 的阳性二级集合外部质控品。再分别从 4 个已制备好的阴性二级集合外部质控品和上述阳性二级集合外部质控品中，移取 $210\mu\text{L}$ 至标记为一级阳性集合外部质控品的离心管中，形成一级阳性集合外部质控品。

4.3.1.7 一级和二级阴、阳性集合外部质控品分别用于 RT-PCR 中每一轮一级和二级集合样本的检测。

4.3.2 集合样本的检测和分解路线

使用商品化核酸检测试剂，应严格按照试剂说明书操作。按照各商品化核酸试剂集合 PCR 的方案进行检测，集合样本的数量根据各试剂方案操作。

4.3.2.1 用 HIV-1 病毒载量检测方法对一级集合样本进行检测，阳性反应的一级集合样本进入下一检测步骤。阴性则不进行分解。

4.3.2.2 用 HIV-1 病毒载量方法对所有组成阳性一级集合的二级集合样本进行检测，阳性反应的二级集合样本进入下一检测步骤。

4.3.2.3 用 HIV-1 病毒载量方法检测所有组成阳性二级集合样本的 10 份单个样本，确定核酸阳性的单个样本。

4.3.3 适用范围

血液筛查和各类高危人群样本检测，通常是抗体筛查阴性的样本。要求样本采集、分离、保存均应满足核酸检测的要求。

4.4 HIV-1 核酸即时检测(molecular point-of-care Testing, POCT)

HIV 核酸即时检测是在床旁、现场或者急诊进行的，能快速获得检测结果的一类检测方法。POCT 检测适用范围广泛，且可避免样本长途运输导致的质量下降，非专业人员经培训后也可操作。可用于 HIV-1 感染、儿童早期 HIV 感染的辅助诊断、病程监控及抗病毒治疗效果评价。

5 质量保证和质量控制

质量控制包括从样本接收到发出报告各环节的管理过程，包括：（1）人员；（2）实验室分区和环境；（3）仪器；（4）检测过程（试剂、操作过程，外部质控品使用等）。

所有相关检验人员需经过理论及实践培训，能独立熟练地操作，考核合格，持证上岗。

5.1 实验室分区和环境

HIV-1 核酸检测实验室原则上应至少分为三个独立的工作区：试剂准备区、样本处理区、扩增产物分析区，并设在不同房间。严格要求三区的空气流向：从试剂准备区到样本处理区，然后到扩增产物分析区，不能逆向流动。

5.2 仪器设备质量控制

加样器、温湿度计需经计量部门校准，每年一次；要定期对 HIV-1 病毒载量检测

仪、实时荧光 PCR 仪等仪器进行维护保养。冰箱、水浴箱用校准合格的温度计监测温度，并做好记录。

5.3 检测过程质量控制

用于 HIV 感染辅助诊断的试剂，要保证所有试剂盒有效并经国家药品监督管理局注册，实验中使用无 DNA 和 RNA 酶的水；严格执行仪器和试剂的标准操作程序（SOP），不得擅自修改。HIV-1 核酸定性检测每次实验建议加阳性对照、阴性对照和试剂对照。定量检测建议使用一个 HIV-1 RNA 为 5000~15000CPs/ml 的外部质控品；每次实验按照试剂盒说明书的要求使用试剂盒提供的外部质控品，并满足外部质控品的要求。

5.4 外部质量控制

国家艾滋病参比实验室每年组织两次病毒载量检测的能力验证，每次 5 个样本，具体解释详见《HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南》，中国疾病预防控制中心，2013 年版。

参考文献

1. 《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》中华人民共和国卫生行业标准 WS 293—2019，中华人民共和国国家卫生健康委员会。
2. 《中国艾滋病诊疗指南（2018 版）》，中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组中国疾病预防控制中心。中华内科杂志，2018，57（12）：1-18.
3. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents. US DHHS 2015 WHO.
4. 《HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南》，中国疾病预防控制中心，2013。
5. 张美，吴昊，张宏伟，对 HIV-1 储藏库的重新认识。中国病毒病杂志，2013，3（5）：396-400。
6. 卫生部关于印发《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》的通知，卫办医政发 2010，194。
7. 《实验室生物安全通用要求》，GB19489-2008。
8. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. AIDS 2002, 24:16(8):1119-1129.

第五章 艾滋病病毒感染检测策略及流程

1 范围

本章规定了艾滋病病毒感染检测策略，包括实验室检测策略及现场应用策略、流程及结果报告。

2 定义

艾滋病实验室检测策略指用于疫情监测、血液筛查、临床诊断的策略。

艾滋病检测现场应用策略，指医务人员主动提供的检测咨询（Provider Initiated Testing and Counselling, PITC）、自愿咨询检测（Voluntary Counseling and Testing, VCT）、自我检测（Self Testing, ST）及传递检测等的检测策略。

3 艾滋病实验室检测策略

3.1 疫情监测相关的检测策略、流程及结果报告

3.1.1 HIV 匿名无关联检测流程

先用试剂 1 进行初筛试验，结果无反应，报告“HIV 抗体阴性”，不再进行复检试验；结果有反应，进入复检试验。

所有初筛有反应的样本，使用试剂 2 进行复检，结果无反应，报告“HIV 抗体阴性”；结果有反应，报告“HIV 抗体阳性”。用于疫情监测的检测流程见图 1。

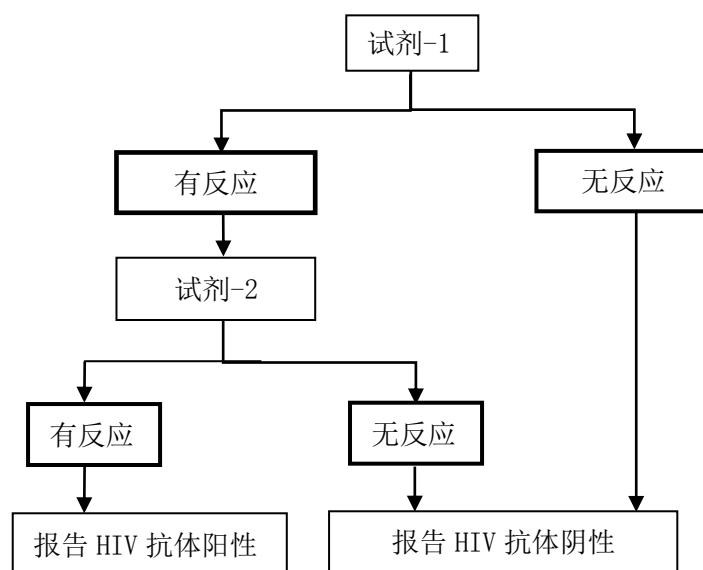


图 1 HIV 匿名无关联检测流程

3.1.2 HIV 实名关联检测流程

实名关联疫情监测，需采取临床诊断相关检测流程及结果报告。

3.2 临床诊断相关的检测策略、流程及结果报告

针对个体的临床诊断基本策略是：先进行 HIV 筛查试验，有反应的样本再进行 HIV 补充试验，补充试验阳性的可做出诊断。

HIV 抗体筛查试验是一类初步了解机体血液或体液中有无 HIV 抗体的检测方法，也包括同时检测 HIV 抗体和抗原的方法。常用的检测方法有酶联免疫吸附试验、化学发光或免疫荧光试验、免疫层析试验、免疫凝集试验、免疫渗滤试验等。

HIV 补充试验是在获得筛查试验结果后，为了准确判断，继续检测机体血液或体液中有无 HIV 抗体或核酸的方法，包括抗体确证试验和核酸试验。抗体确证试验包括免疫印迹试验、重组/线性免疫印迹试验、免疫层析试验、免疫渗滤试验及特定条件下的替代试验；核酸试验包括核酸定性试验和核酸定量试验。

3.2.1 HIV 检测流程概述

HIV 检测流程包括筛查试验和补充试验。筛查试验包括三个流程：即抗体检测试剂的筛查检测流程、区分抗体抗原检测试剂的筛查检测流程和不区分抗体抗原检测试剂的筛查检测流程。补充试验包括 2 个流程：即抗体确证 WB、RIBA/LIA 试剂等的补充试验流程和核酸试剂的补充试验流程。根据需求和检测条件选择相应的流程进行检测。本章中的核酸检测主要指 HIV-1 核酸检测，需 HIV-2 核酸检测详见附件 3（HIV-2 核酸检测）。

HIV 检测策略的基本原则是，首先做筛查试验，根据筛查结果，决定是否继续做补充试验，具体流程见图 2。筛查试验结果除 HIV 抗体阴性报告 HIV 抗体阴性外，其余结果均需要进行补充试验再确定最终结果。

特定条件的 HIV 检测流程{见本章 3.2.3.1（2）}，可使用三种酶联免疫试剂的检测流程或者三种快速试剂的检测流程或快速试剂和酶联试剂的检测流程，报告检测结果，检测报告见附表 4。需进一步确定的样本，做补充试验，具体流程见图 3。

3.2.2 筛查检测流程

3.2.2.1 使用抗体检测试剂的筛查检测流程

用抗体检测试剂进行初筛，结果无反应，报告“HIV 抗体阴性”；结果有反应，不能出具阳性报告，必须进入复检试验。对初筛有反应的样本，用原试剂双孔或双份，或者两种试剂*进行复检试验。如均无反应，报告“HIV 抗体阴性”；如均有反应或一有反应一无反应，报告“HIV 感染待确定”，进行补充试验（见本章 3.2.3）。临床诊断的筛查检测流程见图 4。

图 2 总流程图

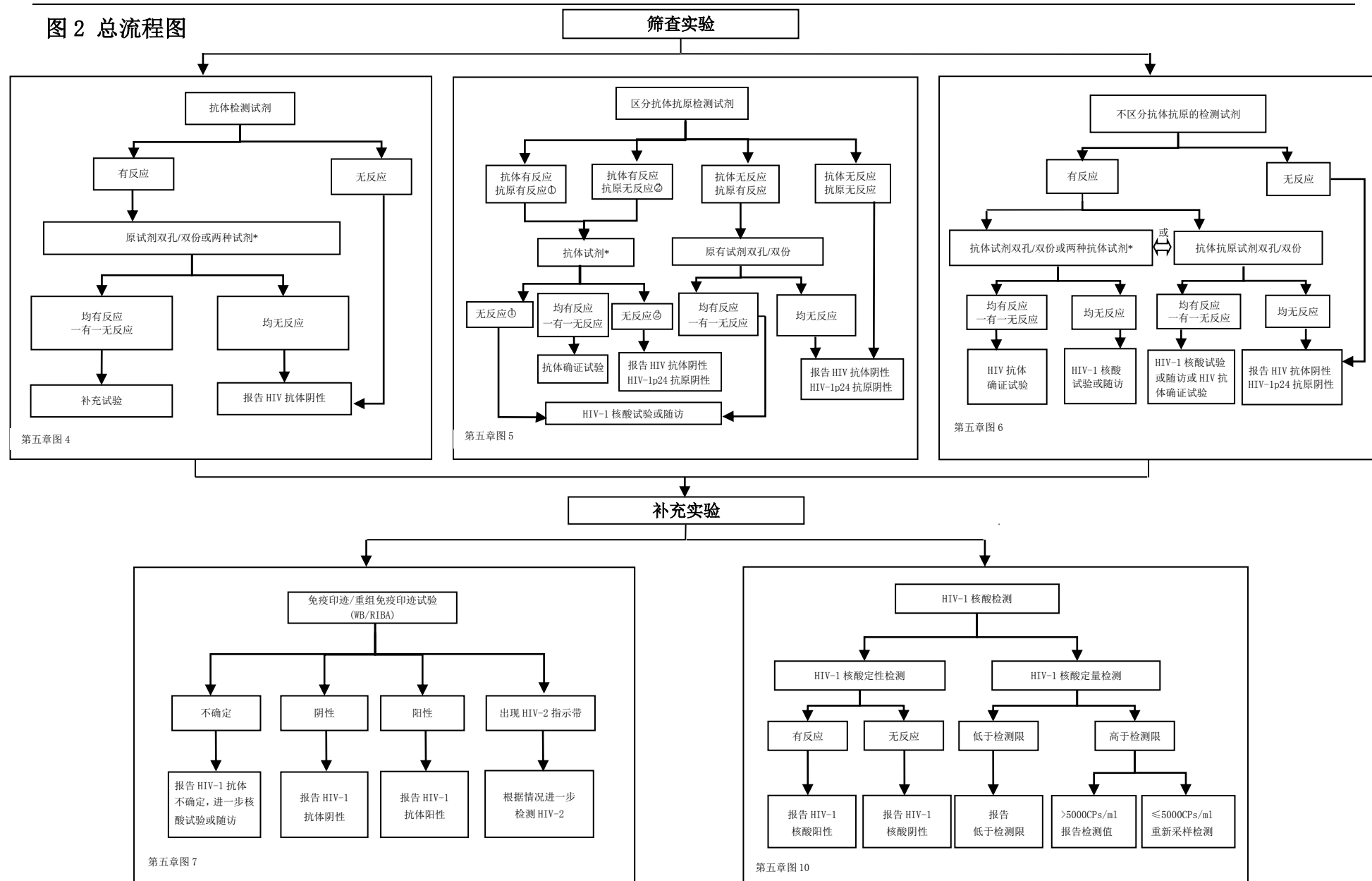
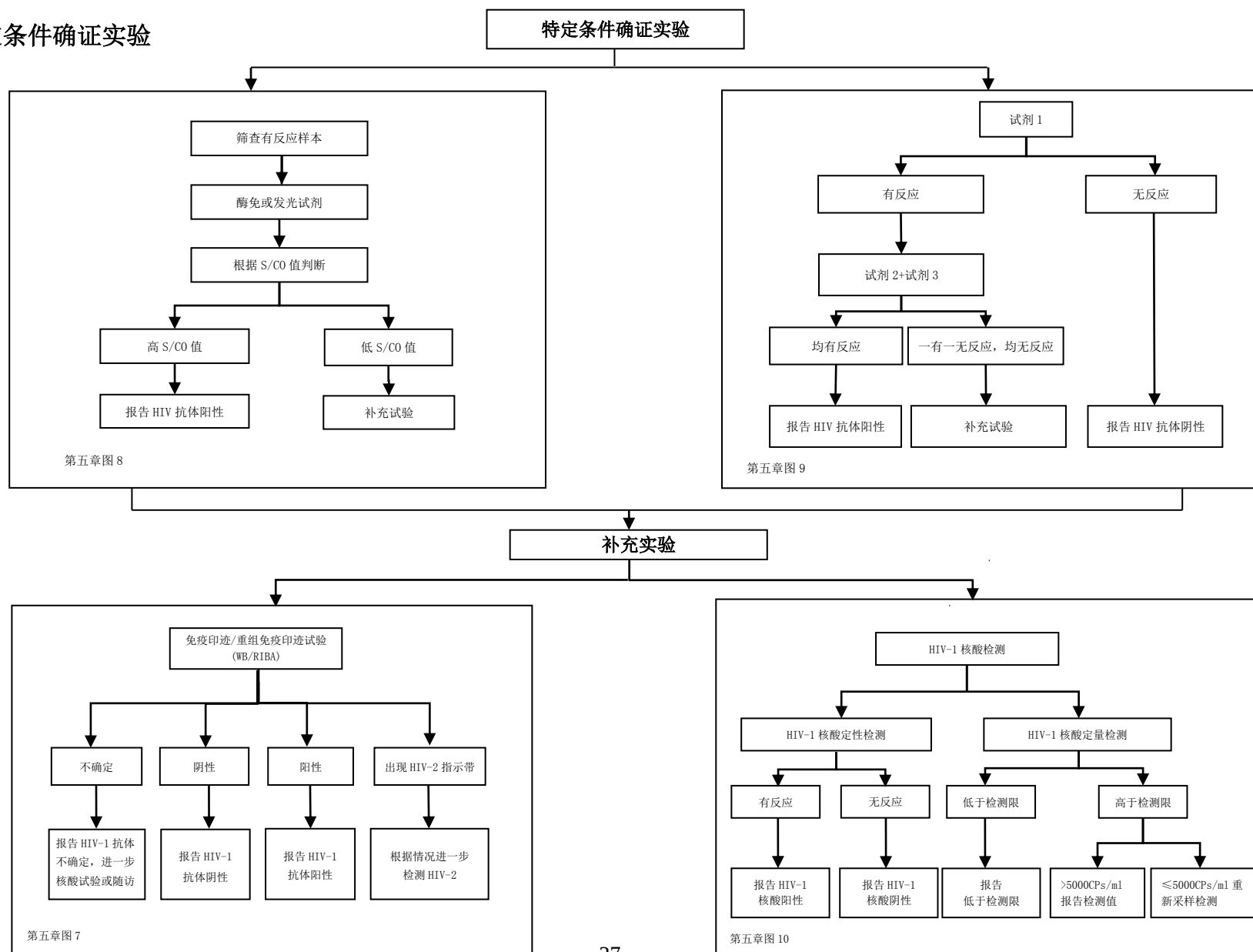


