

全国艾滋病检测技术规范

National Guideline for Detection of HIV/AIDS

(2015年修订版)



中国疾病预防控制中心

二〇一五年十二月

全国艾滋病检测技术规范

National Guideline for Detection of HIV/AIDS

(2015 年修订版)

中国疾病预防控制中心

二〇一五年十二月

全国艾滋病检测技术规范（2015 年修订版）勘误表

1. 第 4 页，4.3.5 中，“时间不超过 24 小时”改为“时间不超过 48 小时”。
2. 第 16 页，5.4.1.1 中，第二行“下表”改为“试剂盒规定的”。
3. 第 29 页，5.2.4.2 中，第二行“报告检测值，”改为“报告检测值；”。
4. 第 30 页，5.3.1.6 中，第二行“RNA10³³CPs/ml”改为“RNA10³CPs/ml”。
5. 第 31 页，6.3 中，第五行“15000³CPs/ml”改为“15000CPs/ml”。
6. 第 36 页，图 4 中，倒数第二个框的“无反应”下缺少连接报告 HIV 抗体阴性 P24 抗原阴性的箭头，改为下图，图 4。
7. 第 37 页，4.2.2 中第 4 行“结果有反应做抗体确证试验”改为“结果有反应做补充试验”；“结果无反应判为抗体阴性”改为“结果无反应判为 HIV 抗体阴性”。4.3.1.1 中，第二行报告“HIV 抗体阴性”改为报告“HIV-1 抗体阴性”。
8. 第 38 页，文字倒数第一行图 6 后添加“此流程也可用于发光试剂试验”。
9. 第 42 页，6.1 中，第二行取消“或 EDTA 抗凝全血”。
10. 第 42 页，图 10 中，倒数第二个框内删除“无反应”。
11. 第 45 页，图 12 中，第三个框下右边“无反应”改为“有反应”。

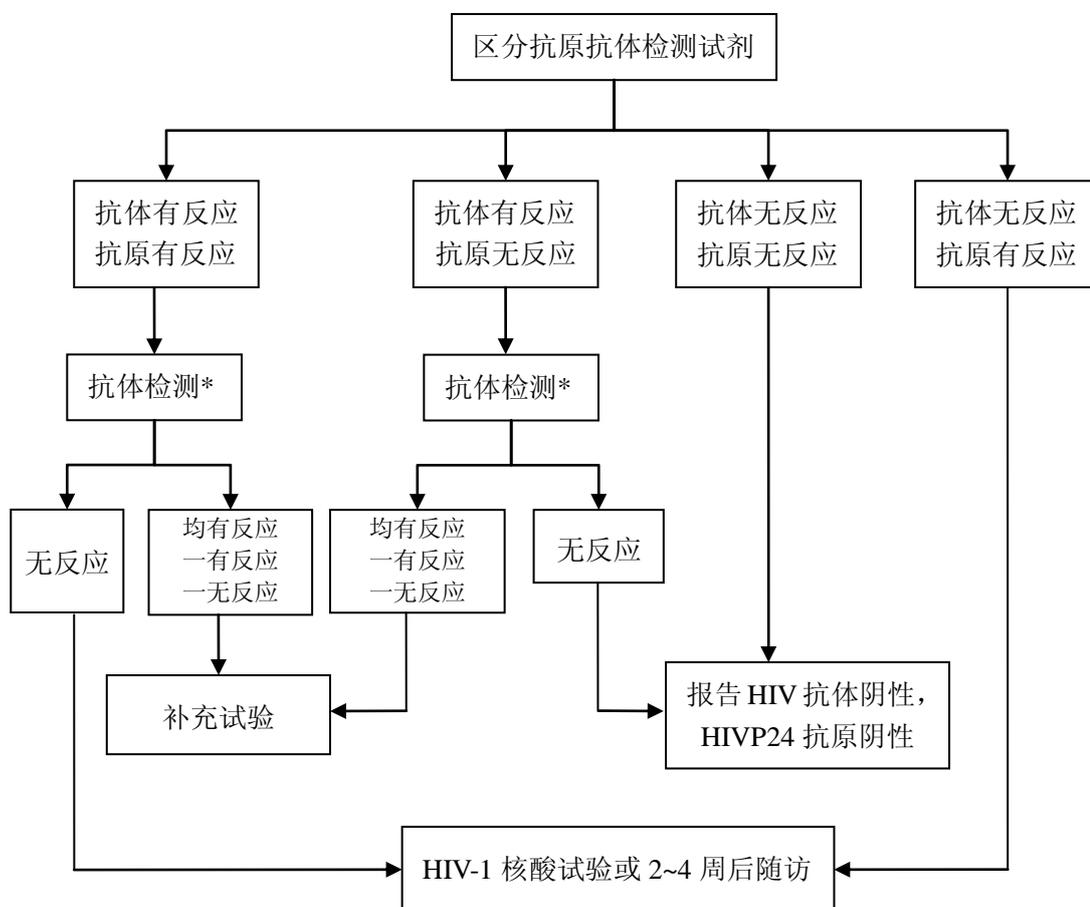


图 4 区分抗原抗体检测试剂筛查检测流程

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《关于艾滋病抗病毒治疗管理工作的意见》、《中国预防与控制艾滋病中长期规划(1998—2010 年)》、《中国遏制与防治艾滋病十二五行动计划的通知(国办发[2012]4 号)》、“四免一关怀”等国家艾滋病防治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意见的基础上，在中华人民共和国卫生和计划生育委员会艾滋病专家及省级专家的参与下，中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心对《全国艾滋病检测技术规范(2009 年版)》进行修改、增补和完善，制定出《全国艾滋病检测技术规范(2015 年版)》(以下简称《规范》)，使其既能满足目前艾滋病检测工作的实际需求，又能体现检测技术的发展。

本次《规范》修订工作立足于我国目前检测状况，结合发达国家使用的指南，主要对以下几个方面内容进行了修改、增补和完善：(1) 完善了不同的检测策略，并将其整合为独立的一章；(2) 增加了 HIV-1 新发感染检测一章；(3) 新增了补充试验概念，其内容包括抗体确证试验(WB, RIBA/LIA 等)和核酸试验(定性和定量试验)；(4) 增加了第 4 代试剂(抗原抗体联合检测试剂)的检测流程；(5) 增加了核酸检测流程；(6) 完善了检测报告。将抗体筛查和复检报告整合为 HIV 抗体筛查检测报告，增加了 HIV-1 核酸检测报告和婴儿艾滋病病毒感染早期诊断检测报告，取消了流行病检测 HIV 抗体检测报告单、艾滋病病毒抗体检测数和阳性人数统计报表、艾滋病职业暴露个案登记表和艾滋病防治工作人员职业暴露事故汇总表；(7) 取消了实验室生物安全一章和艾滋病检测实验室质量管理一章。

所有附表的检测报告仅供使用实验室参考。

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医学科学院、上海市疾病预防控制中心、中国医科大学、北京出入境检验检疫局、云南省疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、河南省疾病预防控制中心、北京市红十字血液中心、卫生部临床检验中心、江苏省疾病预防控制中心、陕西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佑安医院、北京市疾病预防控制中心。

本《规范》编写组人员：蒋岩、汪宁、李敬云、钟平、尚红、邵一鸣、肖瑶、朱红、邢文革、姚均、潘品良、邱茂锋、马艳玲、梁姝、郭志宏、王哲、葛红卫、王盈、李金明、徐晓琴、常文辉、吴建军、张福杰、吴昊、苏雪丽、廖玲洁。

本《规范》参加编写主要国际机构：世界卫生组织（Po-lin CHAN、张岚）。美国疾病预防控制中心 GAP 项目（Colin Shepard、郝玲、齐明山）。

本《规范》编写工作联系人：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（2009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：感谢盖茨基金会和美国艾滋病健康基金会在《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 样品的采集和处理.....	1
1 范围.....	1
2 规范性文件引用.....	1
3 样品种类及相应的用途.....	1
4 操作步骤.....	2
4.1 采样前准备.....	2
4.2 样品的采集和处理.....	2
4.3 样品的保存.....	4
4.4 样品的运送.....	4
4.5 样品的接收.....	5
第二章 HIV 抗体检测	6
1 范围.....	6
2 规范性文件引用.....	6
3 HIV 抗体检测实验室要求.....	6
4 HIV 抗体检测的目的和要点.....	6
4.1 HIV 抗体检测的目的	6
4.2 HIV 抗体检测的要点	7
5 常规 HIV 抗体检测方法.....	7
5.1 试剂和样品.....	7
5.2 方法.....	7
6 结果报告.....	9
6.1 筛查报告.....	9
6.2 确证报告.....	9
7 质量控制.....	10
7.1 酶免或发光法抗体检测的室内质量控制.....	10
7.2 快速法抗体检测质控.....	12

第三章 HIV-1 新发感染检测	14
1 范围	14
2 规范性文件引用	14
3 新发感染检测实验室要求	14
4 目的	14
5 新发感染检测方法	14
5.1 方法学原理	14
5.2 方法	15
5.3 样品的入选标准和排除标准	15
5.4 结果处理和解释	16
5.5 数据分析	17
6 质量控制	19
6.1 人员培训	19
6.2 样品质控	19
6.3 试剂质控	19
6.4 实验过程质控	20
第四章 HIV-1 抗原检测	21
1 范围	21
2 规范性文件引用	21
3 HIV-1P24 抗原检测的意义	21
4 实验室要求	21
5 检测方法及程序	21
5.1 试剂	21
5.2 样品	21
5.3 定性检测	21
5.4 定量检测	23
5.5 结果报告和解释	23
6 质量控制	23

6.1	定性检测.....	23
6.2	定量检测.....	24
第五章 HIV 核酸检测		25
1	范围.....	25
2	规范性文件引用.....	25
3	核酸检测的意义.....	26
3.1	HIV-1 感染诊断	26
3.2	治疗效果监测.....	26
3.3	病程监控及预测.....	26
3.4	耐药性监测.....	27
4	HIV 核酸检测实验室要求.....	27
4.1	实验室的设计及工作基本原则.....	27
4.2	实验室人员和要求.....	27
4.3	实验室生物安全.....	27
5	HIV-1 核酸检测方法及程序.....	27
5.1	HIV-1 核酸定性检测	27
5.2	HIV 核酸定量检测	28
5.3	集合核酸定性检测	30
5.4	HIV 核酸即时检测	31
6	质量保证和质量控制.....	31
6.1	实验室分区和环境.....	31
6.2	仪器设备质量控制.....	31
6.3	检测过程质量控制.....	31
6.4	外部质量控制.....	32
第六章 艾滋病病毒感染实验室检测策略.....		33
1	范围.....	33
2	规范性文件引用.....	33

3	疫情监测相关的检测策略及结果报告	33
3.1	HIV 匿名无关联检测流程	33
3.2	HIV 实名关联检测流程	34
4	临床诊断相关的检测策略及结果报告	34
4.1	使用抗体检测试剂的筛查检测流程.....	34
4.2	使用抗原抗体检测试剂的筛查检测流程.....	35
4.3	补充试验检测策略.....	37
5	血液筛查相关的检测策略及结果报告	41
6	婴儿 HIV-1 感染早期诊断相关的检测策略及结果报告.....	43
6.1	核酸检测策略 (RNA/DNA) 及结果报告	43
6.2	抗体检测策略及结果报告.....	45
第七章 HIV-1 基因型耐药检测		48
1	范围.....	48
2	规范性文件引用.....	48
3	HIV-1 基因型耐药检测的意义.....	48
3.1	群体耐药监测.....	48
3.2	个体耐药检测.....	49
4	HIV-1 基因型耐药检测实验室要求.....	49
4.1	实验室功能分区.....	49
4.2	实验室人员和要求.....	50
4.3	设施和设备.....	50
5	HIV-1 基因型耐药检测方法程序	50
5.1	样品.....	50
5.2	检测原理.....	50
5.3	检测方法.....	50
5.4	耐药分析.....	51
6	质量保证与质量控制	51
6.1	室内质控.....	52

6.2 外部质控.....	52
第八章 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞检测	53
1 范围.....	53
2 规范性文件引用.....	53
3 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的意义.....	53
3.1 HIV 感染临床分期	53
3.2 HIV 感染儿童免疫抑制分级和治疗辅助指标	53
3.3 疾病进展监测.....	54
3.4 机会性感染的风险评估.....	54
3.5 抗病毒治疗适应症选择及疗效评价.....	54
3.6 CD8+T 淋巴细胞为抑制性/细胞毒性 T 细胞.....	54
4 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测实验室要求	54
4.1 人员.....	54
4.2 功能分区.....	55
4.3 设施和设备.....	55
5 常规 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的方法和程序	55
5.1 样品采集、运输和接收.....	55
5.2 方法.....	56
5.3 试剂.....	57
5.4 实验资料的记录.....	57
5.5 结果报告.....	57
6 质量控制.....	58
第九章 HIV-1 的分离培养	59
1 范围.....	59
2 规范性文件引用.....	59
3 HIV-1 分离的意义.....	59
3.1 HIV 抗体不确定或 HIV-1 阳性母亲所生婴儿的鉴别诊断及诊断	59

3.2	HIV 表型耐药检测及其他 HIV 生物学特征的研究	59
3.3	HIV 感染的辅助诊断	59
4	实验室要求	59
4.1	实验室	59
4.2	设备	59
4.3	材料	59
5	HIV-1 分离的方法及程序	59
5.1	样本	59
5.2	靶细胞制备	59
5.3	建立共培养	60
5.4	监测病毒生长	60
5.5	病毒鉴定	60
5.6	判定结果和解释	60
6	质量控制	60
附表 1	HIV 抗体筛查检测报告	61
附表 2	HIV 抗体确证检测报告	62
附表 3	HIV-1 核酸检测报告	63
附表 4	HIV 抗体确证检测报告（特定条件）	64
附表 5	CD4+T 淋巴细胞检测报告	65
附表 6	HIV-1 耐药基因型检测报告	66
附表 7	婴儿艾滋病病毒感染早期诊断检测报告	67

第一章 样品的采集和处理

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、细胞、口腔黏膜渗出液、尿液以及滤纸干血斑（DBS）样品的采集和处理方法，适用于 HIV 抗体、抗原、核酸、基因亚型、耐药检测、CD4+和 CD8+T 淋巴细胞数测定及 HIV 分离培养。

2 规范性文件引用

《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 有效版本。

《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）。

《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）。

《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）。

Consolidated Guidelines on HIV Testing Services. WHO July 2015.

《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。

3 样品种类及相应的用途

3.1 全血、血清、血浆、口腔黏膜渗出液、尿液以及干血斑样品可用于 HIV 抗体检测。

3.2 全血、血清、血浆、病毒培养上清液可用于 HIV 抗原检测。

3.3 抗凝全血可用于 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞测定。

3.4 血浆、DBS 可用于 HIV-1 病毒载量、基因型、耐药检测。

3.5 淋巴细胞富集液、外周血单核淋巴细胞（PBMC）及全血可用于 HIV 核酸定性与定量、基因型检测和 HIV-1 分离培养。

4 操作步骤

4.1 采样前准备

根据检测项目的具体要求，确定采集样品的种类、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。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品容器表面的标记是否一致，并注明样品采集时间及唯一编码。采集血液样本宜选择合适的室内（外）采血空间，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。

4.1.1 样品的编码和记录

4.1.2 应制定样品编码的标准操作程序（SOP），规定样品编码的原则和方法，为样品制定唯一性编码（编号），保证其唯一性。

4.1.3 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。

4.1.4 口腔黏膜渗出液样本应采集口腔渗出液，不是唾液。

4.1.5 尿液样本准备好带有唯一编码的采尿管，并保留唯一编码。

4.1.6 应使用专门的样品记录本或登记表记录样品，同时录入电脑保存。

4.2 样品的采集和处理

4.2.1 血液

4.2.1.1 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 6~8 次，备用。

4.2.1.2 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。

4.2.1.3 血浆：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。

4.2.1.4 血清：根据需要，用不含抗凝剂的真空采血管抽取 5~10ml 静脉血，或一

次性注射器抽取静脉血，转移至无抗凝剂的试管中，室温下自然放置 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。

4.2.1.5 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。

4.2.1.6 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。

4.2.1.7 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 淋巴细胞测定可选用 EDTA 钠盐或钾盐、枸橼酸钠、肝素钠；HIV-1 病毒分离、核酸定性/定量检测可选用 EDTA 钠盐或钾盐或枸橼酸钠。