图 3 特定条件确证实验



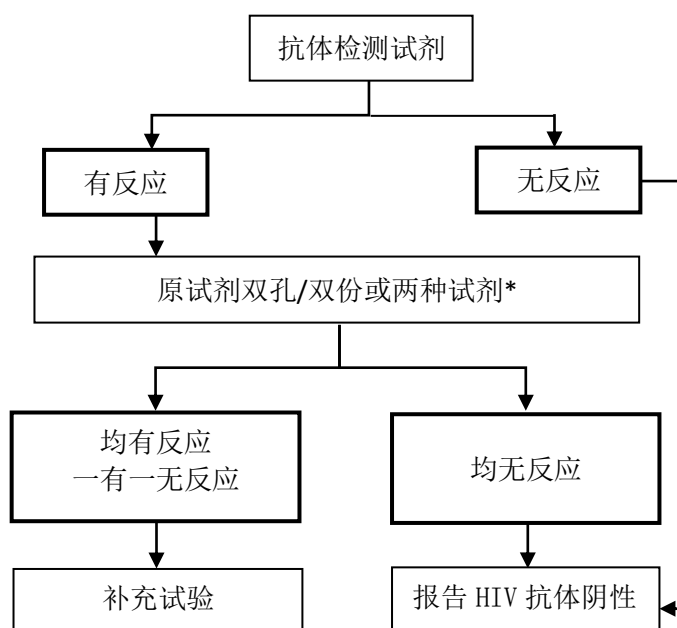


图 4 抗体检测试剂的筛查检测流程

*两种试剂可以是原有试剂加另一种试剂，也可以是两种不同试剂。

3.2.2.2 使用抗体抗原检测试剂的筛查检测流程

抗体抗原检测试剂分为两类：一类是抗体和抗原分别在不同的反应体系内，结果可区分抗体和抗原检测的结果；另一类是抗体和抗原在一个反应体系内，获得抗体抗原总结果，不能区分抗体和抗原检测的结果。

(1) 用可区分抗体抗原的试剂进行初筛，抗体抗原结果均无反应，报告“HIV 抗体阴性、HIV-1 p24 抗原阴性”；抗体抗原结果均有反应①，进行抗体复检检测，结果均有反应，或一有反应一无反应，做 HIV 抗体确证试验；结果无反应，进行 HIV-1 核酸试验或 2-4 周后随访；抗体有反应抗原无反应②，进行抗体复检检测，结果均有反应，或一有反应一无反应，做抗体确证试验，结果无反应报告为“HIV 抗体阴性、HIV-1 p24 抗原阴性”；抗体无反应抗原有反应，用原有试剂双孔或双份复检，结果均有反应，或一有反应一无反应，进行 HIV-1 核酸试验或 2-4 周后随访；结果无反应，报告“HIV 抗体阴性、HIV-1p24 抗原阴性”。检测流程见图 5。对于抗体有反应、抗原有或无反应的样本，也可以选择原有试剂双孔或双份复检。复检均无反应，可以报告“HIV 抗体阴性、HIV-1p24 抗原阴性”；复检均有反应或一有一无反应，做 HIV-1 核酸检测或抗体确证试验。HIV-1 核酸试验见本章 3.2.3.2。

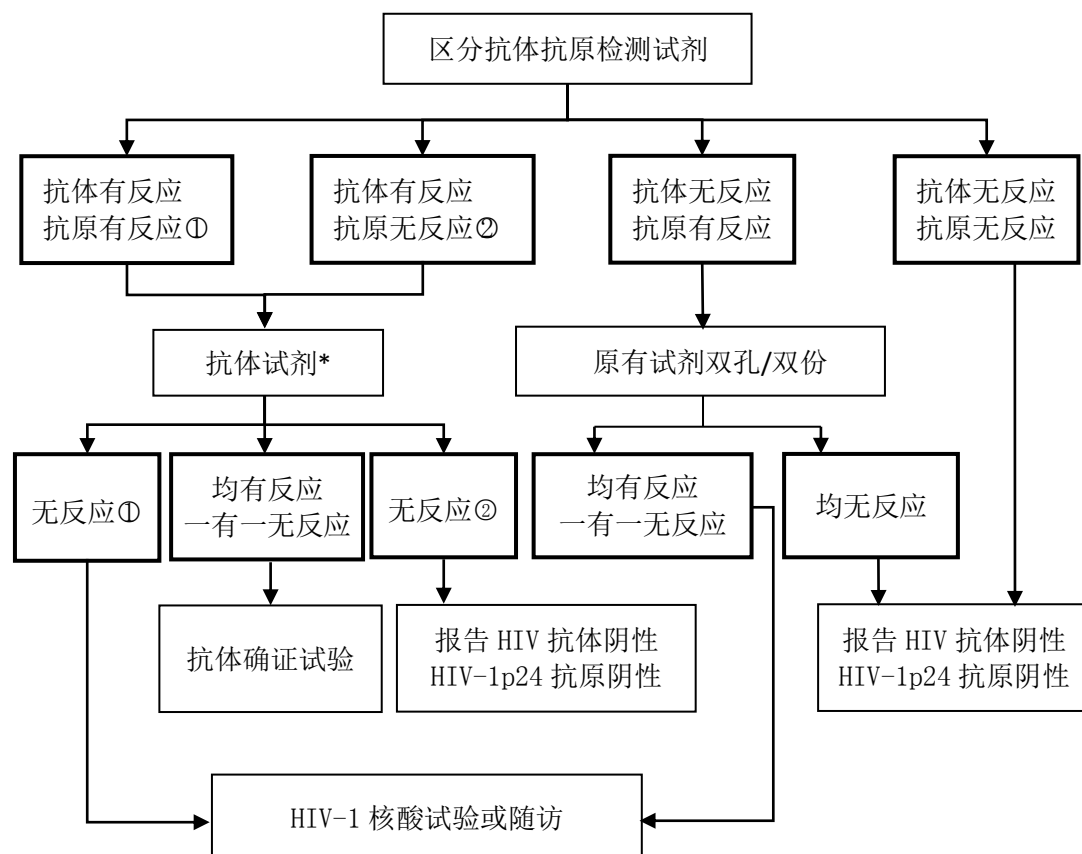


图 5 区分抗体抗原检测试剂筛查检测流程

①②在流程中分别对应。

*抗体检测：使用两种抗体检测试剂或一种抗体检测试剂双孔或双份检测

(2) 用不能区分抗体抗原的试剂进行初筛，结果无反应，报告“HIV 抗体阴性、HIV-1p24 抗原阴性”；结果有反应，不能出具阳性报告，必须进入复检试验。对初筛有反应的样本，可选择抗体检测试剂复检或者选择抗体抗原试剂复检。用抗体检测试剂复检，即使用同一试剂双孔或双份，或者两种抗体筛查试剂复检*，结果均有反应，或一有反应一无反应，需进行 HIV 抗体确证试验；结果均无反应，需进行 HIV-1 核酸检测或 2-4 周后随访。用抗体抗原试剂双孔或双份复检，结果均有反应，或一有反应一无反应，需 HIV-1 核酸检测或 2-4 周后随访，或进行 HIV 抗体确证试验；结果均无反应，报告“HIV 抗体阴性，HIV-1p24 抗原阴性”。检测流程见图 6。

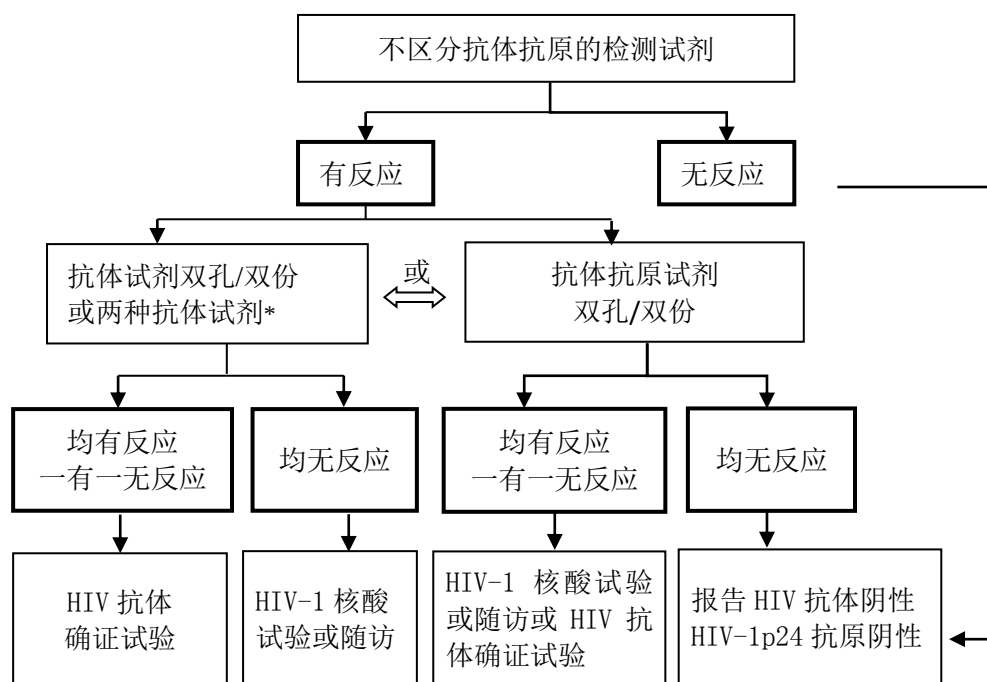


图 6 不区分抗体抗原检测试剂的筛查检测流程

*抗体检测：使用两种抗体检测试剂或一种抗体检测试剂双孔或双份检测

*两种试剂可以是原有试剂加另一种试剂，也可以是两种不同试剂。

3.2.3 补充试验检测流程

补充试验分为抗体确证试验和 HIV-1 核酸试验。抗体确证试验包括免疫印迹试验（WB）和重组/线性免疫印迹试验（RIBA/LIA），特定条件下的 HIV 检测试验（替代策略试验）（三种酶联免疫试验、三种快速试验或者酶联免疫加快速试验），免疫层析或免疫渗滤试验。HIV-1 核酸试验包括定性和定量试验。

3.2.3.1 抗体确证试验检测流程

（1）免疫印迹试验和重组免疫印迹试验（WB/RIBA）

复检试验有反应且需要做抗体确证的样本（图 4、图 5、图 6）进行 HIV 抗体确证试验。HIV 抗体确证试验流程见图 7。

（a）抗体确证检测无条带出现，报告“HIV-1 抗体阴性，如果近期有流行病学史，建议进行 HIV-1 核酸试验或 2-4 后周随访。

（b）HIV-1 抗体阳性者，报告“HIV-1 抗体阳性”，按规定做好检测后咨询和疫情报告；HIV-1 抗体不确定者，报告“HIV-1 抗体不确定”，建议进行 HIV-1 核酸

试验或 2-4 周后随访。

(c) 当出现 HIV-2 指示带时，使用 HIV-2 抗体确证试剂或能区分 HIV-1 与 HIV-2 感染的抗体确证试剂，根据试剂盒说明书判读检测结果。

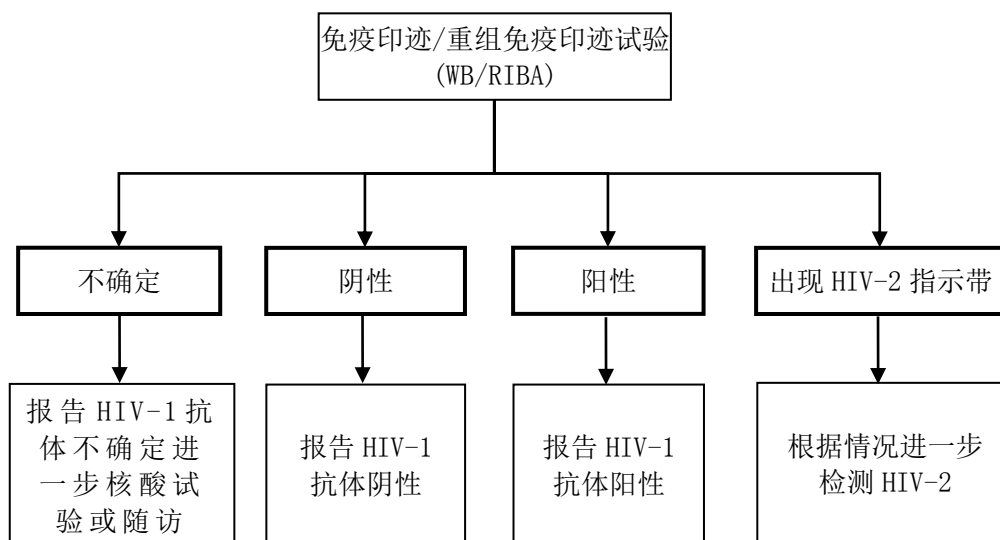


图 7 抗体确证试验流程

对于“HIV-1 抗体不确定”者，如果三个月内随访结果仍为不确定，且核酸试验阴性，建议结合流行病学史和临床表现考虑 HIV-1 阴性的可能性，三个月后不再随访检测。

(2) 特定条件下的 HIV 检测流程（替代策略试验流程）

适用于高流行地区（大于 5%），高危人群（男男同性恋人群，吸毒人群等），三种试剂应经过使用地区的省级中心实验室评价。疫情重点地区若用于一般人群需经过使用地区省级中心实验室评价。

a 三种酶联免疫试剂检测流程（S/C0 比值）

方法仅限于检测方法/试剂给出了特定阈值（与抗体确证试验比较，其阳性的预测值 $\geq 95\%$ ）时使用，或经临床评估确定适合人群的特定阈值。S/C0 比值是指检测样本 OD 值与临界值（Cutoff）的比值，高 S/C0 比值是指当 S/C0 比值 $\geq$ 特定的阈值时；低 S/C0 比值是指其 S/C0 比值 $<$ 特定的阈值。

用于该检测策略的三种试剂，至少有一种的 S/C0 比值 $\geq$ 试剂说明书中给出的特定阈值，可报告“HIV 抗体阳性”，无需再做抗体确证试验；否则，应进一步作抗体确证试验，结果按照抗体确证试验报告的要求进行，见图 8。

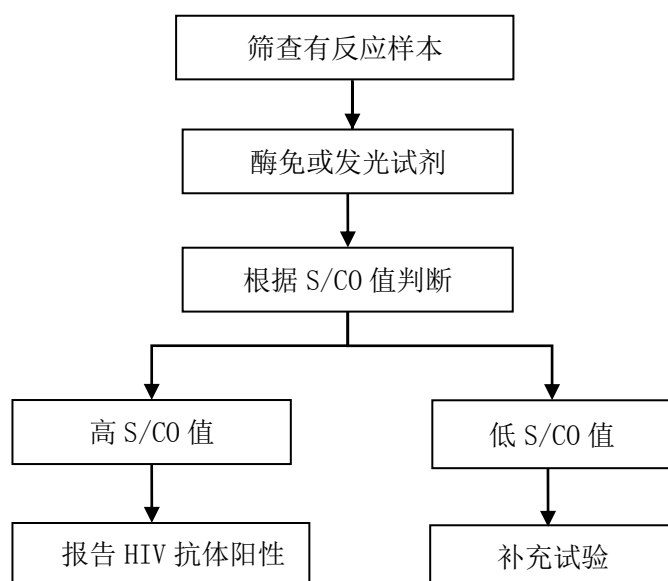


图 8 三种酶联免疫试剂试验流程

b 三种快速试剂检测流程

是指应用三种快速试剂的检测流程。一种策略是 unlimited 试剂类型，即三种快速试剂可以是血液检测试剂，也可以是口腔黏膜渗出液检测试剂或尿液检测试剂；三种快速试剂至少应检测两种不同的生物样本，且至少有一种为血液快速试剂，如血液或口腔黏膜渗出液或尿液。另一种流程是限定三种快速试剂均为血液快速试剂，且至少应包含二种不同原理或不同厂家的试剂。