4.2.1.8 样品采集后处理、保存、运输的时限和条件，因不同的检测项目而异，应参见不同检测项目要求。

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

4.2.2 滤纸干血斑

4.2.2.1 根据需要，可将采集的各种血液样品制备成滤纸干血斑，用于检测。最常用的是用抗凝全血、末梢全血和血浆制备滤纸干血斑。

4.2.2.2 用移液器从样品管中吸取 100 μ L 抗凝全血（或血浆），对准滤纸印圈的中心处，将样品滴在滤纸上，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。

4.2.2.3 根据需要，连续在数个印圈上滴加样品。

4.2.2.4 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。

4.2.2.5 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。

4.2.3 尿液和口腔黏膜渗出液

4.2.3.1 尿液：推荐使用专用采尿管，保持尿液稳定。尿液样品可采集随机尿，女性经期应取中段尿。

4.2.3.2 口腔黏膜渗出液：使用试剂盒提供的容器收集样品。存放时间和是否冻存

以试剂盒说明书为准。口腔黏膜渗出液应采集口腔渗出液,不是唾液。

4.3 样品的保存

4.3.1 用于抗体和抗原检测的血清或血浆样品,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。

4.3.2 用于核酸检测的血浆和血细胞样品4天内进行检测的可存放于4℃,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。

4.3.3 口腔黏膜渗出液样品应即刻使用,需要保存应以产品说明书为准。

4.3.4 尿液样品,使用专用采尿管,室温下可保存2周,一年之内存放宜在2~8℃。长期保存(一年以上)的样本冻存条件、是否添加防腐剂等以产品说明书为准。

4.3.5 用于CD4+T淋巴细胞检测的全血样品,室温保存,时间不超过24小时。如果用CD45设门,样品保存不超过72小时。

4.3.6 筛查阳性样品应及时进行补充试验,筛查阴性样品,可根据具体需要决定保存时间,建议至少保存1个月。特殊用途或专项项目的样品根据具体要求确定保存时间。补充试验阳性样品按照国家生物样品管理的有关规定执行。

4.4 样品的运送

4.4.1 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)。

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

4.4.2.1 第一层容器:直接装样品,应防渗漏。样品应置于带盖的试管内,试管上应有明显的标记,标明样品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。

4.4.2.2 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。

4.4.2.3 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”等字样,还应易于消毒。

4.4.2.4 用于抗体检测的血清和血浆样品应在冻存条件下运送用于CD4+和CD8+T淋

巴细胞测定的样品应在室温下（18~25℃）运送。用于病毒载量检测的样品应在-20℃以下运输。DBS 和尿液样品应在室温下（18~25℃）运送，可通过邮寄方式运送。

4.4.2.5 运送样品必须有记录。

4.5 样品的接收

4.5.1 样品包裹必须在具有处理感染性材料能力的实验室内、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。

4.5.2 核对样品与送检单，检查样品管有无破损和溢漏。如发现溢漏应立即将尚存留的样品移出，对样品管和盛器消毒，同时报告实验室负责人和上一级实验室技术人员。

4.5.3 检查样品的状况，记录血液样品有无严重溶血、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品包装是否完整，如果污染过重或者不符合接收要求，应将样品安全废弃。并立即将样品情况通知送样人，要求重新采集样品。

4.5.4 接收样品时应填写样品接收单。

第二章 HIV 抗体检测

1 范围

本章规定了 HIV 抗体的检测方法、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、采供血及卫生保健机构。可作为对 HIV 感染者诊断和监测的实验室依据。

2 规范性文件引用

《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-有效版本）。

Consolidated Guidelines on HIV Testing Services. WHO July 2015

Statement from the Surveillance and Survey Working Group and the Laboratory Working Group to the Office of the Global AIDS Coordinator. 26 Nov. 2006.

Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance. UNAIDS/WHO. 2009.

《艾滋病病毒抗体快速检测技术手册》（中国疾病预防控制中心，2011年版）

3 HIV 抗体检测实验室要求

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。

4 HIV 抗体检测的目的和要点

4.1 HIV 抗体检测的目的

4.1.1 HIV 抗体检测可用于诊断、血液筛查、监测等。

4.1.2 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、根据特殊需要进行的体检等。

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

4.1.4 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。

4.2 HIV 抗体检测的要点

4.2.1 根据目的选择检测方法及检测策略。

4.2.2 严格遵守实验室标准操作程序（SOP）。

4.2.3 结果判定以试剂盒说明书为标准。

4.2.4 筛查试验有反应，须作补充试验。

补充试验是通过检测样本中是否存在艾滋病病毒抗体、抗原或者核酸而确定艾滋病病毒感染的检测方法。补充试验包括抗体确证试验（免疫印迹试验，条带/线性免疫试验，特定条件*下的替代检测，免疫层析或免疫渗滤试验）和核酸试验（核酸定性和核酸定量试验）。替代检测包括三种酶联免疫试验、三种快速试验或酶联免疫加快速试验。

* 特定条件：高流行地区（流行率大于 5%）、高危人群（如男男同性恋，吸毒人群）、三种试剂均经过使用地区中心实验室评价。

4.2.5 筛查试验无反应，不应做补充试验。

4.2.6 对筛查及补充试验对象均应做好咨询工作。

5 常规 HIV 抗体检测方法

5.1 试剂和样品

必须是经国家食品药品监督管理局注册批准、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。

样品可采用血清、血浆、全血、滤纸干血斑、口腔黏膜渗出液和尿液。

5.2 方法

5.2.1 筛查方法

5.2.1.1 酶联免疫吸附试验（ELISA）

这类试验可使用血液（包含血清、血浆和滤纸干血斑）、尿液样品，ELISA 多为 HIV 抗体检测试剂。HIV 抗原抗体联合检测试剂可同时检测血液中 HIV-1p24 抗原和 HIV-1/2 抗体。HIV 抗原/抗体包被于固相载体，加入待检样品和酶标记的 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

规定。

5.2.1.2 化学发光或免疫荧光试验（CIA/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）、尿液样品，既可检测抗体，也可联合检测抗原抗体。HIV 抗原/抗体包被于固相载体，加入待检样品和酶或荧光标记的 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规定。

5.2.1.3 快速检测（RT）及其它试验

这类试验可使用血液、口腔黏膜渗出液，操作简便快速，适用于应急检测、门诊急诊检测、VCT 及检测点等。一般可在 10~30 分钟内得出结果。

明胶颗粒凝集试验（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，与待检样品作用。当待检样品含有 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质控，需符合试剂盒的规定。

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，加待检样品，利用微孔滤膜的可滤过性，使抗原抗体反应。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。

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，待检样品沿着固相载体迁移，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。

5.2.2 抗体确证试验

5.2.2.1 免疫印迹试验（WB）

WB 可使用血清、血浆和滤纸干血斑。WB 采用间接法检测样品中的抗 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。待测样品经适当稀释后，加至硝酸纤维素膜上，恒温震荡，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，按照试剂盒说明书判定标准，判断待测样品为阳性、阴性或不确定。

5.2.2.2 条带/线性免疫试验（RIBA/LIA）

RIBA/LIA 采用间接法检测样品中的抗 HIV-1/HIV-2 特异性抗体。试剂盒的膜条上包被有 HIV-1/HIV-2 不同的重组抗原片段，加入待测样品后，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，判断待测样品为阳性、阴性或不确定。

5.2.2.3 其他方法：

可用于确证的特定条件下的三种酶联免疫、三种快速试验或酶联加快速试验，免疫层析和免疫渗滤试验。

6 结果报告

6.1 筛查报告

HIV 抗体筛查试验报告使用附表 1（HIV 抗体筛查检测报告）。筛查试验无反应报告为“HIV 抗体阴性”；有反应必须进行复检，复检两次检测均无反应报告为“HIV 抗体阴性”，复检检测均有反应或一个有反应一个无反应需进行“补充试验”；报告为“HIV 感染待确定”，不能出具阳性报告。

HIV 抗体筛查报告需由一名检验人员和一名审核者签字。

6.2 确证报告

6.2.1 WB 及 RIBA/LIA 报告

HIV 抗体 WB 及 RIBA/LIA 试验结果报告使用附表 2（HIV 抗体确证检测报告）。

（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 抗体阴性判断标准，报告“HIV 抗体阴性”。如疑似“窗口期”感染，建议进一步做 HIV 核酸检测或 2-4 周后随访，尽早明确诊断。

（3）符合 HIV 抗体不确定判断标准，报告“HIV 抗体不确定”，在备注中应注明“2-4 周后复检”或尽快做核酸检测。

（4）HIV 抗体确证检测报告应在收到样品后的 7 个工作日内发出。

6.2.2 特定条件的用于确证的三种酶联免疫、三种快速试验或酶联加快速试验报告。

见附表 4。

7 质量控制

7.1 酶免或发光法抗体检测的室内质量控制

7.1.1 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。每一次检测临床样品时，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。

7.1.2 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品检测的可信性。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、且不含有影响试剂反应的防腐剂。

7.1.3 Levey-Jennings 质控图

7.1.3.1 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): 是描述样品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。

7.1.3.2 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/CO 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/CO 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。

7.1.3.3 质控图的分析及失控处理

实验室应建立质控图分析及失控情况处理的程序。当出现失控时,必须找出发生问题的原因,找出解除问题的方法,并消除原因。

7.1.4 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:

7.1.4.1 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)。

7.1.4.2 计算 \bar{x} 和 s 。

7.1.4.3 计算 $SI_{\text{上限值}}$ 和 $SI_{\text{下限值}}$ 。

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

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

7.1.4.4 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

(1) 当 $SI_{\text{上限}}$ 和 $SI_{\text{下限}} < n_{2s}$ 时表示处于控制范围内，可以继续测定。继续重复以上各项计算。

(2) 当 $SI_{\text{上限}}$ 和 $SI_{\text{下限}}$ 有一值处于 $n_{2s} \sim n_{3s}$ 值之间时说明该值在 $2s \sim 3s$ 范围，处于“告警”状态。

(3) 当 $SI_{\text{上限}}$ 和 $SI_{\text{下限}}$ 有一值 $> n_{3s}$ 值时说明该值已在 $3s$ 范围之外，属“失控”。

“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。

7.2 快速法抗体检测质控

7.2.1 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，样品须重检。

7.2.2 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品和阴性样品。自制质控品可使用本室保留的阳性样品。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 份样品，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。

7.2.3 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。

第三章 HIV-1 新发感染检测

1 范围

本章规定了 HIV 新发感染的检测方法、程序、结果报告及质量控制。适用于开展新发感染检测的各类实验室。

2 规范性文件引用

Technical update on HIV incidence assays for surveillance and monitoring processes. WHO/UNAIDS. 2015.

Guidelines for the use of the BED assay for incidence estimation and surveillance in resource-limited countries. Atlanta, 5 June 2006.

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.

3 新发感染检测实验室要求

须经过培训考核合格的艾滋病检测实验室，方可开展本项检测。

4 目的

了解重点人群 HIV-1 新发感染情况，为估计艾滋病流行形势和判断疫情变化提供科学依据。

5 新发感染检测方法

5.1 方法学原理

用于新发感染检测的方法包括 HIV-1 限制性抗原亲和力酶联免疫方法（HIV-1 LAg - Avidity enzyme immunoassay, LAg-Avidity EIA）和 BED HIV-1 捕获酶联免疫方法（BED capture enzyme immunoassay, BED-CEIA）。LAg - Avidity EIA 方法的原理是，人体在感染 HIV 后产生的 HIV-1 特异性抗体对相应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。而 BED-CEIA 方法的原理是，HIV 特异性 IgG 占总 IgG 抗体的比例随着感染时间的延长而逐渐增高。

两种方法均只适用于 HIV-1 抗体阳性样品。只应用于监测目的，不能用于个体诊断和临床，其用于监测及发病率计算的条件参见“《艾滋病病毒新发感染监测操作手册》”。目前对两种方法的评价结果显示，LAg - Avidity EIA 方法的假阳性率较 BED-CEIA 方法低，受疾病状态，如 CD4 细胞计数，抗病毒治疗等因素的影响较 BED 方法小，可以更加准确地地区分新近感染和长期感染者。因此，BED-CEIA 方法正逐渐被 LAg - Avidity EIA 方法所替代。此外，也有快速新发感染检测方法的研究报道，因其具有快速、简便、价格低廉等优点，未来对其需求将会越来越多。

5.2 方法

5.2.1 样品和信息：来源于哨点监测和病例报告系统，用于检测的为抗体阳性样本。

5.2.2 实验室检测：首选推荐 LAg - Avidity EIA，也可使用 BED-CEIA。

5.2.3 数据分析：根据哨点监测各人群新发感染检测结果，结合流行病学相关资料，计算重点人群 HIV-1 新发感染率，并进行适当校正；根据病例报告系统新报告感染者新发感染检测结果，计算新发感染者占新报告感染者的比例，并根据相关背景信息，综合分析新发感染情况。

5.3 样品的入选标准和排除标准

5.3.1 入选标准

(1) 新发感染检测必须应用诊断为 HIV-1 抗体阳性的血清或血浆或 DBS 样品，禁止将 HIV-1 抗体阴性样品纳入新发感染检测。

(2) 每份样品量不少于 1mL。样品要求清亮、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。

5.3.2 排除标准

5.3.2.1 LAg - Avidity EIA 方法

(1) 如果同一人在六个月以内出现两份或两份以上确认阳性样品，将第一份样品纳入新发感染检测。

(2) 所有艾滋病病人的样品。

(3) 所有接受抗病毒治疗的感染者样品。

5.3.2.2 BED-CEIA 方法

(1) 如果同一人在六个月以内出现两份或两份以上确认阳性样品，将第一份样品纳入新发感染检测。

(2)所有艾滋病病人的样品。

(3)所有接受抗病毒治疗的感染者样品。

(4)CD4 细胞 <200 个/uL 者的样本。

5.3.3 相关要求

(1) 对于哨点样品，进行新发感染检测的样品量必须占应检测阳性样品的 85%以上，否则不纳入新发感染检测。

(2)哨点样品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。病例报告样品应当填写病例报告系统卡片 ID 号。

5.4 结果处理和解释

5.4.1 LAg - Avidity EIA 方法:

5.4.1.1 确定对照和校准品的中值 OD 值(中值 OD 值为 3 次 OD 值排序后中间的值，阴性对照的中值为两孔 OD 值的平均值)，对照和校准品的中值 OD 值必须在下表范围内，两个 NC 样品的 OD 值都必须在该范围内，该试验才有效。否则，任何一个对照和校准品的中值 OD 值不在表 2 范围内，判定为无效，需要重新稀释样品进行检测。

5.4.1.2 计算标准 OD 值 (OD_n)

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：各样品的 OD_n 值=各样品的 OD 值/校准品的中值 OD 值

确认试验：各样品的 OD_n 值=各样品的中值 OD 值/校准品的中值 OD 值任一对照和校准品的 OD_n 值必须在下表显示值的范围内，该试验才有效。否则，如果任何一个对照的 OD_n 值不在表 3 范围内，该试验判定为无效，需要重新稀释样本并进行检测。

5.4.1.3 结果的解释

初筛试验：样本进行单孔检测，当 OD_n 值 >2.0 时，该样本被判为长期感染样本，不需要进行确认试验。当样本的 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 的样本稀释三份并三孔重复检测。当 OD_n 值 ≤ 1.5 ，该样本判为近期感染，当 OD_n 值 >1.5 时，该样本判为长期感染样本。

5.4.2 BED-CEIA 方法

5.4.2.1 确定对照和校准品的中值 OD (中值 OD 为 3 次 OD 值排序后中间的值)，对照和校准品的中值 OD 值必须在表 4 范围内，该试验才有效。两个 NC 样品的 OD 值在初筛和确认中都必须在该范围内。

5.4.2.2 计算标准 OD 值 (OD_n)

对照的 OD_n 值 = 对照的中值 OD / 校准品的中值 OD

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

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

对照和校准品 OD_n 值的正常范围: 对照和校准品的 OD_n 值必须在要求的范围内, 该试验才有效。

5.4.2.3 结果解释

在中国的研究显示, BED 的 OD_n 为 0.8 时, 可以指明平均血清阳转时间为 168 天。OD_n 为 0.8 时可以减少 AIDS 病人错分为近期感染的几率, 进而得到较好的近期感染的预测值。

在初筛试验中样本为单份检测, 当 OD_n 值 ≤ 1.2 时, 样本需分成三份重复检测。在确认试验中, 若 OD_n 值 ≤ 0.8 时, 该份样品判为近期感染。

5.5 数据分析

5.5.1 LAg - Avidity EIA HIV-1 新发感染率的计算

监测哨点 HIV-1 新发感染率是指: 各省哨点监测重点人群中, 每年新感染 HIV-1 人群占暴露人群的比例。原则上以省为单位计算各重点人群新发感染率。当样品数量足够大时, 可以考虑按照地区计算新发感染率, 也可以按照设定的因素 (如年龄、性别、感染途径、婚姻状况、行为因素、受教育程度、地区等) 对 HIV-1 新发感染率监测数据进行分层分析将新发感染检测数据汇总后, 即可进行类似分析。