试剂 1 检测结果无反应报告阴性；有反应用试剂 2 和试剂 3 复检，若均有反应，报告“HIV 抗体阳性”；若均无反应或一种有反应，需进一步做补充试验（抗体确证或核酸试验）。检测流程见图 9。

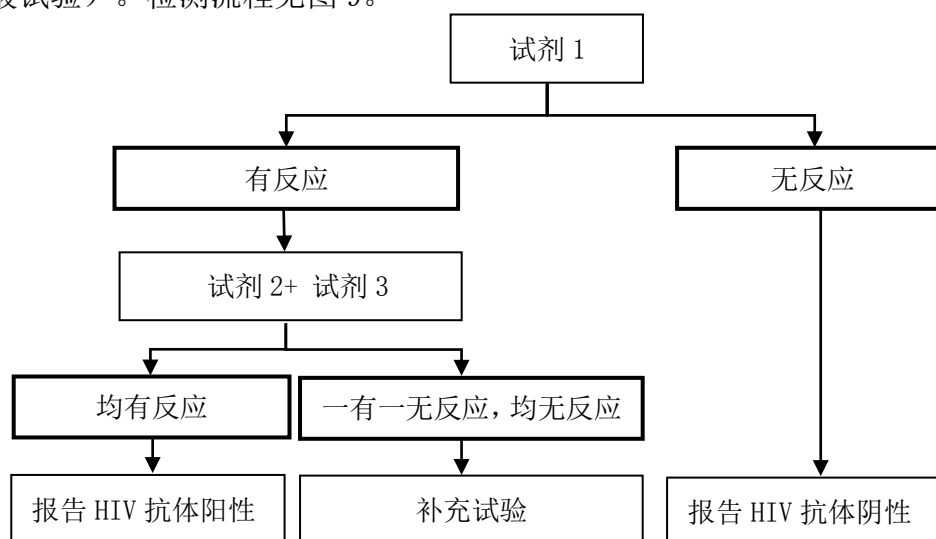


图 9 三种快速试剂试验流程

c 快速试剂+酶联试剂的检测流程

是指使用一种快速试剂和两种酶联免疫试剂，或两种快速试剂和一种酶联免疫试剂的检测流程。两种酶联免疫试剂应针对不同样本，如血液酶联+尿液酶联试剂检测；快速试剂应至少有一种为血液快速检测试剂。

试剂 1 检测结果无反应，报告阴性；有反应用试剂 2 和试剂 3 复检，若均有反应，报告“HIV 抗体阳性”；若均无反应或者一种有反应，需进一步做补充试验（抗体确证或核酸试验）。检测流程见图 9。

3.2.3.2 HIV-1 核酸试验

(1) 对 HIV 抗体复检试验有反应样本（见图 4、图 5、图 6），进行 HIV-1 核酸试验，核酸检测结果阳性报告阳性。核酸检测结果无反应的样本，建议做抗体确证试验。

(2) 抗体确证试验不确定或确证试验阴性但疑似急性期感染或艾滋病晚期的样本，可进行 HIV-1 核酸试验。

(3) 定性检测根据试剂盒说明书判定结果，出具报告。定量检测结果低于检测限，报告低于检测限；检测结果 $>5000\text{CPs/ml}$ ，报告检测值；检测结果 $\leq 5000\text{CPs/ml}$ ，建议重新采样检测，检测结果报告检测值。检测流程见图 10。

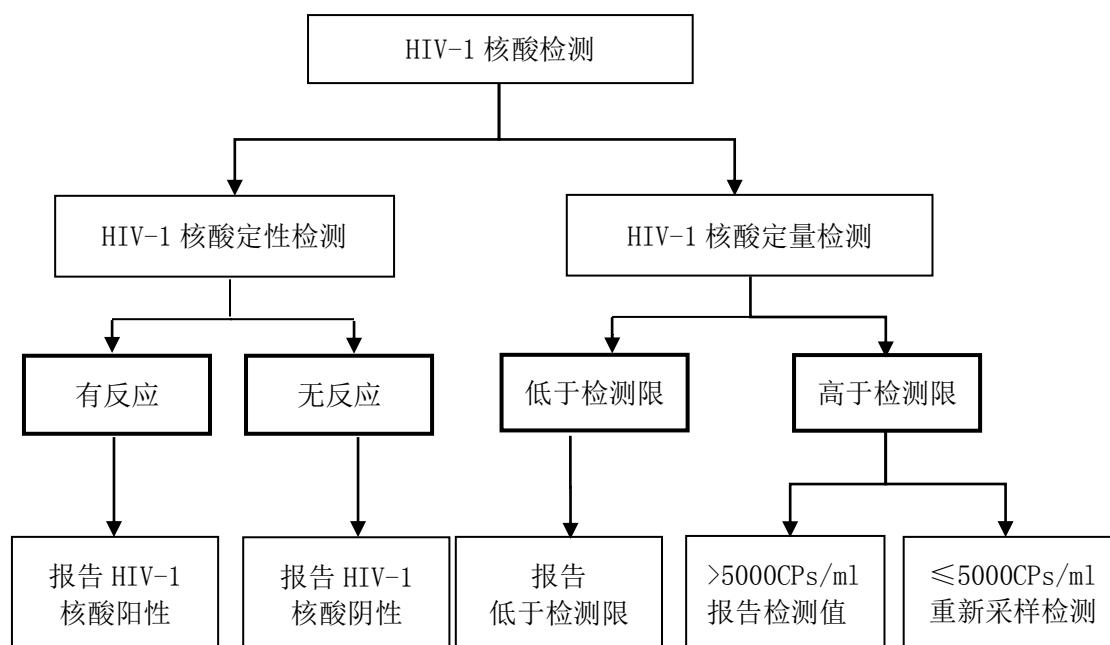


图 10 HIV-1 核酸试验流程

3.3 血液筛查相关的检测策略及结果报告

对献血者捐献血液进行 HIV 筛查的程序，依据现行版《血站技术操作规程》的相关规定执行。对供血浆者和血浆产品的 HIV 筛查程序依据现行版《单采血浆站技术操作规程》的相关规定执行。

3.3.1 献血者捐献血液的 HIV 检测策略及结果报告

对献血者捐献的血液进行人类免疫缺陷病毒（HIV）血液筛查的标志物包括：血清学标志物 HIV-1 型抗体和 HIV-2 型抗体（抗 HIV-1+2），或者 HIV-1 抗体、HIV-2 抗体和 HIV-1p24 抗原（HIV Ag/Ab1+2）；核酸标志物主要为 HIV-1 核酸（HIV-1 RNA）。HIV 血液筛查应至少采用核酸和血清学试剂各进行 1 次检测。（注：对于 HIV 酶免检测反应性的样本可不再进行核酸检测，直接视为该项目检测结论不合格。）HIV 血液筛查方法和试剂的选择应符合国家相关法规要求。

HIV 血液筛查血清学检测试验程序和结果判定规则参照图 11 执行。

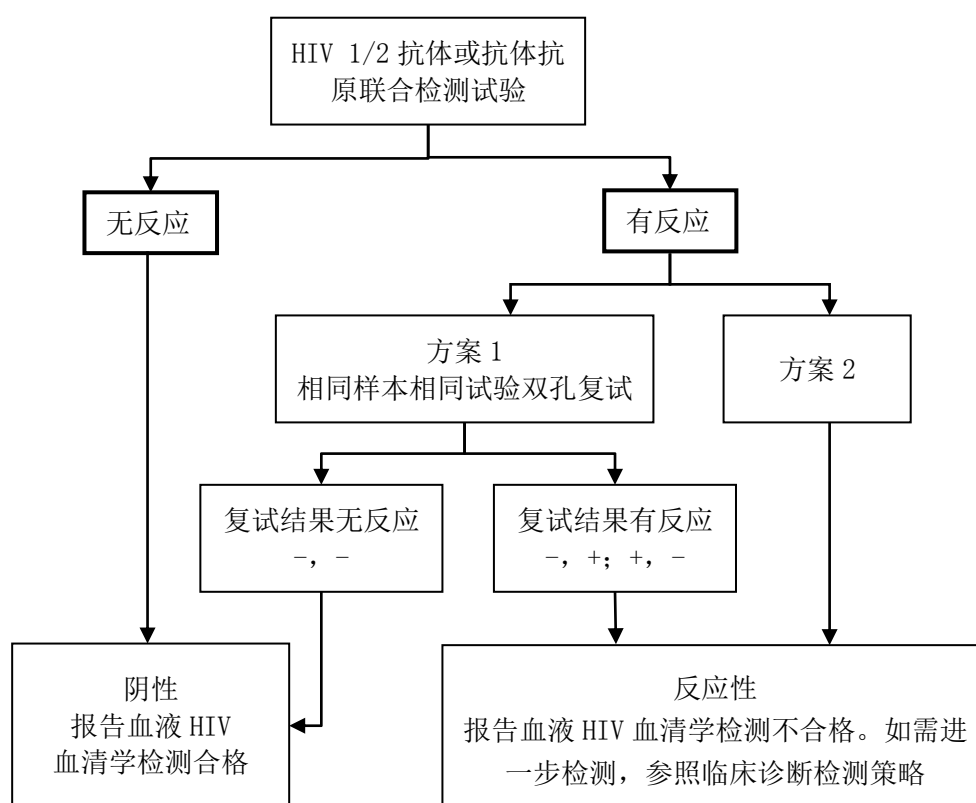


图 11 HIV 血液筛查血清学检测试验流程

HIV 血液筛查核酸检测试验程序和结果判定规则参照图 12 执行。

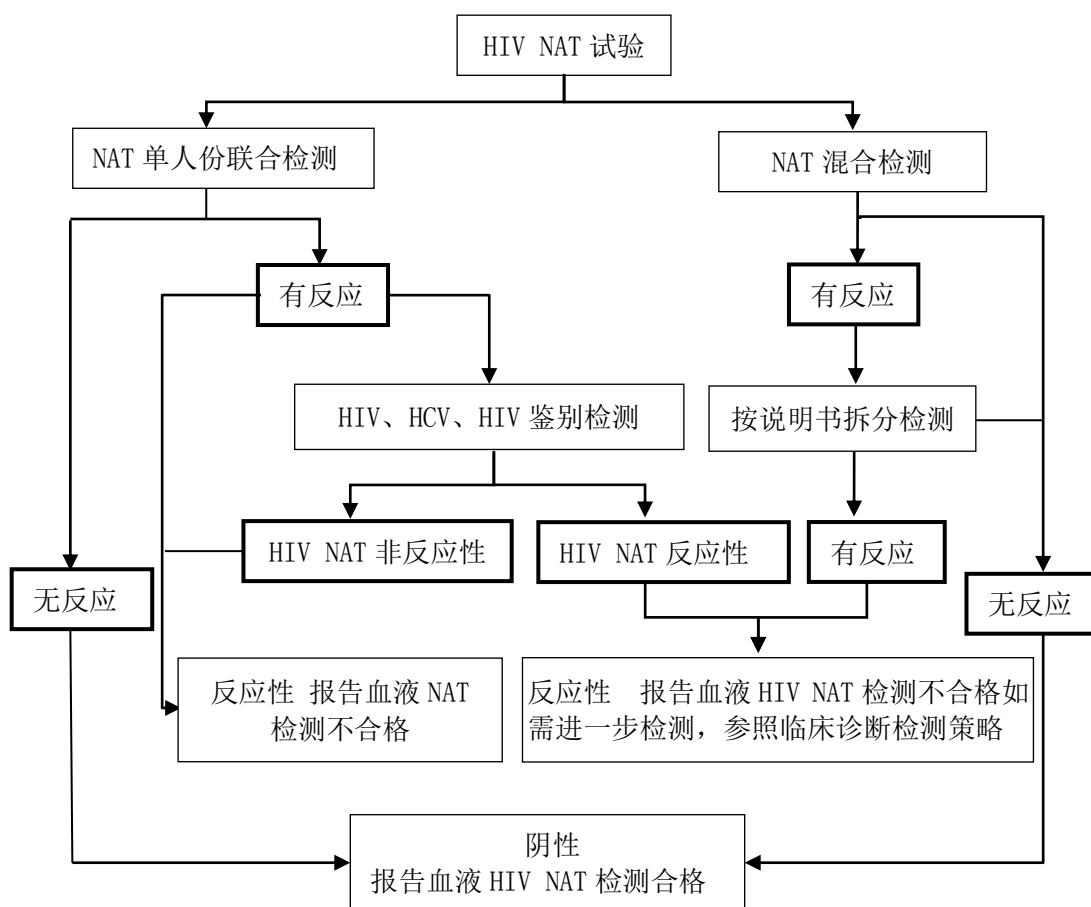


图 12 HIV 血液筛查核酸检测试验流程

血站采用血清学检测和核酸检测，进行 HIV 感染标志物血液筛查。两种检测可以采用顺序检测或并行检测程序进行试验和结果判断。血站 HIV 血清学和核酸顺序检测和并行检测流程及结果判定规则参照图 13 执行。

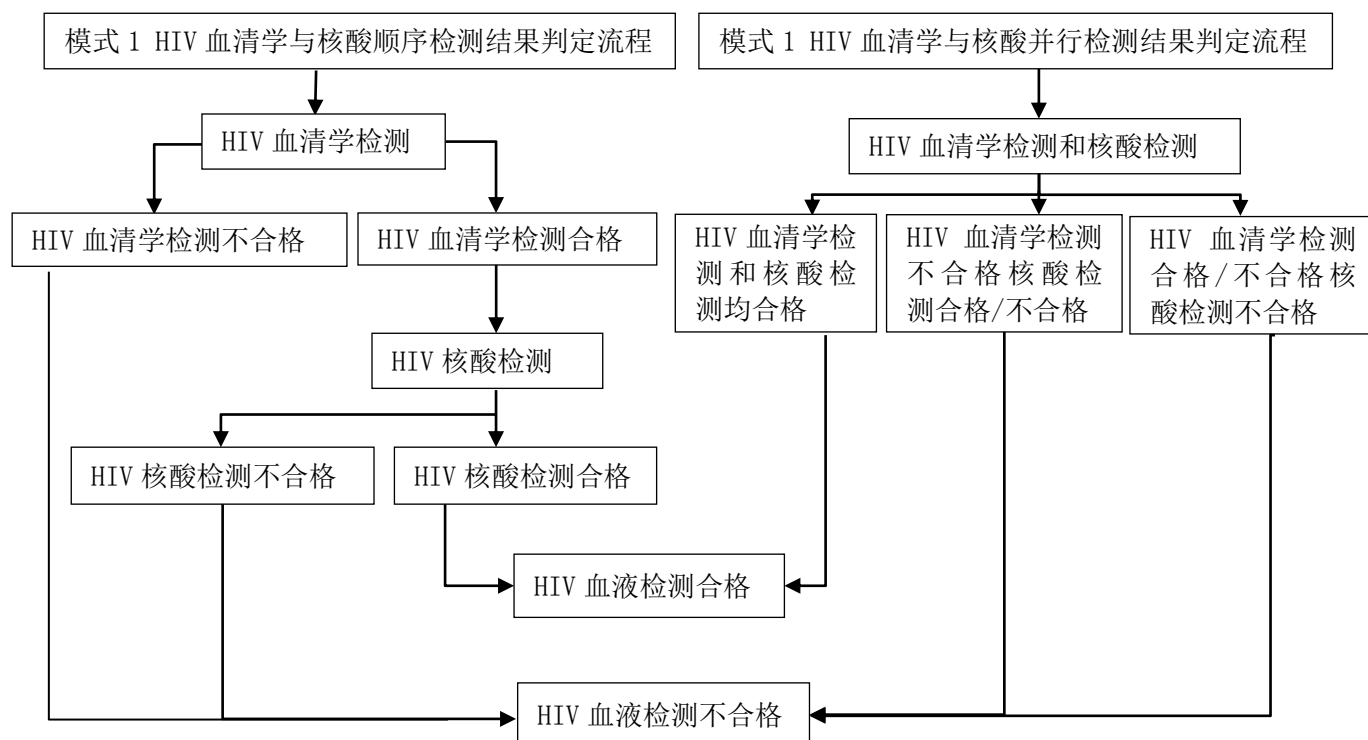


图 13 HIV 血液筛查血清学和核酸顺序检测和并行检测试验流程

所有 HIV 血液检测不合格样本的进一步检测参照临床诊断检测策略。

3.3.2 供血浆者和血浆产品 HIV 检测策略及结果报告

供血浆者和血浆产品 HIV 血清学检测按照 3.3.1 血液筛查检测流程（图 11）进行。供血浆者和血浆产品如进行 HIV 核酸检测，按照 3.3.1 血液筛查检测流程（图 12）进行。HIV 血清学检测反应性和/或 HIV 核酸检测反应性，即报告为 HIV 检测不合格。HIV 检测不合格样本的进一步检测参照临床诊断检测策略。

3.4 婴儿 HIV-1 感染早期诊断相关的检测流程及结果报告

艾滋病感染产妇所生儿童应于出生后 48 小时内、6 周和 3 个月时，分别采集血样本，进行婴儿艾滋病感染早期诊断检测。两次核酸检测结果阳性，可诊断为 HIV 感染，报告“婴儿 HIV 感染早期诊断检测结果阳性”。早期诊断检测结果为阴性或未进行早期诊断检测的儿童，应于 12 月龄进行艾滋病抗体筛查，筛查结果是阴性者，排除 HIV 感染；筛查结果是阳性者，应随访至 18 月龄。若 18 月龄时抗体检测结果仍然为阳性，应及时进行补充试验明确感染状态。艾滋病感染孕产妇所生儿童艾滋病早期诊断与抗体检测服务流程见图 14。

发放检测报告的同时上报疫情做好检测后咨询

为便于及早发现疑似阳性产妇,进行母婴阻断预防垂直传播,对于孕期未接受艾滋病检测,临产时感染状况不明的产妇需同时使用两种检测试剂(30分钟内出检测结果)进行抗体或抗体抗原筛查。

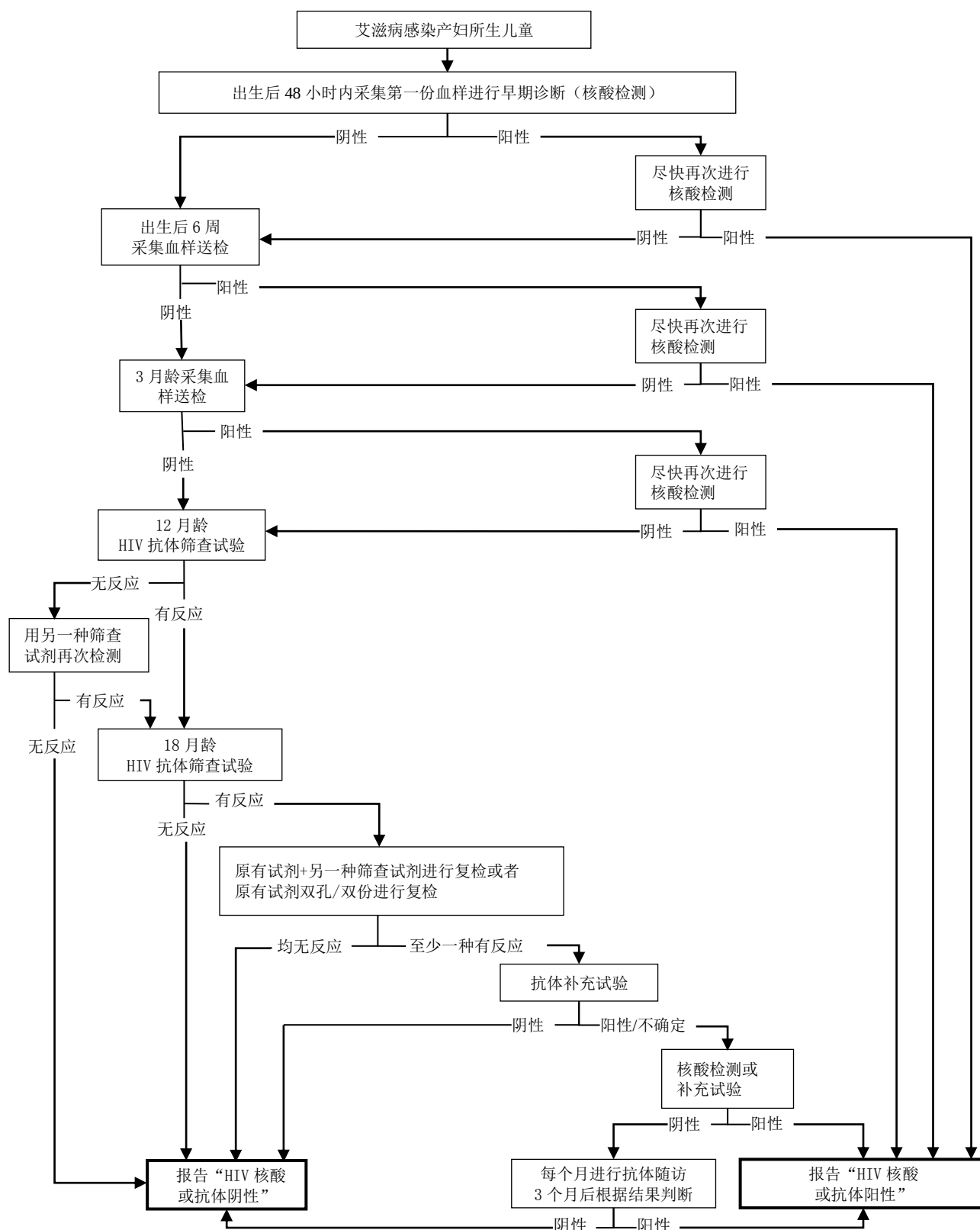


图 14 艾滋病感染孕产妇所生儿童艾滋病早期诊断与抗体检测流程

4 艾滋病检测现场应用策略

4.1 自愿咨询与检测策略

艾滋病病毒自愿咨询检测 (HIV Voluntary Counseling Testing ,VCT) 是指个人经过咨询后进行 HIV 检测的过程。其检测策略是在综合医院、妇幼保健机构及疾病预防控制机构建立咨询门诊与检测实验室, 相互配合, 有机结合。具体可参见“艾滋病检测咨询手册”。

4.2 医务人员主动提供检测和咨询

医务人员主动提供检测和咨询(provider-initiated testing and counseling, PITC), 按照“知情不拒绝”原则开展检测, 可以充分利用现有的医疗卫生资源扩大 HIV 检测咨询的覆盖面, 最大限度的发现潜在的感染者。

4.3 自我检测策略

4.3.1 艾滋病自我检测是个体在私下独自或在其信任的人陪伴下, 自我采集样本、检测和读取结果的过程。主要是基于免疫层析技术来检测 HIV 感染者血液、尿液、口腔黏膜渗出液中的 HIV 抗体, 个体操作, 简便快速, 一般可在 10~30 分钟内得出结果。目前我国国家“十三五”传染病防治科技重大专项支持研发的尿液自我检测试剂已获得国家药品监督管理局注册。检测流程见图 15。

如检测结果有反应, 提示可能 HIV 感染, 应尽快到当地的疾病预防控制中心或医院进行咨询, 并做进一步检测来确定 HIV 感染状态。如检测结果无反应, 提示可能尚未感染 HIV。但如果近期有无保护的高危性行为, 不能排除窗口期感染, 建议一个月后复检。若检测结果无效, 建议采用新的试剂盒重新检测。

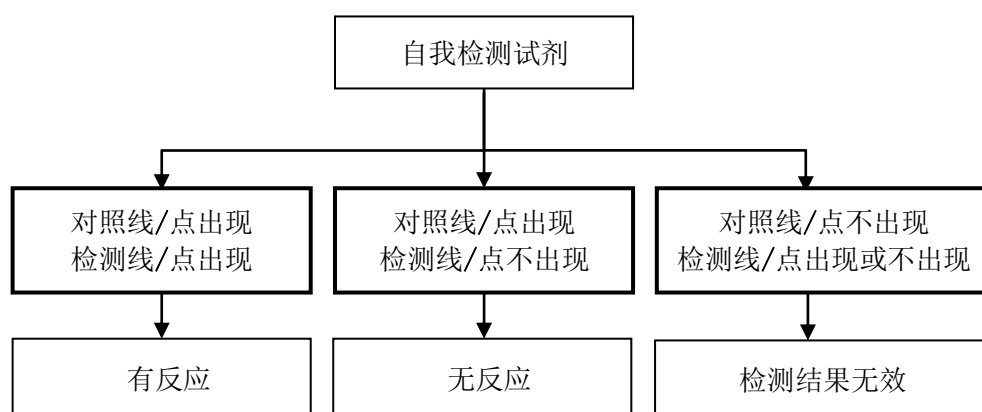


图 15 艾滋病自我检测流程

4.3.2 艾滋病自我采样传递检测是由需要检测的个人获取自我采样服务包，完成样本（尿液或干血斑）采集后，将其通过邮寄或投放到样本回收箱等方式传递至实验室，由专业人员完成检测，自我采样者可通过互联网获取检测结果、咨询和转介服务的一种检测模式。根据自我采集的样本不同，分为 HIV 尿液抗体检测试验，以及干血斑抗体或核酸检测试验。尿液抗体检测试验主要是酶联免疫吸附试验，干血斑抗体检测试验有酶联免疫吸附、胶体金免疫层析法、免疫印迹法，限制性抗原亲和力法等。干血斑核酸检测试验包括 DNA 定性和定量检测，RNA 定性和定量检测。检测流程见图 16。

若检测结果有反应，提示可能感染了 HIV，为其提供自愿咨询检测机构相关信息，引导其尽快到当地的疾病预防控制中心或医院再次采血检测确认。若检测结果无反应，提示可能尚未感染 HIV。但如果近期有无保护的高危性行为，不能排除窗口期感染，建议一个月后重新采样送检。若检测样本不合格，建议立刻重新采样送检。目前干血斑核酸检测多应用于科学研究，作为高危人群的筛查方法，可筛查出更多 HIV 早期感染者。

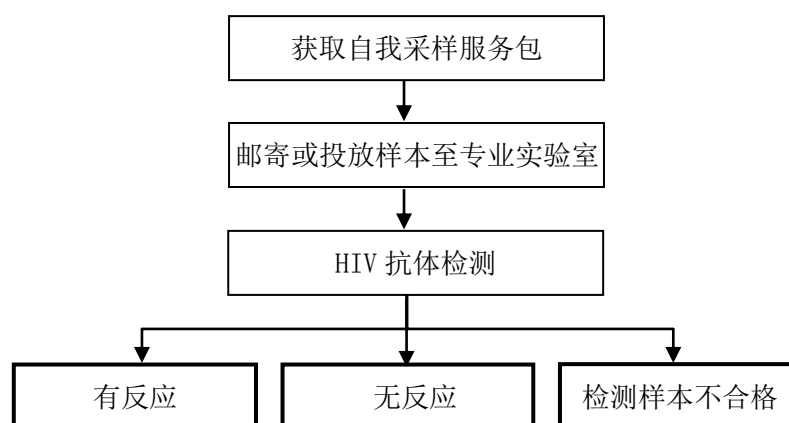


图 16 艾滋病自我采样传递检测流程

参考文献

1. 《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》中华人民共和国卫生行业标准，WS293-2019。
2. 《艾滋病自我检测指导手册（第一版）》，中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心，2019 年。
3. Marc Pitasi. Performance of an Alternative HIV Diagnostic Algorithm Including HIV-1 RNA Viral Load Compared to the CDC/APHL Laboratory

- Diagnostic Algorithm [R].March 26, 2019.
4. 《自我采样传递检测艾滋病指导手册（2018 年版）》，中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心。
 5. 2018 Quick reference guide: Recommended laboratory HIV testing algorithm for serum or plasma specimen.CDC. 2018.
 6. 冯霞，王继宝，田雨等，尿液 HIV-1 抗体检测的临床应用评价，中国艾滋病性病，2016，22（4）：241-243，268.
 7. FDA-Approved HIV Supplemental Test for Laboratory Use Only.Centers for Disease Control and Prevention. 2016.
 8. Consolidated Guidelines on HIV Testing Services. WHO July2015.
 9. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection.US CDC. 2014.
 10. 赫晓霞，马洁琼，程焕义等，干血斑样本用于 ELISA 法检测 HIV 抗体的稳定性研究，中国艾滋病性病，2019，25(3):217-221。
 11. 赫晓霞，马洁琼，程焕义等，干血斑用于 HIV 抗体筛查（免疫层析法）的评价，中国艾滋病性病，2019，25(2):111-114，139。
 12. Kai Chen, Yuehua Wang, Xiaoxia He, Jun Yao, Dongyan Xia, Hongyan Lu, and Yan Jiang. HIV DNA Measurement and Improved Detection of HIV Infection Among Men Who Have Sex with Men:A Strategic Implication. AIDS Research and Human Retroviruses, 2019, 35(10).

第六章 HIV-1 基因型耐药检测

1 范围

本章规定了 HIV-1 基因型耐药检测的意义、检测方法、结果报告及质量控制要求，适用于从事 HIV-1 基因型耐药检测的各级实验室。

2 HIV-1 基因型耐药检测的意义

2.1 个体耐药检测

2.1.1 在抗病毒治疗前进行耐药检测，可辅助临床医生制定抗病毒治疗方案，保证抗病毒治疗的效果。

2.1.2 抗病毒治疗过程中病毒学失败或治疗效果不理想时，进行基因型耐药检测，可辅助临床医生分析治疗失败的原因，并制定补救治疗方案。

2.2 群体耐药监测

2.2.1 治疗前人群的耐药监测

在开始抗病毒治疗前进行基因型耐药检测，了解从未服用抗病毒药物、曾服用抗病毒药物如暴露前/后预防人群、母婴阻断的母亲等即将开始抗病毒治疗人群的耐药情况，可作为制定一线抗病毒治疗和暴露前/后预防用药方案等的参考依据。

2.1.2 获得性耐药监测

在抗病毒治疗 12 个月或以上的人群中进行基因型耐药检测，了解耐药突变比例和模式，分析耐药发生的影响因素，可作为选择制定二线治疗方案和制定减少耐药发生的措施提供参考依据，指导和完善公共卫生模式抗病毒治疗的程序。

2.2.3 婴幼儿耐药监测

在 18 个月龄下的新诊断婴幼儿中进行基因型耐药检测，分析 HIV 感染婴幼儿的 HIV 耐药情况，可作为制一线和二线婴幼儿抗病毒治疗方案的参考依据。

2.2.4 传播性耐药监测

在新近感染人群中的耐药性监测，了解 HIV 耐药毒株传播的情况，可为制定耐药毒株传播的防控措施提供参考依据。

3 HIV-1 基因型耐药检测实验室要求

HIV-1 基因型耐药检测应在满足生物安全和核酸检测要求的实验室中进行

3.1 实验室功能分区

HIV 基因型耐药检测实验室应参照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》附件中“医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则”和《HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南》的要求进行。实验室原则上应分为 4 个独立工作区：试剂准备区、样本处理区、扩增区、扩增产物分析区，并设在不同房间。前两区为扩增前区，后两区为扩增后区。

3.2 实验室人员和要求

HIV-1 基因型耐药检测的人员需具有艾滋病实验室的上岗资格，接受过省级及以上的实验操作技术培训或厂家的培训，并接受过实验室生物安全培训。

3.3 设施和设备

根据检测项目配备相应的设施和设备，并定期对相关仪器和设备进行校验。

4 HIV-1 基因型耐药检测方法程序

4.1 样本

HIV-1 基因型耐药检测可使用血浆、血清、干血斑等样本，其中血浆样本采用抗凝剂为 EDTA（乙二胺四乙酸）或 ACD（枸橼酸钠），不要使用肝素，肝素是 Taq 酶的强抑制剂，且在核酸提取过程中很难除去。