新发感染率计算公式:

(1) 美国 CDC 和 UNAIDS/WHO 推荐用于横断面研究计算公式:

$$I = \frac{R - FRR * P}{(1 - FRR) * (w / 365) * N} \times 100\%$$

(2) Hargrove 校正法:

$$\text{中点公式: } I = \frac{R - FRR * P}{(R / 2) + N(w / 365) - FRR * (N + P / 2)} \times 100\%$$

$$\text{回顾公式: } I = \frac{R - FRR * P}{R + N(w / 365) - FRR * T} \times 100\%$$

变量符号：①待计算的变量值：I=新发感染率（高危人群中每 100 人年新感染的数量）；②在横断面调查中测量的变量值：T=调查的总人数，P=HIV-1 检测为阳性的总人数，N=HIV-1 检测为阴性的总人数，R=实验判定为新近感染的总人数；③从单独的校准研究中获得的变量值：w=窗口期（从血清阳转到实验方法能够判为新发感染的最长时间），FRR=错分率。

ODn 等于 1.5 为界值判定新发感染计算 LAg 方法的窗口期为 130 天。感染时间超过一年且未接受 ART 治疗 HIV 感染者获得的 FRR 为 2.30%。

5.5.2 BED HIV-1 新发感染率的计算

监测哨点各类人群 HIV-1 新发感染率。同亲和力方法。新发感染率有 McDougal 和 Hargrove 两种算法（在中国推荐优先使用 McDougal 算法），每种方法均有中点公式和回顾公式。回顾公式是对在横断面抽样前一年的新发感染率估计，中点公式是对在横断面抽样约+/- 6 个月时的新发感染率估计。

(1) McDougal 法（调整灵敏度/特异度）

$$\text{中点公式: } I = \frac{F \times (365 / w) \times R}{N + F \times (365 / w) \times R / 2} \times 100\%$$

$$\text{回顾公式: } I = \frac{F \times (365 / w) \times R}{N + F \times (365 / w) \times R} \times 100\%$$

$$\text{校正因子 F: } F = \frac{(R / P) + \gamma - 1}{(R / P) \times (\alpha - \beta + 2\gamma - 1)} \times 100\%$$

(2) Hargrove 法(调整特异度)

$$\text{中点公式: } I = \frac{R - \varepsilon P}{(R / 2) + N(w / 365) - \varepsilon N - \varepsilon (P / 2)} \times 100\%$$

$$\text{回顾公式: } I = \frac{R - \varepsilon P}{R + N(w / 365) - \varepsilon T} \times 100\%$$

变量符号：①待计算的变量值：I=新发感染率（高危人群中每 100 人年新感染的数量），F=调整灵敏度或特异度的调整因子；②在横断面调查中测量的变量值：T=调查的总人数，P=HIV-1 检测为阳性的总人数，N=HIV-1 检测为阴性的总人数，R=实验判定为新近感染的总人数；③从单独的校准研究中获得的变量值：w=窗口期（从血清阳转到实验方法能够判为新发感染的最长时间）， α = 实验方法检测新发感染(<1w)的灵敏度， β = 实验方法对感染时间在 1w-2w 天样品的特异度， γ = 实验方

法对感染时间超过 2w 天样品的特异度, ϵ = 实验方法对感染时间超过 2w 天样品的误判率。

我国 BED 方法 HIV-1 新发感染相关的校正系数值是基于分析来自 1565 个已知血清阳转日期(大约)样品的 BED 检测值, 这些值为: $w=168$ 天, $\alpha=0.8098$, $\beta=0.7571$, $\gamma=0.9315$, $\epsilon=0.0685$

6 质量控制

6.1 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, 而且在正式开展新发感染检测工作之前, 至少要做 5 次预实验, 除阴性对照外, 其他样本 OD_n 值的 CV 值均需小于 15%。必须参加能力验证, 如结果不合格, 需仔细分析原因, 纠正后方可继续开展检测。

6.2 样品质控

所有样品的采集、运输、检测及保存必须严格按照本规范执行。样品检测之前要核对正确, 并完全融化, 充分混匀。稀释样品以及将稀释好的样品加入酶标板时, 必须使用带滤芯的枪头, 避免交叉污染。

6.3 试剂质控

6.3.1 试剂内对照

每个试剂盒内均含有厂家提供的阴性、低值阳性、高值阳性和校准品, 用于判断每次实验的有效性, 要求每次实验的 OD 和 OD_n 值均需在规定范围内, 否则结果视为无效, 必须重新进行检测。每次检测样品时, 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。

6.3.2 试剂外质控

新发感染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。每次实验须同时做外部对照, 如外部对照不通过须重新实验。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, 避免使用临近有效期的试剂。

6.4 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、孵育箱，以保证结果准确性。保留所有的原始实验记录，并有检测人以及复核人的签字。如果初筛实验和确认实验同一份样本的ODn 值相差较远，一致性较差，需要3孔复检，做第三次检测，以两次相关性较好的结果为最终结果。

第四章 HIV-1 抗原检测

1 范围

本章规定了 HIV-1p24 抗原检测的方法和用途。适用于对人血液样品和病毒培养上清液中 HIV-1p24 抗原的检测。

2 规范性文件引用

NIAIDVirology Manual for HIV Laboratory, NIH Publication, No. 97-3828, Jan 1997.

Niel Constantine , HIV Viral Antigen Assays, HIV InSite KnowledgeBaseChapter, September 2001, <http://hivinsite.ucsf.edu>

3 HIV-1p24 抗原检测的意义

- 3.1 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 第四代 HIV 检测试剂（抗原抗体检测试剂）的阳性结果的辅助诊断。
- 3.3 HIV-1 分离培养、病毒复制状况的监测。

4 实验室要求

同 HIV 抗体检测。

5 检测方法及程序

5.1 试剂：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）、抗原抗体快速检测法等。应使用经国家药品监督管理局批准注册的试剂。

5.2 样品：血清、血浆、全血或病毒培养上清液。

5.3 定性检测

5.3.1 筛查试验

酶联免疫吸附实验（ELISA 法）：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原抗体复合物，再加入酶（HRP）标记的 HIV-1 抗体与抗原结合，加底物显色，在酶标仪上读取结果。

酶联荧光分析法（ELFA）：待测样品的 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。对每份标本的固相孔（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。

电化学发光法（ECLIA）：待测样品的 p24 抗原与包被抗体的磁性微粒和发光剂标记的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）判读结果。

抗原抗体快速检测法：待检样本中的 HIV 抗体、HIV-1 p24 抗原分别与样品垫中的 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。

筛选试验依据试剂盒说明书提供的标准判断有反应或无反应。

5.3.2 中和试验

中和试验主要是 p24 抗原检测的补充试验，还可做 HIV-1RNA 的定性或定量检测，以排除筛查试验的假阳性。

中和试验：

（1）酶联免疫吸附实验（ELISA 法）：待检样品先与中和剂（p24 抗原的抗体）共同孵育，如果样品中存在 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。之后，用这样处理过的样品重复筛查实验，同时做一孔未中和的原始样品对照，将中和与未中和孔的 OD 值进行比较，如果中和孔的 OD 值下降 50%以上，认为样品中的 p24 抗原是真阳性；如果中和孔没有出现 OD 值的下降或下降的幅度不到 50%，认为筛选试验 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。

(2) 酶联荧光分析法 (ELFA): 原理和检测步骤同上述酶联免疫吸附实验 (ELISA 法)。结果判断方法为, 比较中和与未中和样品的荧光值 (RFV), 根据说明书提供的方法计算中和率, 如果中和率大于或等于 60 % , 认为样品中的 p24 抗原是真阳性; 如果中和率小于 60%, 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。

(3) 电化学发光法 (ECLIA): 原理和检测步骤同上述酶联免疫吸附实验 (ELISA 法)。结果判断方法为, 比较中和与未中和样本的 COI 值, 根据说明书提供的方法计算中和率, 如果中和率大于 50 % , 认为样品中的 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。HIV-1RNA 检测按照相关章节执行。

5.4 定量检测

将 p24 抗原的标准物质稀释成包含 0.0 和 125pg/ml 两个浓度在内的六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), 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。测出未知样品的反应值 (OD 值、或 RFV 值、或 COI 值) 以后, 可在标准曲线上查出抗原的浓度。如果未知样品的反应值超出标准曲线上最高抗原浓度的反应值, 则需用正常人血清将样品稀释以后再行检测。