4.2 检测原理

常规 HIV-1 基因型耐药检测采用 RT-PCR 扩增目的基因片段，利用 Sanger 或深度测序法获得相关基因片段的序列，通过与野生型序列和耐药毒株的信息比较，分析耐药相关基因突变，利用基因型耐药解释系统判断是否耐药以及耐药的程度。

4.3 检测方法

目前我国 HIV-1 基因型耐药检测采用商品化试剂盒和实验室自建（In-house）两种方法。

4.3.1 商品化试剂盒通常要求使用血浆样本、病毒载量大于 1000 CPs/毫升；扩增片段包含覆盖完整蛋白酶区（1-99 位氨基酸）和部分逆转录酶区片段（1-335 位氨基酸）和整合酶的基因区域；通过系统自带的软件进行序列编辑和拼接，以 HXB-2 作为参考序列得到待检样本的耐药相关突变位点和耐药程度的报告。

4.3.2 实验室自建（In-house）方法一般使用套式 PCR 方法行两轮扩增。样本类型可以是血浆、血清及干血斑。应根据检测目的基因的序列设计引物，包括逆转录、PCR 扩增和测序引物。根据《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册》，目前临床上常用的药物有三大类，分别为：蛋白酶抑制剂（PIs）、核苷类或核苷酸类逆转录酶抑制剂（NRTIs）和非核苷类逆转录酶抑制剂（NNRTIs）。针对这三类药物，耐药基因型检测需扩增 HIV-1 的 *pol* 基因区，目的基因片段应至少覆盖蛋白酶区 4-99 位氨基酸和逆转录酶区 38-248 位氨基酸的基因区域。针对整合酶链转移抑制剂（INSTI），需扩增片段至少覆盖 50-288 位氨基酸。

4.4 耐药分析

4.4.1 将所测样本序列与数据库中的参考序列或共享序列进行比较，判断是否出现耐药相关的基因突变。

4.4.2 根据 HIV-1 基因型耐药解释系统的规则来评判对特定药物的耐药程度。

4.4.2.1 商业化试剂盒使用与试剂盒配套的 HIV-1 基因型耐药检测的解释系统。

4.4.2.2 In-house 方法通常使用 HIVDB 系统

（<https://hivdb.Stanford.edu/hivdb>），判断耐药相关突变和组合的耐药程度。

4.4.2.3 判断在新近感染人群中是否存在传播性耐药突变，使用 CPR 工具（CPR, <http://cpr-v.stanford.edu/cpr/servlet/CPR>）。

4.5 结果报告和解释

4.5.1 耐药相关的基因突变

应分基因区报告耐药相关的基因突变，如将蛋白酶（PR）、逆转录酶（RT）和整合酶（IN）三个基因区的耐药基因突变分开报告（见附表 8）。基因突变以“字母—数字—字母”的书写方式来表示，第一个字母代表野生型病毒株特定密码子处的氨基酸，第二个字母代表在特定密码子处替换了的氨基酸。

4.5.2 耐药程度分析

商业化试剂盒使用与试剂盒配套的 HIV-1 基因型耐药检测的解释系统进行分析与报告。实验室自建（In-house）方法通常用斯坦福大学 HIV 耐药解释系统（HIVDB）进行分析与报告，HIVDB 系统将耐药程度分为敏感（S）、潜在耐药（P）、低度耐药（L）、中度耐药（I）和高度耐药（H）五个水平，将后 3 个水平判断为耐药。

4.5.3 当耐药毒株在个体内病毒准种中的比例低于 10~20%时，利用 Sanger 测序法通常检测不到其存在，因此未检出耐药突变时，只可报告本次实验结果为“未发现耐

药”，不可报告为“敏感”。不排除比例较低的耐药毒株存在。

5 质量保证与质量控制

质量保证的目的是持续为监测及检测提供准确可靠的检测结果，包括从样本接收到发出检测报告的全过程。质量控制包括室内质量控制（室内质控）和外部质量控制（外部质控）。

5.1 室内质控

5.1.1 检测过程质量控制

5.1.1.1 使用商品化试剂盒时，需按照要求加入试剂盒提供的阳性对照和阴性对照质控品。

5.1.1.2 使用 In-house 方法时，应设立阳性、阴性和空白对照。阳性对照为与待测样本同质、含有目的基因片段的样本；阴性对照为与待测样本同质、不含有目的基因片段的样本；空白对照为不含模板的扩增试剂。

5.1.1.3 从样本核酸提取开始加入阴性和阳性对照，每次检测应至少加入一个阴性对照和一个阳性对照，建议阴性对照与待测样本的比例不小于 1:22，其中阴性对照应随机放置在待检样本中。从逆转录（RT）反应开始加入空白对照。

5.1.1.4 将同一批次和上一批次检测所产生的序列，以及阳性对照序列进行比对，并构建分子进化树，以判断是否发生污染。

5.1.1.5 只有在阳性对照扩增出预期片段，阴性对照和空白对照没有任何扩增片段，并且分子进化树分析没有交叉污染的情况下，实验才成立。

5.1.2 试剂质量控制：试剂批号变更时，可增加阳性对照数量，将本次试验阳性对照的结果与已知结果进行比较，以检验试剂的可靠性和稳定性。

5.1.3 定期进行实验室内部质量评价：一是随机选择经耐药基因型检测过的样本，交实验操作者进行盲样检测，比较序列以及耐药位点图谱。扩增效率低、序列或耐药位点不一致，表示测定的重复性差，应检查所有的实验步骤与试剂性能。二是对所有测定的耐药原始图谱序列文件妥善备份于实验室电脑中，用于耐药序列质量数据核查和实验室内部人员序列比对核查。

5.2 外部质控

开展 HIV-1 耐药检测的实验室每年至少接受两次国家级实验室能力验证（PT），通过考核后方可进行检测。有条件的实验室可参加国际认可机构的质控，具体参见

《HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南》。

参考文献

1. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. DHHS, USA, 2019.
2. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Top HIV Med, 2019.
3. 中国艾滋病诊疗指南（2018 版），中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组，中国疾病预防控制中心，2018。
4. Global action plan on HIV drug resistance 2017–2021, World Health organization, 2017.
5. 《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册（第四版）》（人民卫生出版社，2016 年）。
6. 《HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南》，（中国疾病预防控制中心，2013 年版）。
7. Global Strategy for the Surveillance and Monitoring of HIV Drug Resistance, WHO, 2012.
8. 卫生部关于印发《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》的通知（卫办医政发 2010]194。
9. 《HIV 耐药监测策略和检测技术》人民卫生出版社，2010 年。
10. 《病原微生物实验室生物安全管理条例》（中华人民共和国国务院令第 424 号，2004 年 11 月 12 日）。

第七章 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测

1 范围

本章规定了 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测的意义、检测方法、结果报告及质量控制要求。适用于从事相关检测的各级艾滋病检测实验室。

2 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的意义

2.1 HIV 感染免疫状态和临床分期

CD4+T 淋巴细胞计数是了解基线免疫状况的重要指标，也是抗病毒治疗后免疫功能重建的重要实验室指标。CD4+T 淋巴细胞绝对数值和百分比分别是成人及 15 岁（含 15 岁）以上青少年、15 岁以下儿童 HIV/AIDS 临床分期标准的主要指标之一。成人及 5 岁以上儿童和青少年，CD4+T 淋巴细胞计数数量可提示有无免疫缺陷以及轻度、中度、重度免疫缺陷；5 岁及以下儿童，CD4+T 淋巴细胞在外周血淋巴细胞中的百分比数量可提示有无免疫缺陷以及轻度、中度、重度免疫缺陷。

2.2 疾病进展监测

基线和持续 CD4+T 淋巴细胞检测，可以观察疾病发展状况和评价治疗效果。我国建议 CD4+T 淋巴细胞计数 >350 个 / μL 的（无症状）HIV 感染者，每 6 个月应检测 1 次；已接受 HAART 患者在治疗的第 1 年内每 3 个月检测 1 次；治疗 1 年以上且病情稳定的患者可改为每 6 个月检测 1 次。对于 HAART 后患者体内病毒被充分抑制，CD4+T 淋巴细胞计数长期处于稳定水平的患者，CD4+T 淋巴细胞计数在 $300\sim 500$ 个 / μL 的患者，建议每 12 个月检测 1 次； >500 个 / μL 的患者可选择性进行 CD4+T 淋巴细胞检测。对于发生病毒学突破患者、出现艾滋病相关临床症状的患者、接受可能降低 CD4+T 淋巴细胞治疗的患者则需再次进行定期 CD4+T 淋巴细胞检测。

2.3 机会性感染的风险评估

机会性感染是艾滋病患者死亡的主要原因，CD4+T 淋巴细胞可评估 HIV 感染者机会性感染的风险，辅助判断是否进行预防性治疗（如当 CD4+T 淋巴细胞 $<200/\mu\text{L}$ 时，应给予抗肺孢子菌肺炎等的预防性治疗）。

2.4 抗病毒治疗适应症选择及疗效评价

CD4+T 淋巴细胞计数 ≤ 350 个/ mm^3 ；WHO 分期 III、IV 期疾病；合并活动性结核；合

并活动性乙型肝炎，需要抗乙肝病毒治疗；HIV 相关肾脏疾病；妊娠；配偶和性伴 HIV 感染的一方等，应该优先尽快提供抗病毒治疗。

所有 HIV 感染的婴幼儿和儿童，无论 WHO 临床分期或 CD4+T 淋巴细胞计数水平，均应启动抗病毒治疗。

CD4+T 淋巴细胞数量是抗病毒治疗后免疫功能重建的重要实验室指标，治疗后定期检测 CD4+T 淋巴细胞数量，可判断免疫系统恢复情况。

2.5 免疫重建监测

CD8+T 淋巴细胞为抑制性/细胞毒性 T 细胞，HIV 感染者 CD8+T 细胞数量会增加，导致 CD4/CD8 比值下降。CD4+ / CD8+T 淋巴细胞比值倒置可在长期 HAART 后出现不同程度的改善，其变化提示患者的治疗效果和免疫功能重建状态。

3 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测实验室要求

3.1 人员

3.1.1 进行 HIV/AIDS 患者 CD4+T 淋巴细胞检测人员应接受过省级以上艾滋病实验室安全、检测技术和质量控制培训以及仪器厂家提供的培训。

3.1.2 进行 HIV/AIDS 患者 CD4+T 淋巴细胞检测的人员需具有上岗资格。正式检测患者样本前，应检测一定数量的样本或者质控品，将检测结果与省中心实验室结果进行比对，由确证中心实验室评价其检测能力，检测结果准确、稳定后方可检测。

3.1.3 CD4+T 淋巴细胞检测的管理人员和检测人员接受实验室生物安全责任人和实验室管理人员的监督。

3.1.4 实验室的安全责任人要对工作秩序和环境的安全负责，所有工作人员都有责任保护自己和他人的安全。

3.2 功能分区

实验室原则上应分为样本准备区和样本检测区，各区的功能为：

样本准备区应达到生物安全 II 级（BSL-2）实验室要求，用于样本制备。

样本检测区用于制备好的样本在流式细胞仪上检测。

3.3 设施和设备

3.3.1 样本准备区：生物安全柜、离心机、冰箱、恒温孵箱/水浴箱、旋转振荡器、精确移液器（5 μ l～50 μ l、20 μ l～200 μ l、200 μ l～1000 μ l）。

3.3.2 样本检测分析区：流式细胞仪或 CD4 检测分析仪及配套设备、打印机。

4 常规 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞检测的方法和程序

4.1 样本采集、运输和接收

4.1.1 样本采集

4.1.1.1 选择合适的抗凝剂，用于血液学检测或流式细胞仪的免疫表型检测。

(1) 用于血液学检测的抗凝剂： K_3EDTA 或 K_2EDTA 抗凝管，在血球分析仪生产商允许的样本采集时间范围内检测。

(2) 用于流式细胞仪免疫表型检测的抗凝剂： K_2EDTA 、 K_3EDTA 、酸性枸橼酸葡萄糖溶液（ACD）或肝素抗凝。一般要求 48 小时内染色，染色后 6 小时内检测分析。如采血后 24 小时内染色，则可在染色后 24 小时内分析。如果利用 CD45 单克隆抗体和侧向光设淋巴细胞门，可检测放置 72 小时的样本。

4.1.1.2 采血管上注明样本编号、采集日期等信息。

4.1.1.3 采集静脉血，注入已加入适当抗凝剂的采血管（有条件者最好用真空采血管）。采血后立即握住试管两端，垂直颠倒混匀数次，防止血液凝固。

4.1.2 样本运输

4.1.2.1 运输感染性样本至检测地点应符合国家《病原微生物实验室生物安全管理条例》相关要求。

4.1.2.2 在室温（18~25℃）保存和运输样本，避免极端温度（结冰或大于 37℃）。高温季节，需用隔热容器盛装样本，并将其置于有冰袋和吸热物质的容器中。

4.1.3 样本接收及保存

4.1.3.1 专人接收样本，检查样本质量、数量并核对标识。

4.1.3.2 溶血、凝血或结冰的样本应视为不合格样本，需重新采样；超过检测允许时间的样本不可检测。

4.1.3.3 如果样本运输过程中温度超出室温范围（18~25℃），但没有明显的溶血或结冰，可以处理样本，但不能立即加热或冷冻样本使其达到室温，否则会影响免疫表型检测结果，应在工作表的报告上注明温度条件。

4.1.3.4 用于 CD4⁺T 淋巴细胞检测的全血应保存在室温，48 小时之内完成检测。如果用 CD45 圈门，可延长保存时间至 72 小时。

4.2 方法

目前，CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞计数的方法分为两大类：一类是流式细胞仪测定法，

另一类是非流式细胞仪测定法。常用的淋巴细胞计数检测方法为自动检测方法，包括流式细胞仪（主要有双平台法和单平台法）和专门的细胞计数仪。

4.2.1 流式细胞仪检测方法

4.2.1.1 双平台方法是一种细胞群体的绝对计数方法，先利用血球计数仪检测淋巴细胞数量，再根据流式细胞仪得到的细胞群体百分比，计算得出每微升的全血中淋巴细胞数量，这种方法叫做双平台方法。双平台法需要两种仪器，由于仪器有系统误差，计算结果的重复性和准确性影响因素较多，用这种方法进行 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞计数时，不同实验室差异较大。这种方法缺点在于操作步骤复杂，操作人员多、费时，因此，很难将变异水平减小到最低。

4.2.1.2 单平台方法是相对双平台法而言的，单平台可应用三色、四色流式等试剂配以内参绝对计数微球，加上流式细胞仪淋巴细胞亚群获取和分析软件，一步即可获得 T 细胞亚群的相对数（百分比）和绝对数。通过使用已知数量的参考微球为内参，可以直接报告淋巴细胞绝对计数，即通过获取的目标细胞与参考微球的比例、参考微球数量和样本体积，得到每微升全血中的淋巴细胞数量。单平台法也可不使用参考微球，用体积法直接获得 CD4 细胞绝对数。单平台法最大程度地减少了多个仪器检测带来的检测误差，细胞绝对计数结果的重复性和准确性都能得到了良好的保证。

4.2.2 非流式细胞仪测定法

4.2.2.1 Cyto-Spheres 方法 CD4⁺计数试剂盒包含 CD4⁺微球试剂，即包被有单克隆抗体的惰性乳胶微球，可以通过光学显微镜鉴别和手工计数新鲜全血中 CD4⁺T 淋巴细胞的绝对数。其原理是人和动物的 T 淋巴细胞表面有红细胞受体，因此红细胞可以粘附到 T 淋巴细胞的周围而形成玫瑰花样的细胞团。计数玫瑰花簇的数量即可得知淋巴细胞的数量。在红细胞中，以绵羊红细胞最为常用。

4.2.2.2 Dynabeads 方法以免疫磁珠细胞分离方法为基础，使用包被 CD4⁺和 CD8⁺抗体的 Dynabeads 磁珠，从全血中捕获分离 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞；同时用另一种 CD14 微球用来阻隔单核细胞。用龙胆紫和胎盘兰染色分离出来的 CD4⁺T 淋巴细胞，在光学显微镜下或自动细胞计数仪上计数。

4.2.2.3 荧光免疫成像技术是不同荧光染料标记的 CD3⁺和 CD4⁺等抗体与血液中相应的受体结合，通过特定的软件以及成像系统，仪器会自动分析并计数样本中的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对值和百分比。

4.3 试剂

4.3.1 荧光素标记的单克隆抗体

用荧光素标记的单克隆抗体，CD45、CD3、CD4、CD8。

4.3.2 单抗对细胞的反应性

CD45 表达于所有白细胞；CD3 表达于 T 淋巴细胞；CD4 表达于 T 辅助/诱导淋巴细胞(CD4+T 细胞)和单核细胞；CD8 表达于细胞毒 T 细胞 (CD8+T 细胞) 和单核细胞。

4.4 实验资料的记录

4.4.1 及时、准确地记录实验结果。

4.4.2 实验记录中应包括以下内容：样本性状、采样和检测日期、检测仪器型号，试剂及效期、实验内容、过程（步骤）、结果、检测者、复核者、及有无事故等。

4.4.3 所有实验资料应统一由专人负责，按固定格式记录在案。

4.4.4 计算机生成的实验结果，存档备案；定期将计算机结果文档备份并备案保存。

4.5 结果报告

4.5.1 多平台法用淋巴细胞总数（来自于 WBC 及分类）乘以淋巴细胞亚群百分率（从流式细胞仪数据中得到），计算绝对数值。

4.5.2 单平台法由计算机软件直接出结果并打印出报告单，报告单的内容包括（不限于）如下结果：CD45+ Abs Cnt；CD3+%Lymph；CD3+Abs Cnt；CD3+CD4+%Lymph；CD3+CD4+Abs Cnt；CD3+CD8+%Lymph；CD3+CD8+ Abs Cnt；CD3+CD4+%T Lymph；CD3+CD8+%T Lymph；CD4/CD8(Th/Ts) 及其正常参考值范围。

4.5.3 结果报告单中应附有正常值参考范围（例如，CD4+T 淋巴细胞绝对数和百分数）。注意用于 CD4+T 淋巴细胞检测的不同仪器有不同的正常参考值范围，成人及不同年龄段儿童正常值范围亦不相同。最好由国家或省市级实验室建立当地人群的成人和儿童正常值参考范围以供参考。按照实验结果填写 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测报告单，单平台法检测结果报告格式参见附表 5。

4.5.4 报告单经检测者、复核者和签发者签字，加盖检验单位公章后发出。应在检测完成后 3 个工作日内发出报告。

4.5.5 报告发放时，可经挂号邮寄或直接交给送检人。

5 质量控制

CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的质量控制包括室内质量控制（简称室内质控）和外

部质量控制（简称外部质控）。见 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测质量控制流程图 17。

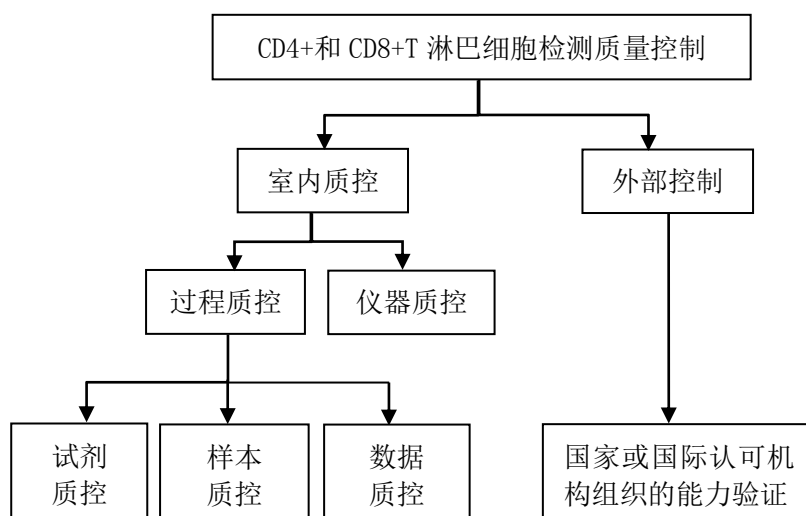


图 17 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测质量控制流程图

5.1 室内质控要求工作人员做好仪器质控和过程质控。

5.1.1 仪器质控为应用仪器生产厂家的质控品校准仪器，每次开机应先进行仪器质控品检测，质控品通过测试后方可检测样本。

5.1.2 过程质控主要包括试剂质控、样本质控和数据质控。

5.1.2.1 试剂质控是经国家药品监督管理局注册、在有效期内的试剂。

5.1.2.2 样本质控包括正确的样本采集、运输、接收、贮存、处理、分析方法以及室内质控的应用。购买外部质控品或用稳定的全血样本进行室内质控。通过每日绘制质控图检查实验质量，帮助分析和判断样本处理、仪器的准备和分析是否均处于最佳状态。

5.1.2.3 数据质控包括正确的数据分析、结果报告、数据储存及对数据的可靠性分析。

5.2 外部质控是有组织地系统质控测量。是由具有外部考核经历，并且检测质量获得改进的实验室之间进行相互质量参比，从而提高实验室结果的可比性，确保在所有实验室都有良好的高度一致的结果。国家艾滋病参比实验室负责制订和发展外部质控相关技术标准，并负责组织检验能力验证（PT）计划的实施，每年至少 1 次。有条件的实验室可参加国际认可机构组织的能力验证。具体参见《艾滋病病毒感染者及艾滋病患者 CD4+T 淋巴细胞检测及质量保证指南》第七章，实验室能力验证。

参考文献

1. 《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》（中华人民共和国卫生行业标准，WS-293-2019）。
2. 《中国艾滋病诊疗指南 2018》，中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组中国疾病预防控制中心。
3. 《病原微生物实验室生物安全管理条例》（2018 修订版）。
4. 《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册》（第四版）（人民卫生出版社，2016 年）。
5. 《艾滋病病毒感染者及艾滋病患者 CD4⁺T 淋巴细胞检测及质量保证指南（试行）》（中国疾病预防控制中心，2013 年 8 月）。
6. 《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》（中华人民共和国卫生行业执业标准 WS/T360-2011）。
7. Laboratory Guidelines for enumerating CD4⁺T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS. World Health organization Regional Office for South-East Asia New Delhi, June 2007.

第八章 HIV-1 的分离培养

1 范围

本章规定了 HIV-1 体外分离培养的方法和用途。适用于对人血液和其他样本中 HIV 的分离培养。

2 HIV-1 分离培养的意义

2.1 HIV 抗体不确定或 HIV-1 阳性母亲所生婴儿的诊断及鉴别诊断。

2.2 HIV 表型耐药检测及其他 HIV 生物学特征的研究。

2.3 HIV 感染的辅助诊断。

3 实验室要求

3.1 实验室：经过认可的生物安全 3 级实验室。

3.2 设备：生物安全柜、二氧化碳培养箱、倒置显微镜、离心机（配水平转头及密闭水平型转子）、压力蒸汽灭菌器、液氮罐、-80℃冰箱、酶标仪等。

3.3 样本及试剂：HIV 阴性者抗凝全血、淋巴细胞分离液、细胞培养液（RPMI1640）、胎牛血清、白细胞介素-2（IL-2）、植物血凝素（PHA）、HIV-1p24 抗原检测试剂或逆转录酶检测试剂。

3.4 耗材：细胞培养瓶、细胞培养板、吸管等。

4 HIV-1 分离培养的方法及程序

一般采用靶细胞（HIV 阴性者外周血淋巴细胞，PBMC）与受检者样本（PBMC、全血、血浆、精液及其他体液）共培养的方法，最常用的方法是 PBMC 共培养。

4.1 样本：首选 PBMC，也可以使用全血、血浆、精液及其他体液。

4.2 靶细胞制备：取 HIV 阴性者的抗凝全血，采用密度梯度离心的方法分离 PBMC，并在含有适量天然白介素-2（IL-2）和植物血凝素（PHA-P）的培养基中培养 3 天，使淋巴细胞由静止状态充分活化。

4.3 建立共培养：将靶细胞与待检样本混合，在合适的条件下培养，培养过程中适时换液或补加新鲜靶细胞，维持培养 28 天。

4.4 监测病毒生长：定时取适量培养上清液，检测 HIV-1p24 抗原或逆转录酶活性。也可定期观察细胞的形态，看有无 HIV 特征性的合胞体或其他细胞病变。

4.5 病毒鉴定：取培养上清液提取纯化 RNA，或取共培养的 PBMC 提取纯化基因组 DNA，用 PCR 方法扩增 HIV-1 特征性基因片段，对扩增阳性的片段进行基因序列测定。

4.6 判定结果和解释

4.6.1 培养上清液 p24 抗原或逆转录酶连续 2 次呈阳性反应、并有 p24 抗原含量/逆转录酶活性升高，或同时出现 HIV 特征性细胞病变，并经鉴定为 HIV 基因序列，判为 HIV-1 分离阳性。

4.6.2 培养上清液 p24 抗原或逆转录酶始终为阴性，判为 HIV-1 分离阴性。

4.6.3 HIV-1 分离培养阳性可以确证为 HIV-1 感染，分离培养阴性不能排除 HIV-1 感染。

5 质量控制

5.1 技术人员应接受 HIV 分离培养技术操作和生物安全 3 级实验室使用的专门培训，掌握基本的细胞培养技术。

5.2 必须在生物安全 3 级实验室的生物安全柜内操作，使用塑料的细胞培养瓶和吸管，遵守生物安全操作规程。

5.3 受检者样本必须无菌，培养过程中注意无菌操作。

5.4 制备靶细胞时使用多人 PBMC 混合，去除受检者 PBMC 中的 CD8+T 细胞有助于提高分离成功率。

5.5 可同时接种一株 HIV-1 原代毒株，以证明实验方法的可靠性。

6 生物安全

6.1 所有操作应在生物安全柜内进行；实验人员应按要求佩戴合适的防护用品；避免使用利器。

6.2 抽取静脉血液（或以其它方式收集血液样本）时要注意安全，应使用一次性注射器，戴手套，谨慎操作，防止血液污染双手。

6.3 离心样本时要使用密闭的转子，防止离心时液体溢出或在超/高速离心时形成气溶胶。离心后密闭的转子应在生物安全柜内打开，取出样本，以防气溶胶的产生；操作样本时应轻拿轻放，避免溅洒。

6.4 操作过程中如有样本、检测试剂外溅，应及时消毒。如有大量高浓度的传染性液体溅出，在清洁之前应先用 1% 的次氯酸钠溶液浸泡，然后戴上手套擦净。

6.5 培养皿或培养瓶放在一个塑料盒中进行传递，避免溢洒。当有培养物在传递过程中溢洒时，应立即用纸巾覆盖受培养物污染的物品以及溢出的培养物，然后在上面倒上 0.5% 次氯酸钠，至少浸泡 30 分钟，再将纸巾及损坏物品清理掉。然后再用 0.5% 次氯酸钠消毒剂擦拭污染区域。

参考文献

1. Dispinseri S., Saba E., Vicenzi E., Kootstra N. A., Schuitemaker H., Scarlatti G. (2014) HIV-1 Isolation from Infected Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Vicenzi E., Poli G. (eds) Human Retroviruses. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ. vol 1087.
2. NIAID, DAIDS Virology Manual for HIV Laboratory, NIH Publication, No. 97-3828.
3. Tsai WP1, Conley SR, Kung HF, Garrity RR, Nara PL. Preliminary in vitro growth cycle and transmission studies of HIV-1 in an autologous primary cell assay of blood-derived macrophages and peripheral blood mononuclear cells. Virology. Dec. 1996. 15;226(2):205-16.

附表 1

HIV 筛查检测报告

编号：

送检单位				送检日期	年 月 日		
送检样本	全血 ☐ 血浆 ☐ 血清 ☐ 口腔黏膜渗出液 ☐ 尿 ☐ 其它：			送检人群			
姓名		性别		年龄		职业	
国籍		民族		婚姻状况		文化程度	
身份证					联系电话		
现住址	____省____市____县____乡（镇、街道）____村____（门牌号）						
户籍地址	____省____市____县____乡（镇、街道）____村____（门牌号）						
	筛 查		复检（第一次）		复检（第二次）		
检测方法	ELISA ☐ PA ☐ 化学发光 ☐ RT ☐ 免疫荧光 ☐ 其它实验：_____		ELISA ☐ PA ☐ 化学发光 ☐ RT ☐ 免疫荧光 ☐ 其它实验：_____		ELISA ☐ PA ☐ 化学发光 ☐ RT ☐ 免疫荧光 ☐ 其它实验：_____		
检测日期	年 月 日		年 月 日		年 月 日		
试剂厂家							
批 号							
有效日期							
检测结果	有反应 ☐ 无反应 ☐		有反应 ☐ 无反应 ☐		有反应 ☐ 无反应 ☐		
筛查结论	HIV 抗体待确定 ☐ HIV 抗原待确定 ☐ HIV 感染待确定 ☐ HIV 抗体阴性 ☐						
报告日期	年 月 日						
检测者				签发者			
检测单位（公章）：				备注：			

附表 2

HIV 抗体确证检测报告

编号：

送检单位				送检日期		年 月 日	
送检样本		血浆 ☐ 血清 ☐ 其它：_____		送检人群			
姓名		年龄		性别		职业	
国籍		民族		婚姻 状况		文化 程度	
身份证号						联系电话	
现住址		_____省_____市_____县_____乡（镇、街道）_____村_____（门牌号）					
户籍地址		_____省_____市_____县_____乡（镇、街道）_____村_____（门牌号）					
检测方法		检测结果（带型）		日期	厂家	批号	效期
WB							
RIBA/LIA							
其他							
结论		阳性 ☐ 阴性 ☐ 不确定 ☐					
检测者		复核者		签发者		报告 日期	年 月 日
检测单位（公章）				备注：			

附表 3

HIV-1 核酸检测报告

编号：

送检单位				送检日期		年 月 日	
样本类型		血浆 ☐ 血清 ☐ 全血 ☐ 干血斑 ☐		人群			
姓名		年龄		性别		职业	
国籍		民族		婚姻状况		文化程度	
身份证号						联系电话	
现住址		____省____市____县____乡（镇、街道）____村____（门牌号）					
户籍地址		____省____市____县____乡（镇、街道）____村____（门牌号）					
检测方法		检测结果				日 期	
核酸定性		阳性 ☐ 阴性 ☐					
		阳性 ☐ 阴性 ☐					
核酸定量		Copy/ml (IU/ml)，参考值（检测限）					
		Copy/ml (IU/ml)，参考值（检测限）					
检测者		复核者		签发者		报告日期	年 月 日
检测单位（公章）						备注	

附表 4

HIV 抗体确证检测报告（特定条件）

编号：

送检单位				送检日期	年 月 日		
送检样本				送检人群			
姓名		性别		年龄		职业	
婚姻状况		民族		国籍		文化程度	
身份证号	□□□□□□□□□□□□□□□□					联系电话	
现住址	____省____市____县____乡（镇、街道）____村____（门牌号）						
户籍地址	____省____市____县____乡（镇、街道）____村____（门牌号）						
检测方法、试剂		日期		检测结果			
试剂 1							
试剂 2							
试剂 3							
结论		阳性□ 阴性□					
检测者		复核者		签发者		报告日期	年 月 日
检测单位（公章）				备注			

附表 5

CD4+CD8+T 淋巴细胞检测报告

编号:

基本信息						
送检单位				送检日期/ 采样日期	年 月 日/ 年 月 日	
姓 名		性别		年 龄		
检测日期	年 月 日			报告日期	年 月 日	
试剂及仪器情况						
流式细胞仪 型号				试剂名称		
试剂批号				试剂有效期		
检测结果						
使用抗体 CD3/CD8/CD45/CD4 或 CD3/CD4/CD45/、CD3/CD8/CD45						
CD3+ %Lymph	CD3+ Abs Cnt	CD3+CD4+ % Lymph	CD3+CD4+ Abs Cnt	CD3+CD8+ % Lymph	CD3+CD8+ Abs Cnt	CD4/CD8 (Th/Ts)
使用抗体 CD4/CD8/CD3						
CD3+ Abs Cnt	CD3+CD4+ %T Lymph	CD3+CD4+ Abs Cnt	CD3+C8+ %T Lymph	CD3+CD8+ Abs Cnt	CD4/CD8 (Th/Ts)	
参考范围:						
检测者		复核者		签发者		
检测单位（公章）：				备注：		