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)。

5.5 结果报告和解释

应按照试剂盒说明书报告和解释。

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

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

5.5.3 HIV-1 p24 抗原阴性结果不能排除 HIV 感染。

6 质量控制

6.1 定性检测

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 的内部对照应满足试剂盒规定的条件, 还可以使用

含有中等浓度 p24 抗原的质控品（血浆或病毒培养上清液）作为外部对照，按照常规的质控方法绘制质控图。中和试验应使用试剂盒提供的中和抗体，使用已知 p24 抗原阳性的样品作为阳性对照，阳性对照中的中和孔，OD 值应下降 50%以上。

酶联荧光分析法（ELFA）：每更换批号后或每间隔 14 天时，必须用试剂盒提供的校准品进行校准，校准值必须在设定的相对荧光值内，若超出范围，必须重新校准。每次校准还需要同时检测试剂盒提供的阴性对照和阳性对照。还可以使用含有中等浓度 p24 抗原的质控品（血浆或病毒培养上清液）作为外部对照，按照常规的质控方法绘制质控图。中和试验应使用试剂盒提供的中和抗体，使用已知 p24 抗原阳性的样品作为阳性对照，阳性对照的中和率应大于或等于 60%。

电化学发光法（ECLIA）：每更换批号后或每间隔 7 天或按说明书要求的时间间隔，必须使用试剂盒提供的标准品进行校准，校准值必须满足说明书的要求，还可以使用含有中等浓度 p24 抗原的质控品（血浆或病毒培养上清液）作为外部对照，按照常规的质控方法绘制质控图。中和试验应使用试剂盒提供的中和抗体，使用已知 p24 抗原阳性的样品作为阳性对照，阳性对照的中和率应大于 50%。

抗原抗体快速检测法：检测板表面标记有“检测线 1、2”和“质控线”。加入样本前，在结果窗口看不见检测线和质控线的。质控线用于过程的质量控制，出现质控线表示其所在的测试条主要组份活性正常，已正确加入稀释剂。质控线不保证样品已正确加入，也不能作为阳性样品的质控。

6.2 定量检测

绘制标准曲线时，0.0 和 125pg/ml 二个 p24 抗原浓度的测定值应符合说明书的要求。

第五章 HIV 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 核酸的定性检测和病毒载量的测定。

2 规范性文件引用

《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 有效版本。

《艾滋病诊疗指南第三版（2015 版）》，中华医学会感染病学分会艾滋病学组。中华临床感染病杂志 2015， 08（05）385-401.

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）。

《实验室生物安全通用要求》（GB19489-2008。

《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。

《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）。

Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. US DHHS 2015 WHO.

Recommendationson The Diagnosis of HIVInfection inInfantsand Children. World Health Organization 2010.

段星，冯霞，王继宝等，H I V 抗体检测结果不确定时应用核酸诊断的可行性研究。中国艾滋病性病， 2 0 1 4， 2 0（1 1）：815-817。

陈会超，苏莹珍，陈敏等，核酸检测在艾滋病晚期患者诊断中的应用。现代预防医学，2014， 41（16）：3025-3027。

李敬云。HIV 早期感染诊断方法与应用。传染病信息。2007，20（6）：352-356。

Roche COBAS Amplicon/COBAS TaqMan HIV-1 TEST, Procedure Manual, version 2.0.

Biomerieux Nuclisens® EasyQ HIV-1 Operation Manual, V2.0.

Molecular HIV screening. Expert Rev. Mol. Diagn. 7: 693 - 705. 2013.

Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection, Updated Recommendations , Published June 27, 2014, USA CDC.

Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. AIDS 24:941 - 945, 2010.

3 核酸检测的意义

3.1 HIV-1 感染诊断

3.1.1 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。

3.1.2 HIV-1 感染补充试验及急性期和晚期感染者的诊断

核酸检测作为补充实验可用于 HIV-1 感染诊断，包括抗体复检试验有反应和抗体补充试验不确定样本的判定；急性期和晚期感染者的诊断。

对于急性期感染和晚期的诊断需结合流行病学史、临床症状以及其他相关实验室检测指标（如 CD4+T 淋巴细胞计数等）。此外，对 HIV 抗体阴性的高危人群样品以及采供血机构的原料血浆进行集合核酸检测，可及时发现窗口期感染，降低“残余危险度”，减少二代传播。

核酸检测结果低于最低检测限不能排除 HIV-1 感染。

3.2 治疗效果监测

艾滋病病人经抗病毒药物治疗后，定期进行 HIV-1 核酸定量检测，可判断抗病毒药物治疗的治疗效果。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。通常在治疗一个月后病毒载量降低 0.5log 以上才被认为临床治疗有效，六个月后应降到小于检测限（详见我国艾滋病抗病毒药物治疗手册）。

3.3 病程监控及预测

HIV 感染者体内病毒载量的变化具有一定规律，这种变化与疾病的进程密切相关。对未进行抗病毒药物治疗的感染者定期进行病毒定量检测，可监测病程变化，定期进行 HIV 病毒载量检测有助于确定疾病发展的阶段。

3.4 耐药性监测

可用于 HIV 耐药检测和监测,指导公共卫生医生了解耐药性病毒株流行的态势和指导临床医生判断病人的抗病毒药物治疗效果和修改抗病毒药物治疗方案。

4 HIV 核酸检测实验室要求

HIV 核酸检测应在合适的实验室中进行,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指导书,实验人员必须充分了解各项规定并严格遵照执行。核酸定性、定量检测要严格满足分子生物学和 PCR 扩增实验室的要求。

4.1 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 病毒载量测定及质量保证指南》的要求进行。

4.2 实验室人员和要求

进行 HIV 核酸检测的人员须具有艾滋病核酸检测的上岗资格,接受过省、市级以上的实验操作技术培训及厂家的培训,并接受实验室生物安全培训。

4.3 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)。

5 HIV-1 核酸检测方法及程序

5.1 HIV-1 核酸定性检测

5.1.1 适应范围

(1) 诊断婴儿早期感染:见第六章中“婴儿 HIV-1 感染早期诊断相关的检测策略及结果报告”。

(2) 诊断急性 HIV-1 感染。针对对 HIV-1 抗体筛查阴性、近期有流行病学史的个体,或确证结果不确定的样本,核酸定性检测可用于诊断 HIV-1 急性期感染。

(3) 确定艾滋病病毒感染。针对 HIV-1 抗体筛查阳性或确证结果不确定的个体,结合流行病学史和临床病史,核酸定性检测可用于 HIV-1 感染诊断。艾滋病晚期患者可能出现 HIV 抗体反应不确定,可根据 HIV 核酸定性检测结果,结合临床病史和

CD4+T 淋巴细胞计数等情况，进行综合判断，确定临床诊断。

5.1.2 方法：血浆、血清、组织器官或血液制品等可用于检测 HIV-1RNA 和 DNA。DBS 可用于检测 RNA/DNA。全球目前正式用于临床诊断 HIV-1 急性期感染的核酸检测试剂比较少，主要是美国 FDA 批准的 Gen-Probe 公司生产的 Aptima HIV-1 RNA 核酸定性检测试剂和欧盟批准的 Abbott M2000HIV-1 RNA/DNA 定性检测试剂。前者检测原理为转录介导等温扩增（TMA）和化学发光标记探针杂交检测，检测靶基因为 HIV-1 LTR 和多聚酶基因；后者检测原理为 Taqman 实时荧光 PCR 扩增检测，检测靶基因为多聚酶区整合酶基因。国内生产的用于血浆及其血液制品筛查的核酸检测试剂主要为 Taqman 实时荧光 PCR 检测试剂。

5.1.3 试剂：必须是经国家食品药品监督管理总局注册批准、在有效期内的试剂。严格按说明书操作。

5.1.4 结果判定与报告：检测结果显示“有反应”或“检测到”，报告本次实验核酸阳性；检测结果显示“无反应”或“未检测到”，报告本次实验核酸阴性。核酸定性检测值低于最低检测限的结果，不能排除 HIV-1 感染，需根据流行病学史、临床病史和实验室相关指标进行综合判断。