附表 6

HIV-1 耐药基因型检测报告

编号：

送检单位				送检日期	年 月 日		
样本类型				人群			
姓名		性别		年龄		职业	
身份证	□□□□□□□□□□□□□□□□						
检测方法				耐药解释系统			
检测日期	年 月 日						
基因区	耐药相关基因突变			抗病毒药物	耐药程度		
蛋白酶区 (PR)	主要突变： 次要突变：			阿扎那韦 (ATV)			
				地瑞那韦 (DRV)			
				夫沙那韦 (FPV)			
				茚地那韦 (IDV)			
				克力芝 (LPV/r)			
				奈非那韦 (NFV)			
				沙奎那韦 (SQV)			
				替拉那韦 (TPV)			
逆转录酶区 (RT)	核苷 (酸) 类 逆转录酶抑制 (NRTI) 相关		拉米夫定 (3TC)				
			阿巴卡韦 (ABC)				
			齐多夫定 (AZT)				
			司他夫定 (d4T)				
			地丹诺辛 (ddI)				
			恩曲他滨 (FTC)				
			替诺福韦酯 (TDF)				
	非核苷类逆转 录酶抑制剂 (NNRTI) 相关		依非韦仑 (EFV)				
			Etravirine (ETR)				
			奈韦拉平 (NVP)				
			Rilpivirine (RPV)				
整合酶区 (IN)	整合酶链转移 抑制剂 (INSTI) 相关		Bictegravir (BIC)				
			多替拉韦 (DTG)				
			艾维雷韦 (EVG)				
			拉替拉韦 (RAL)				
其他							
检测者		签发者		报告日期	年 月 日		
检测单位 (公章)				备注: 本结果仅提供耐药性参考, 病人对药物的耐受情况需接合临床情况具体分析。			

附表 7

婴儿艾滋病病毒感染早期诊断检测报告

婴儿编号：

编号：

送检机构名称		送检机构联系人	
样本寄出日期		样本收到日期	
婴儿母亲姓名		婴儿姓名	
婴儿性别		婴儿出生日期	
检测情况			
检测日期			
检测方法			
试剂厂家			
批号			
试剂有效日期			
检测结果			
检测者		复合者	
实验室负责人（签字或盖章）：		签发者	
备注：			

附件 1

输入性 HIV 抗体检测及流程

1 范围

本附件规定了输入性 HIV 抗体的检测方法，适用于人体输入 HIV 抗体阳性的血浆或血液成分、免疫球蛋白或其他血液制品时，对接受者、提供者和制品的检测。

2 检测的意义

- 2.1 判断是否输入了 HIV 抗体
- 2.2 判断输入性 HIV 抗体在体内的动态
- 2.3 判断是否发生了 HIV 感染

3 实验室要求

同 HIV 抗体检测和 HIV 核酸检测

4 检测方法及程序

4.1 HIV 抗体或 HIV 抗体和抗原筛查检测

4.1.1 目的：检测有无 HIV 抗体输入及输入抗体的动态变化。

4.1.2 试剂：一般采用 HIV 抗体/抗原联合检测试剂，也可采用 HIV 抗体检测试剂，包括酶联免疫吸附实验方法、化学发光实验方法。应经过国家食品药品监督管理局的批准注册。

4.1.3 样本：1) 接受者的血清或血浆，应在输入基线（输入后立即）、输入后 4-6 周和输入后 3 个月采集样本；2) 提供者的血清或血浆，应在最靠近提供血液的时间点采集血液样本；3) 输入物，包括血浆、红细胞等血液成分；免疫球蛋白等血液制品。

4.1.4 定性检测：采用酶联免疫法或者化学发光法试剂盒，用夹心法原理检测 HIV-1 M 群、O 群、HIV-2 的抗体和 HIV-1p24 抗原。按照试剂盒说明书操作并判断结果，有效实验的阳性和阴性对照应符合试剂盒说明书的规定。应对三类样本分别进行检测，比较各类样本和不同时间点的结果，应始终使用同样的方法和同一个厂家的试剂。

4.1.5 半定量检测：将样本用 HIV 抗体阴性的人血浆或者其他与待检样本同质的 HIV 抗体阴性的基质液进行连续稀释，一般采用对倍稀释法（稀释倍数为 2^0 、 2^{-1} 、 2^{-2} 、 2^{-3} 、 2^{-4} 、 2^{-5} 、 2^{-6} ……）。将稀释后的样本用以上方法进行检测，确定 HIV 抗体阳性样本的最大稀释度，得到 HIV 抗体的滴度。

4.2 HIV 抗体确证检测：

4.2.1 目的：检测有无 HIV 抗体输入及输入抗体的动态变化。

4.2.2 试剂：可采用 HIV 抗体的免疫印迹（WB）试剂或者线性免疫印迹（LIA）试剂，应经过国家食品药品监督管理局批准注册。

4.2.3 样本：1）接受者的血清或血浆，应在输入基线（输入后立即）、输入后 4-6 周和输入后 3 个月采集样本；2）提供者的血清或血浆，应在最靠近提供血液的时间点采集血液样本；3）输入物，包括血浆、红细胞等血液成分；免疫球蛋白等血液制品。

4.2.4 定性检测：按照试剂盒说明书操作，根据说明书提供的标准记录检测的带型，判断 HIV 抗体阳性、不确定或阴性。

4.3 HIV 核酸检测：

4.3.1 目的：判断输入物是否具有感染性以及接受者是否被 HIV 感染。

4.3.2 试剂：可采用 HIV 定性或定量检测试剂，应经过国家食品药品监督管理局批准注册。

4.3.3 样本：1）接受者的血浆，应在输入基线（输入后立即）、输入后 4-6 周和输入后 3 个月采集样本；2）提供者的血浆，应在最靠近提供血液时采集血液样本；3）输入物，包括血浆、红细胞等血液成分；免疫球蛋白等血液制品。

4.3.4 定性检测：采用各种核酸检测技术定性检测 HIV-1RNA 或 HIV-1 前病毒 DNA，按照说明书操作，结果判断为阳性或阴性。

4.3.5 定量检测：采用各种核酸检测技术定量检测 HIV-1RNA，按照说明书操作。如 HIV-1RNA 未检出即为<LDL；如 HIV-1RNA 可检出应记录检测的数值。

5 结果解释和报告

5.1 有无 HIV 抗体输入：输入后基线的样本，HIV 抗体检测试剂（或 HIV 抗体/抗原检测）和 HIV 抗体免疫印迹（WB）试剂（或 HIV 抗体线性免疫印迹（LIA）试剂）检测的结果满足 HIV 抗体阳性判断标准，为 HIV 抗体阳性，结合既往的检测结果，判断

有无 HIV 抗体输入。

5.2 HIV 抗体发生衰减：检测输入基线（输入后立即）、输入后 4-6 周和输入后 3 个月的样本，HIV 抗体滴度下降和 HIV 抗体免疫印迹（或条带免疫印迹）试剂检测条带减少，为 HIV 抗体发生衰减。

5.3 输入物有无感染性：输入物 HIV 核酸阳性为有感染性。HIV 核酸定性检测符合试剂盒说明书提供的阳性判断标准；或 HIV 核酸定量检测 HIV-1RNA 可检出。

5.4 接受者是否被 HIV 感染：接受者基线样本为 HIV 核酸阴性，输入后 4-6 周和输入后 3 个月的样本转变为 HIV 核酸阳性。同时，HIV 抗体持续阳性、滴度升高。

6 质量控制

6.1 调整 pH 值：人免疫球蛋白制品的 pH 值为 4.0，需要调整到生理 pH 值。

6.2 调整蛋白浓度：血液制品的蛋白浓度往往高于血浆，需要适当稀释，达到血浆的蛋白浓度。

6.3 全面设置对照：目前没有国家批准的用于检测血液制品的试剂盒，只能使用适用于血浆的试剂盒。为了确保结果准确，应该设置全面的对照，包括相同批号的制品、相邻批号和远离批号的制品、同一厂家和不同厂家的制品等。

6.4 其他质量控制措施：同“HIV 抗体检测”和“HIV 核酸检测”。

参考文献

1. Time Until Emergence of HIV Test Reactivity Following Infection With HIV-1: Implications for Interpreting Test Results and Retesting After Exposure. *Clinical Infectious Diseases* 2017;64(1):53 - 9.
2. Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers, *Sex Transm Dis.* December 2017;44(12): 739 - 746.
3. Updated Guidelines for Antiretroviral Postexposure Prophylaxis After Sexual, Injection Drug Use, or Other Nonoccupational Exposure to HIV—United States, 2016.
4. 《血液制品生产用人血浆病毒核酸检测技术要求》中华人民共和国药典 2015 版，四部，247-248。

附件 2

实验室室内质量控制

质量控制是指为确保实验工作正常进行而在每次实验过程中采取的各种措施。实施质量控制表明实验产生可信的结果，具体是将质控品和待检测样本一起检测，通过对质控品检测结果的分析，了解实验条件是否正常，判定本次实验结果是否有效。

1 质量控制的基本原理

1.1 制定质控策略：实验室规定分析的质控品、每一质控品测定次数、质控品的位置。做出分析性能是否可接受的质控规则，对失控情况执行恰当的处理措施。

1.2 质控品的检测频次和位置：

质控品的检测频次和位置应反映检测系统的性能。为满足不同实验室情况的需要，实验室可额外增加质控品以及不同的位置。质控品固定放在病人样本前或后可监测漂移；质控品在病人样本中随机放置可检出随机误差。随着自动化分析仪的分析性能更加稳定，实验室也可减少质控品检测的频次。

1.3 质控规则：

质控规则是解释质控数据和判断分批控制状态的标准，某些规则是专为查出随机误差的，有些是为查出系统误差的。常用规则有六条（ $\bar{X}$ ：平均数； s ：标准差）。① $12s$ ：一个质控结果超过 $\bar{X} \pm 2s$ ，提示警告。② $13s$ ：一个质控结果超过 $\bar{X} \pm 3s$ ，发现随机误差（可能也有系统误差），该批测试失控。③ $22s$ ：在批内测试中，若有两个浓度质控品的测定结果（或三个浓度质控品的测定结果中有两个）同时超过了 $\bar{X} + 2s$ 或 $\bar{X} - 2s$ ，为违背此规则；在批间测试中，当某一浓度的质控品在此批和前一批中的测定结果同时超过了 $\bar{X} + 2s$ 或 $\bar{X} - 2s$ ，为违背此规则，表示存在系统误差。④ $R4s$ ：同批两个质控结果之差值超过 $4s$ ，为违背此规则，表示存在随机误差。⑤ $41s$ ：一个质控品连续的四次测定结果都超过 $\bar{X} + 1s$ 或 $\bar{X} - 1s$ ，为违背此规则，表示存在系统误差。⑥ $10\bar{X}$ ：十个连续的质控结果在平均数一侧，为违背此规则，表示存在系统误差。

1.4 质控图：

质控图（control chart）是对过程质量加以测定、记录从而评估和监察过程是否处于控制状态的一种统计图，用于判断过程正常还是异常的一种统计工具。图上有中心线（central line, CL）、上控制界限（upper control limit, UCL）和下控制

界限 (lower control limit, LCL)，并有按时间顺序抽取的样本统计量值的描点序列, UCL、CL与LCL统称为质控限 (control lines)。若控制图中的描点落在UCL与LCL之外或描点在UCL 与LCL之间的排列不随机，则表明过程异常。世界上第一张质控图是美国休哈特 (W. A. Shewhart) 在1924年5月16日提出的不合格品率 (p) 控制图。最常用的质控图是Levey-Jennings质控图。

1.5 质控限:

质控限由实验室根据使用方法检测质控品结果的平均值和标准差来计算。质控品的平均值和标准差应建立在实验室常规使用方法对质控品重复检测的基础上, 如果使用定值质控品, 质控品的值仅供参考, 平均值和标准差的实际值必须由实验室重复检测建立。

(1) 暂定中心线 (均值) 的确定: 为了确定中心线, 新批号的质控品应与当前使用的质控品一起进行检测。根据至少20次质控测定结果, 对数据进行离群值检验 (剔除超过3s外的数据), 计算出平均数, 作为暂定中心线 (均值)。以此暂定中心线 (均值) 作为下一个月室内控制图的中心线 (均值) 进行室内控制; 一个月结束后, 将该月的在控结果与前20个控制测定结果汇集在一起, 计算累积平均数 (第一个月), 以此累积的平均数做为下一个月控制图的中心线 (均值)。重复上述操作过程, 连续三至五个月。

(2) 常规中心线 (均值) 的建立: 以最初20个数据和三至五个月在控数据汇集的所有数据计算的累积平均数作为质控品有效期内的常规中心线 (均值), 并以此作为以后室内控制图的中心线 (平均数)。对个别在有效期内浓度水平不断变化的项目, 则需不断调整中心线 (均值)。

(3) 暂定标准差的设定: 为了确定标准差, 新批号的质控品应与当前使用的质控品一起进行测定。根据至少20次质控测定结果, 对数据进行离群值检验 (剔除超过3s外的数据), 计算出标准差, 并作为暂定标准差。以此暂定标准差作为下一个月室内控制图的标准差进行室内控制; 一个月结束后, 将该月的在控结果与前20次控制测定结果汇集在一起, 计算累积标准差 (第一个月), 以此累积的标准差作为下一个月控制图的标准差。重复上述操作过程, 连续三至五个月。

(4) 常用标准差的设定: 以最初20次质控测定结果和三至五个月在控质控结果汇集的所有数据计算的累积标准差作为质控品有效期内的常用标准差, 并以此作为以后室内控制图的标准差。

1.6 失控及失控后处理：

质量控制的核心问题在于努力分清误差类型。检验误差类型包括：（1）随机误差：严密监测和控制，使其限制在临床允许的范围之内，并逐步使之缩小。（2）系统误差：要求尽快发现，及时校正。（3）过失误差：尽量消灭。

当质控已计划并恰当地执行时，要求可靠的平均值和标准差用于计算质控限，将假失控概率降到最低。当出现失控时进行如重复质控测定或重新分析新的质控品不是最有效的方法，应当找出问题原因，找出解决问题的方法，并消除问题，防止将来出现同样的问题。所以实验室应建立质控图分析及失控情况处理程序。

1.7 失控原因初步查找：

1.7.1 初步估计失控原因

对检测过程进行回顾分析，选择性复查分析判断失控原因。a. 与技术人员一起复习操作指导书，仔细检查操作步骤中是否有遗漏或改变；b. 核查试剂及各组分的失效期；c. 核对孵育的温度和时间；d. 加样器、洗板机、酶标仪等是否正常，酶标仪的波长是否准确，加样器和酶标仪是否校准；e. 检查蒸馏水的质量；f. 检查试剂是否被污染，贮存是否合适。

1.7.2 通过检测数据分析失控原因

①原始数据分析：原始数据包括空白对照\阴性对照\阳性对照\标准等检测数据一致，表明无明显系统误差，失控原因在质控品或该管操作造成的可能性较大。分析同一瓶质控品的其他项目测定是否也有结果异常，如果有异常，说明质控品本身有问题；如果无异常，说明该管操作有问题。检测数据不一致表明该批检测中可能有系统误差，失控原因来自试剂仪器或操作等的可能性较大。观察仪器检测其他项目的结果有无异常。如果有异常，说明仪器原因；如果无异常，说明试剂或操作等原因。

②质控图分析：进一步从质控图上观察失控是否发生在渐变的基础上。如果是渐变的，则由渐变的误差因素造成；否则由突然发生的误差因素造成。引起位移的原因有：a. 使用一批新批号的试剂；b. 更换了新的试剂；c. 孵育温度改变；d. 新的技术人员（其加样技术也许不同）；e. 仪器改变（如加样器等）。引起趋势的原因有：a. 试剂失效；b. 仪器有问题。发生位移和趋势的最常见原因是试剂或质控品的失效，试剂盒中酶结合物最容易失效。另外，试剂在运输和贮存条件不当时，也容易失效。

2 艾滋病检测实验室室内质量控制

2.1 酶免或发光法检测的室内质量控制

2.1.1 试剂盒内部对照

试剂盒内部对照质控品即为试剂盒内提供的阳性和阴性对照。试剂盒内部对照用于判断每次实验的有效性，不能作为室内质控品使用。每一次检测临床样本时，必须有试剂盒内部对照，而且只能在同批号的试剂盒中使用。如内部对照结果无效，必须重新试验。

2.1.2 室内质控品

为非试剂盒组份的外部质控品，是为了监控检测的重复性而设置的，质控品定值必须为弱阳性。外部质控品的作用是判断该批临床样本检测的可信性。因此，每次实验必须包含室内质控品，出现失控时，必须重新试验。室内质控品可以购买或实验室自行制备。质控品应稳定、无菌、或不含有影响试剂反应的防腐剂。

2.1.3 Levey-Jennings 质控图

2.1.3.1 质控图参数

外部质控品的均值和标准差应建立在实验室常规使用方法对外部质控品重复测定的基础上。一般采用在不同批次检测取得至少 20 个数据；如果仅做少量批次的检测，也至少做 5 个批次的检测，每个批次中不少于 4 个质控血清测定结果，以建立一个临时性的均值和标准差，当达到 20 批次数据后，替代临时性的均值和标准差。

(1) 算术平均值 ($\bar{x}$)：代表一组质控品测定 S/C0 值的均值。为了统计学上有显著性意义，应该采用至少 20 次(天)测得的外部对照质控品的 S/C0 值计算平均值。

(2) 标准差 (s)：是描述样本与均数之间离散程度的一个指标，是与质控品 S/C0 值均值有关的预期范围。一组 S/C0 值的标准差以 s 表示。

(3) 变异系数 (cv)：是反映各次 S/C0 值相对于均值离散程度的一个指标，可以用来衡量检测的重复性或精密度。

(4) 控制限：由实验室根据对外部质控品检测结果的均值和标准差来确定。例如，按照 1_{2s} 质控规则，控制限为外部质控品 S/C0 均值加减 2 个标准差；按照 1_{3s} 质控规则，控制限为外部质控品 S/C0 均值加减 3 个标准差。

2.1.3.2 质控规则

实验室在报告结果之前必须评价质控数据，可通过图形记录的检查或由计算机审核结果来决定。目前有许多质控规则，常用的是 1_{2s} 和 1_{3s} 规则。

(1) 告警 (1_{2s})：当外部质控品的 S/C0 值超出 $\bar{x}+2s$ 范围时，系统处于告警状态，应予以注意，是否可以继续检测需要进一步观察。若将 1_{2s} 做失控标准，有较高的假失控概率，所以一般不采用。

(2) 失控 (1_{3s})：当外部质控品的 S/C0 值超出 $\bar{x}+3s$ 范围时，系统处于失控状态，本次实验结果不能被接受，可能是系统误差、随机误差或外部质控品稳定性下降所致。

2.1.4 室内质控其他方式—“即刻法”质控

“即刻法”质控方法是在对同一批外部质控品连续测定 3 次后，即可对第 3 次以后的检验结果进行质控。具体计算方法如下：

(1) 将质控品的测定值从小到大排列： $x_1, x_2, x_3 \cdots x_n$ (x_1 为最小值， x_n 为最大值)。

(2) 计算 $\bar{x}$ 和 s 。

(3) 计算 $SI_{\text{上限值}}$ 和 $SI_{\text{下限值}}$ 。

$$SI_{\text{上限}} = \frac{X_{\text{最大值}} - \bar{x}}{S}$$

$$SI_{\text{下限}} = \frac{\bar{x} - X_{\text{最小值}}}{S}$$

(4) 将 $SI_{\text{上限}}$ 、 $SI_{\text{下限}}$ 与 SI 值表 (表 1) 中的数字比较。

表 1 SI 值表

N	N_{3s}	N_{2s}	n	n_{3s}	N_{2s}
3	1.16	1.15	12	2.55	2.29
4	1.49	1.46	13	2.61	2.33
5	1.75	1.67	14	2.66	2.37
6	1.94	1.82	15	2.71	2.41
7	2.10	1.94	16	2.75	2.44
8	2.22	2.03	17	2.79	2.47
9	2.32	2.11	18	2.82	2.50
10	2.41	2.18	19	2.85	2.53
11	2.48	2.23	20	2.88	2.56

“即刻法”只能在前 20 次内使用，超出即可采用 L-J 质控图方法。

2.2 快速法检测质控

2.2.1 试剂内对照

在质控窗口内出现质控带，该质控带是试剂自带的内部过程质控，说明实验操作全部完成并且实验所用材料处于工作状态。清洁的检测区背景是内部阴性过程质控。如实验完成后未呈现红色质控带，说明试剂盒内质控无效，该试验结果无效，样本须重检。

2.2.2 室内质控品对照

外部质控品可采用商用质控品或自制质控品。质控品应包含抗体阳性样本和阴性样本。自制质控品可使用本室保留的阳性样本。下列情况需做质量控制：更换试剂批号；更换检测人员；更换包装；更换试剂厂家。除此之外，建议每个检测日检测一次阳性和阴性质控品；如果日检测量大于 50 份样本，至少应作 2 次质控。

出现以下问题，提示存在质量隐患，应引起重视：运输包装、内盒或试剂盒的物理损伤；在单包装内存在混杂物质；标签出现错误、缺失或字迹模糊（特别是产品名称或出产厂家名称，批号和货号，失效期或/和生产日期）；缺失目录；泄漏或污染；不适宜的存放条件；保护包装纸破损或污染；未达到质量控制标准（阳性/阴性控制结果以及质控条带出现与否等标志）；试剂质量问题须报告省确证中心实验室。

2.2.3 开展抗体相关检测的实验室须参加有资质机构组织的能力验证，或室间比对。

附件 3

HIV-2 核酸检测

1 范围

本附件规定了 HIV-2 核酸检测的意义、实验室要求、检测方法、结果判定及质量控制的要求，适用于具有核酸检测能力的实验室。

2 检测的意义

2.1 HIV-2 感染诊断

当疑似 HIV-2 感染、HIV-2 抗体确证检测结果为不确定，或者需要区分 HIV-1 和 HIV-2 感染，需要判定是否为 HIV-1/HIV-2 双重感染时，可以检测 HIV-2 核酸进行诊断。

HIV-2 前病毒 DNA（以下简称 DNA）、RNA 和总核酸（DNA/RNA）检测结果均可用于 HIV-2 感染诊断。HIV-2 感染者和艾滋病病人血浆中 HIV-2 RNA 检出率低，病毒载量水平也低，例如，一个西非的队列研究结果显示，在未接受过抗病毒治疗的 HIV-2 感染者和艾滋病病人中，血浆 HIV-2 病毒载量未检出（ <10 cps/mL）的占 46.5%，病毒载量为 10–100 cps/mL、100–1000 cps/mL 和 >1000 cps/mL 的分别占 35.8%、11.7% 和 6.0%。因此，建议优先选择检测 HIV-2 DNA 或总核酸。HIV-2 核酸阴性或低于检测限时，不能排除 HIV-2 感染。

2.2 抗病毒治疗疗效监测

适用于已知 HIV-2 感染者和艾滋病病人。但因 HIV-2 RNA 病毒载量水平低，应用价值有限。

3 实验室要求

同 HIV-1 核酸检测和 HIV-1 基因型耐药检测，功能分区根据所用方法和设备的需要而定。

4 检测方法

HIV-2 核酸检测包括 DNA 定性、定量，RNA 定性、定量（病毒载量）及总核酸检

测。目前我国还没有 HIV-2 核酸检测试剂盒获得国家药品监督管理局注册。今后如有试剂盒获批，使用方法以试剂盒说明书为准。以下介绍一些实验室自建方法，实际工作中可以根据具体需求选用、调整。

4.1 样本

外周血单个核细胞（PBMC）、淋巴细胞富集液和全血等样本可用于 HIV-2 DNA 或总核酸检测，血浆样本可用于 HIV-2 RNA 检测。

4.2 核酸提取

根据检测目的，选用不同的商品化试剂盒提取核酸，如总核酸提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、RNA 提取试剂盒。

4.3 核酸检测

常用的 HIV-2 核酸检测方法有 2 类，实时荧光 PCR 和套式 PCR。承担美国 HIV-2 核酸检测的两家实验室（美国纽约州卫生局 Wadsworth 中心和华盛顿大学）均使用实时荧光 PCR，HIV-2 特异性靶标均为长末端重复序列（LTR）的保守区但位置不同；法国 ANRS-C05 HIV-2 和 ANRS-AC11 定量工作组（以下简称 ANRS 项目组，其中 ANRS 为国家艾滋病和病毒性肝炎研究所）也使用实时荧光 PCR，但 HIV-2 特异性靶标为 LTR 和 gag 基因保守区。以上方法均可覆盖 HIV-2 的 A、B 流行亚型。国内主要利用套式 PCR 扩增 HIV-2 LTR 和 gag 等基因的保守区片段，PCR 产物经测序、序列比对后进行 HIV-2 感染诊断。

4.3.1 实时荧光 PCR

4.3.1.1 美国纽约州卫生局 Wadsworth 中心建立的方法用于血浆中 HIV-2 RNA 的定性、定量检测。血浆样本经 RNA 提取、逆转录后进行双重实时荧光 PCR 检测，检测靶标为 HIV-2 LTR 保守区并设内对照。HIV-2 LTR 目的片段的长度为 68bp，引物和 TaqMan 探针序列见表 1。

4.3.1.2 华盛顿大学基于雅培（Abbott）m2000 平台建立的方法用于血浆中 HIV-2 RNA 病毒载量、PBMC 中 HIV-2 总核酸检测。采用双重实时荧光 PCR，检测靶标为 HIV-2 LTR 保守区并设内对照。HIV-2 引物和探针序列见表 1。

4.3.1.3 法国 ANRS 项目组建立的方法用于血浆中 RNA 病毒载量检测及外周血单个核细胞（PBMC）、淋巴细胞富集液或全血中的 DNA 定量检测。采用三重实时荧光 PCR，检测靶标为 HIV-2 LTR 及 gag 基因的保守区及内对照。HIV-2 的引物和探针序列见表 1。

表 1 HIV-2 实时荧光 PCR 引物和探针序列

来源及名称	序列 (5' -3')
美国纽约州卫生局 Wadsworth 中心，靶标为 LTR 保守区	
正向引物 HIV-2 F27	TTGAGCCCTGGGAGGTTCT
反向引物 HIV-2 R94	GGTGAGAGTCTAGCAGGGAACAC
探针 HIV-2 P48	6-FAM-CCAGCACTAGCAGGTAG-MGBNFQ
华盛顿大学，靶标为 LTR 保守区	
正向引物	GCGGAGAGGCTGGCAGAT
反向引物	GAACACCCAGGCTCTACCTGCTA
探针	6-FAM-AGAGAACCTCCCAGG-NFQMGB
法国 ANRS 项目组，靶标 1 为 LTR 保守区	
正向引物 Fi2	AGCAGGTAGAGCCTGGGTGTT
反向引物 Da2	TCTTTAAGCAAGCAAGCGTGG
探针	FAM-CTTGCCCGYRCTGGGCAGA-BHQ1
法国 ANRS 项目组，靶标 2 为 gag 基因区	
正向引物 F3	GCGCGAGAACTCCGTCTTG
反向引物 R1	TTCGCTGCCACACAATATGTT
探针 S65GAG2	FAM-TAGGTTACGGCCCGCGGAAAGA-BHQ1

4.3.2 套式 PCR

血浆样本经 RNA 提取、逆转录后进行 PCR 扩增，或者外周血单个核细胞 (PBMC)、淋巴细胞富集液、全血样本经 DNA 或总核酸提取后进行 PCR 扩增（其中总核酸扩增前需逆转录）。阳性 PCR 产物做测序、序列比对，如果序列与 HIV-2 参考株序列高度同源，可判定为 HIV-2 核酸阳性。

中国疾控中心艾防中心设计了针对 HIV-2 五个基因区片段的引物，所建立的套式 PCR 方法用 HIV-2/ST 株前病毒 DNA（提取自 λ JSP4-27 噬菌体克隆）验证有效。其中扩增 HIV-2 LTR 和 gag 基因区片段的引物序列见表 2。湖南省疾控中心对 2 份疑似 HIV-2 感染的样本进行 RNA 提取、逆转录、套式 PCR 扩增（gag 基因区片段）、PCR 产物测序、比对后，诊断为 HIV-2 感染。

表 2 HIV-2 LTR 和 gag 基因区片段的套式 PCR 引物

编号	序列 (5' -3')	核苷酸位置
LTR (U3/R) 外侧引物		
正向引物 LTR A	CTGAGACTGCAGGGACTTCCAGAAGGG	9379-9406
反向引物 LTR B	AAGCAGAAAGGTCCTAACAGACCAGGGT	9739-9767
LTR (U3/R) 内侧引物, 产物长度 199bp		
正向引物 LTR C	AGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTC	9513-9541
反向引物 LTR D	CCAGGCGGCGACTAGGAGAGATGGGAGCAC	9682-9711
gag (p16/p28) 基因区外侧引物		
正向引物 gag A	AGGTTACGGCCCGCGGAAAGAAAA	603-627
反向引物 gag B2	CCTACCCCCTGACAGGCGGTCAGCATCTCTTC	1581-1612
gag (p16/p28) 基因区内侧引物, 产物长度 839 bp		
正向引物 gag C2	AGTACAGGCTAAAACATATTGTGTGGGC	628-655
反向引物 gag D2	CCTCAAGCTTTGTAGAATCTATCTACATA	1437-1466

注: HIV-2 核苷酸序列的位置参考 HIV-2/ROD 株。

5 结果判定

5.1 商品化试剂盒

如果使用商品化试剂盒, 按照试剂盒说明书要求判定结果。

5.2 实验室自建方法

5.2.1 使用实验室自建的套式PCR方法, 根据序列比对结果判定是否为HIV-2核酸阳性。

5.2.2 使用实验室自建的实时荧光PCR方法, 根据方法确认后的标准判定结果: (1) 定性检测结果判定为HIV-2核酸阳性或阴性, 其中的核酸写明DNA、RNA或总核酸; (2) 定量检测结果报告检测值或低于检测限 (注明检测限的值)。

由于我国 HIV-2 感染极为罕见, 实验室自建的实时荧光 PCR 方法所得核酸阳性或高于检测限的结果不宜直接用于临床诊断。应进一步用套式 PCR 方法检测, 以序列比对所得的 HIV-2 核酸阳性结果作为临床诊断的金标准。

6 质量控制

实验室自建方法需要做好方法确认,对敏感性和特异性做充分评估、验证。其他同 HIV-1 核酸检测和 HIV-1 基因型耐药检测。

参考文献

1. Ekouévi DK, Avettand-Fènoël V, Tchounga BK, et al. Plasma HIV-2 RNA according to CD4 count strata among HIV-2-infected adults in the IeDEA West Africa Collaboration. PLoS One, 2015, 10:e0129886.
2. Styer LM, Miller TT, Parker MM. Validation and clinical use of a sensitive HIV-2 viral load assay that uses a whole virus internal control. J Clin Virol, 2013, 58[suppl 1]:e127 - e133.
3. Chang M, Gottlieb GS, Dragavon JA, et al. Validation for clinical use of a novel HIV-2 plasma RNA viral load assay using the Abbott m2000 platform. J Clin Virol, 2012, 55(2):128 - 33.
4. Chang M, Wonga AJ, Raugi DN, et al. Clinical validation of a novel diagnostic HIV-2 total nucleic acid qualitative assay using the Abbott m2000 platform: Implications for complementary HIV-2 nucleic acid testing for the CDC 4th generation HIV diagnostic testing algorithm. J Clin Virol, 2017, 86: 56 - 61
5. Avettand-Fènoel V, Damond F, Gueudin M, et al. New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load. J Clin Microbiol, 2014, 52:3017 - 3022.
6. Bertine M, Gueudin M, Mélard A, et al. New highly sensitive real-time PCR assay for HIV-2 group A and group B DNA quantification. J Clin Microbiol, 2017, 55(9): 2850-2857.
7. 邱茂锋, 孙显光, 蒋岩, 等。不同人类免疫缺陷病毒 2 型检测方法的比较研究。中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 61-64。
8. 彭瑾瑜, 郑军, 贺健梅, 等。湖南省首次诊断 2 例非输入性 HIV-2 感染病例与流行病学个案调查。中华流行病学杂志, 2018, 39(8):1077-1081。