目前国内外没有商品化的 HIV-2 核酸检测试剂。

5.2 HIV 核酸定量检测

5.2.1 适用范围

（1）监测抗病毒药物治疗效果。抗病毒药物治疗前后，定期病毒载量分析和监测，结合 CD4+T 淋巴细胞计数，有助于抗病毒药物治疗方案的确定和修改。

（2）监测疾病进展。定期检测 HIV-1 病毒载量，有助于监测感染者和病人的病程变化，结合 CD4+T 淋巴细胞计数，为抗病毒药物治疗提供病毒学依据。

（3）诊断急性 HIV-1 感染。针对 HIV-1 抗体筛查阴性、近期有流行病学史的个体，或确证结果不确定，核酸定量检测可用于诊断 HIV-1 急性期感染。

（4）确定 HIV-1 感染。针对 HIV-1 抗体筛查阳性或确证结果不确定的个体，结合流行病、和临床病史和 CD4+T 淋巴细胞计数等，使用核酸定量检测帮助确定 HIV-1 感染。

5.2.2 方法

HIV-1 核酸定量检测原理主要基于靶核酸扩增 RT-PCR 和信号放大扩增两种方法。

靶核酸扩增检测试剂包括Taqman荧光实时定量RT-PCR扩增试剂（Roche CobasTaqMan v2.0和Abbott RealTime HIV-1）和分子信标实时荧光定量RT-PCR靶核酸扩增试剂（NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0）；信号放大扩增系统包括分枝链DNA杂交扩增试剂（Versant HIV-1 RNA bDNA 3.0）。我国实验室常用国内外生产的实时荧光定量RT-PCR靶核酸扩增试剂（荧光探针法）。尽管目前国内外生产的HIV-1核酸定量检测试剂在检测中需要的样本量不同（0.1mL-1mL），但均能在检测线性范围内准确地检测到1000c/ml HIV-1，有助于早期判断治疗失败、可定向实施依从性干预，确保抗病毒药物治疗效果。国内外定量检测试剂检测结果的报告单位，多为每毫升血中病毒的拷贝数（CPs/ml）。拷贝数与国际单位之间的转换可参照各检测试剂的说明或相关研究文献。目前没有商品化HIV-2定量检测试剂。

5.2.3 试剂

必须是经国家食品药品监督管理局注册批准、在有效期内的试剂。严格按说明书操作。

5.2.4 结果判定与报告

按照试剂盒说明书判定结果。

5.2.4.1 用于治疗效果和病程监测：检测值小于试剂盒线性范围下限，报告低于检测限，检测值大于等于试剂盒线性范围下限，按照检测值报告。

5.2.4.2 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)，尽快再次严格按核酸检测的要求采样检测，报告检测值，结果 >5000 CPs/ml (或IUs/ml)，报告检测值，结果仍 ≤ 5000 CPs/ml，则需充分结合流行病学史、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。检测值低于最低检测限不能排除HIV-1感染。（注：由于核酸定量检测方法获得的低病毒检测值可能是核酸污染所致，根据国内外的相关数据和报道，建议用5000 CPs/ml作为判断结果的阈值，两次定量检测有助于准确判断结果）。

由于HIV-1高度变异，影响HIV-1病毒载量检测分析的敏感性，且同一样本由于不同试剂的方法学差异，可能出现不同的结果。因此应选择能检测出当地HIV-1流行毒株的试剂；评估抗病毒药物疗效和病程进展，对同一病人宜使用相同试剂，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。

5.3 集合核酸定性检测 (Pooling PCR)

利用核酸检测方法的高度敏感性,对高危人群抗体检测阴性的样品进行集合核酸检测,可及时发现窗口期 HIV-1 感染者。该方法较单份样品的核酸检测具有更高的成本效益。

5.3.1 样品集合程序

5.3.1.1 根据预处理样品量,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品编号。

5.3.1.2 吸取 130 μ L 样品,移入标记二级集合的离心管中;10 份样品形成一个 1300 μ L 的二级集合样品,充分涡旋震荡混匀。

5.3.1.3 从 5 个二级集合管中分别吸取 210 μ L 样品,移入标记有一级集合的离心管中,形成由 50 份样品 1050 μ L 体积组成的一级集合样品,充分涡旋震荡混匀。

5.3.1.4 从每个一、二级集合管中吸取 500 μ L 集合样品,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。

5.3.1.5 制备阴性集合外部质控品:使用 50 份 HIV 抗体和核酸阴性样品,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。

5.3.1.6 制备阳性集合外部质控品:从 9 份 HIV 抗体和核酸阴性样品和一份至少含有 HIV-1 RNA $10^{3.3}$ CPs /ml 阳性样品中,分别移取 130 μ L 加入离心管中,形成一个 1300 μ 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 μ 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。

5.3.1.7 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品的检测。

5.3.2 集合样品的检测和分解路线

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,集合样品的数量根据各试剂方案操作。方法简述如下:

5.3.2.1 用 HIV-1 病毒载量检测方法对一级集合样品进行检测,阳性反应的一级集合样品进入下一检测步骤。

5.3.2.2 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品进行检测,阳性反应的二级集合样品进入下一检测步骤。

5.3.2.3 用 HIV-1 RNA RT-PCR 标准检测方法检测所有组成阳性二级集合样品的 10 份单个样品，确定核酸阳性的单个样品。

5.3.3 适用范围

血液筛查和各类高危人群样品，通常是抗体筛查阴性样品。要求样品采集、分离、保存均能满足核酸检测要求。

5.4 HIV 核酸即时检测(molecular point-of-careTesting, POCT)

HIV 核酸即时检测是在发病或者发生事件的地点进行检测，能快速获得检测结果并及时反馈一线医务人员的一类检测方法。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、疾病监控及抗病毒药物疗效评价。

6 质量保证和质量控制

质量控制包括从样品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）。

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。

6.1 实验室分区和环境

HIV-1 病毒载量检测实验室原则上应分为三个独立工作区：试剂准备区、样品处理区、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：从试剂准备区到样品处理区，然后到扩增产物分析区，不能逆向流动。

6.2 仪器设备质量控制

加样器、温湿度计须经计量部门校准，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测量温度，并做好记录。

6.3 检测过程质量控制

用于 HIV 感染临床辅助诊断试剂要保证所有试剂盒有效并经国家食品药品监督管理总局注册，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 5000~15000³CPs /毫升的外部质控品；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。

6.4 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的能力验证，每次 5 个样品，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。

第六章 艾滋病病毒感染实验室检测策略

1 范围

本章规定了艾滋病实验室的检测策略及结果报告。主要包括：疫情监测相关的检测策略及结果报告；临床诊断相关的检测策略及结果报告；血液筛查相关的检测策略及结果报告。

2 规范性文件引用

《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，有效版本）。

Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection. US CDC. 2014.

Consolidated Guidelines on HIV Testing Services. WHO July 2015.

冯霞，王继宝，田雨等，尿液 HIV-1 抗体检测的临床应用评价。中国艾滋病性病杂志，2016，第 4 期。

3 疫情监测相关的检测策略及结果报告

3.1 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品，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”。检测流程见图 1。

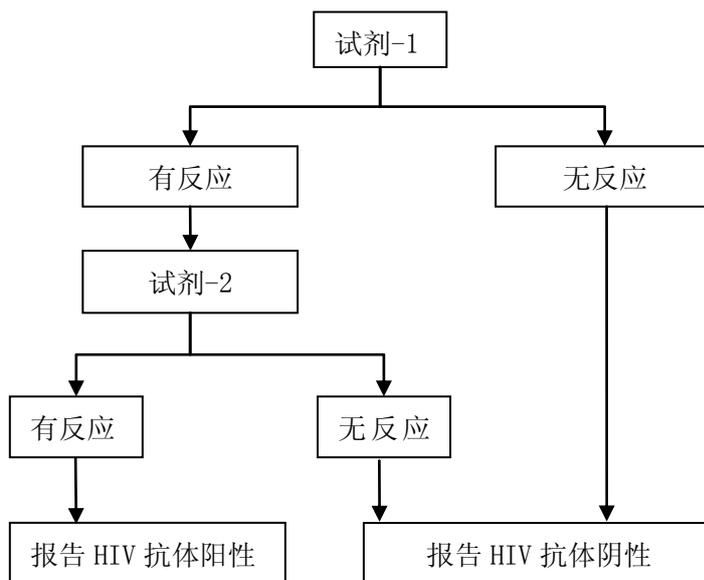


图 1 HIV 匿名无关联检测流程

3.2 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策略及结果报告。

4 临床诊断相关的检测策略及结果报告

4.1 使用抗体检测试剂的筛查检测流程

用试剂 1 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。对初筛有反应的样品，用原有试剂双份或双孔进行复检试验（或者两种试剂复检），如均无反应，报告“HIV 抗体阴性”；如均有反应或一个有反应一个无反应，进行补充试验（见第二章 4.2.4），报告 HIV 感染待确定。临床诊断筛查检测流程见图 2。

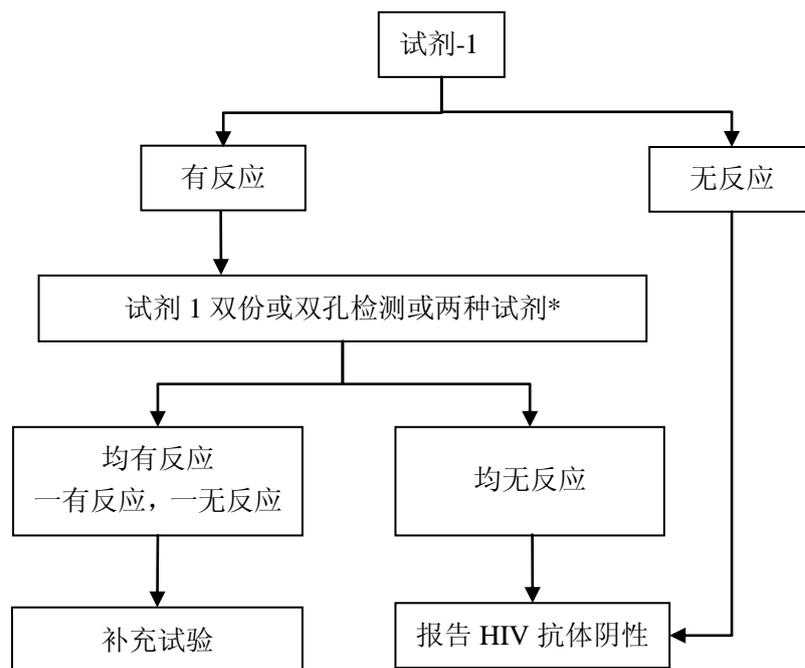


图2 使用抗体检测试剂的筛查检测流程

*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。

4.2 使用抗原抗体检测试剂的筛查检测流程

抗原抗体检测试剂分为两类，一类是抗原和抗体在一个反应体系内，不能区分抗原和抗体检测结果，另一类是抗原和抗体分别在不同的反应体系内，可区分抗原和抗体检测结果。

4.2.1 用不能区分抗原抗体的试剂进行初筛，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。对初筛有反应的样品，用抗体检测试剂进行复检试验，结果有反应，进行抗体补充试验；结果无反应，进行 HIV-1 核酸试验、HIV-1 P24 抗原试验或 2-4 周后随访，HIV-1 核酸检测见本章 4.3.2，HIV-1 P24 抗原试验见第四章。检测流程见图 3。

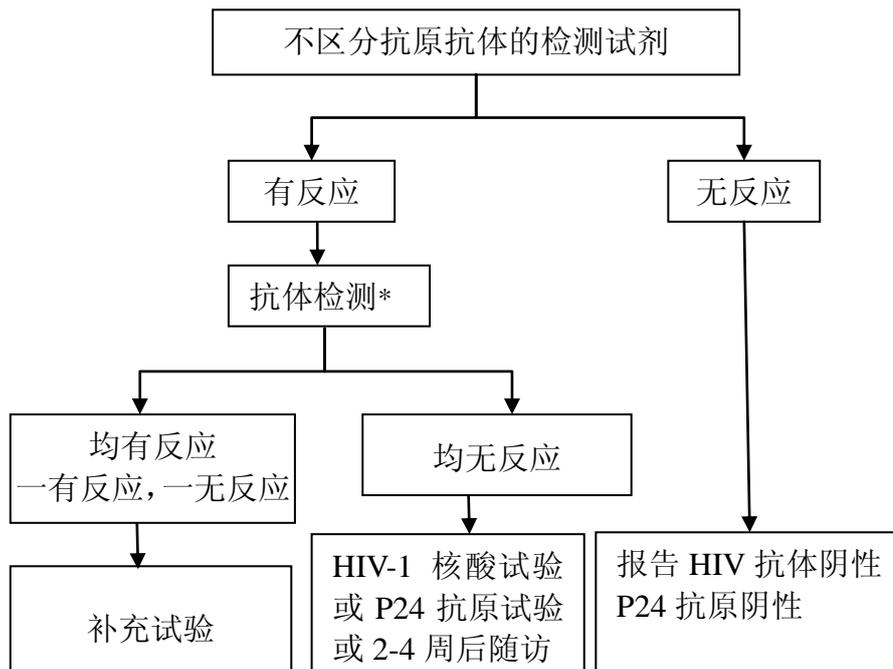


图 3 使用不区分抗原抗体联合检测试剂的筛查检测流程

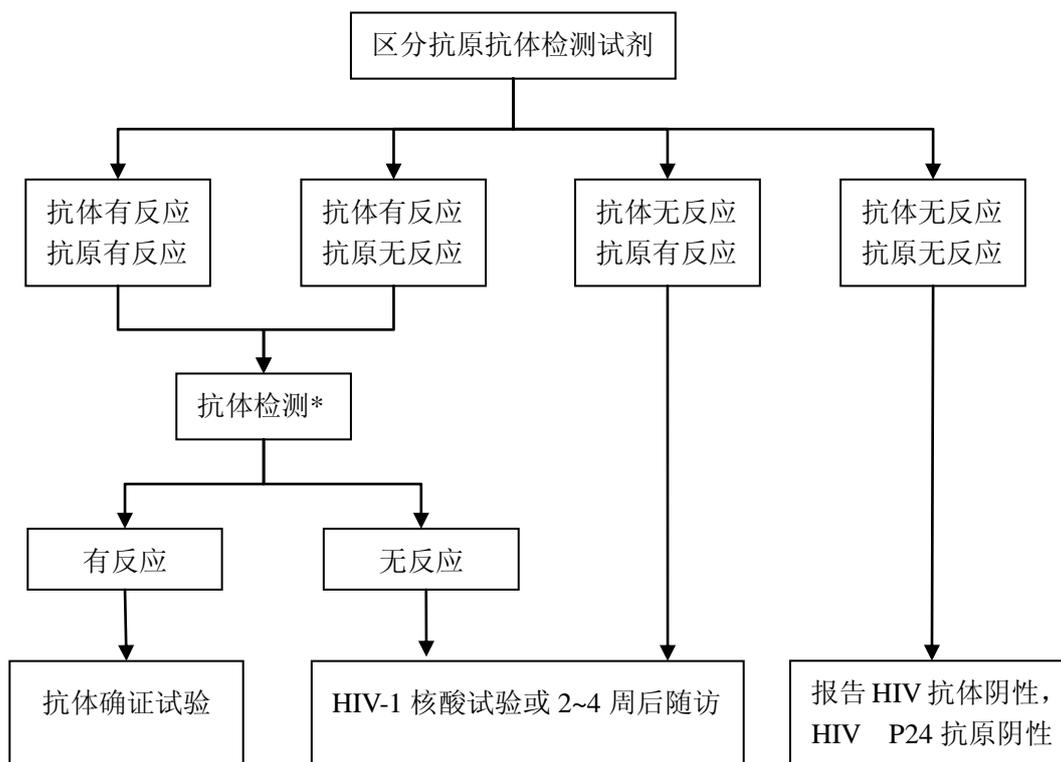


图 4 区分抗原抗体检测试剂筛查检测流程

*抗体检测：双份或双孔检测

4.2.2 用可区分抗原抗体的试剂进行初筛，抗原抗体结果均无反应，报告“HIV 抗体阴性、HIVp24 抗原阴性”；抗原抗体结果均有反应，进行抗体复检检测，结果有反应，做补充试验，结果无反应，进行 HIV 核酸试验或 2-4 周后随访；抗体有反应抗原无反应，进行抗体复检检测，结果有反应做抗体确证试验，结果无反应判为抗体阴性、P24 抗原阴性；抗体无反应抗原有反应，进行 HIV 核酸或抗原试验或 2-4 周后随访。检测流程见图 4。

4.3 补充试验检测策略

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剂（WB）和条带/线性免疫试验（RIBA/LIA），特定条件下的替代检测（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。

4.3.1 抗体确证试验检测流程

4.3.1.1 免疫印迹试剂和条带/线性免疫试验（WB/RIBA）

复检试验有反应的样品（图 2），进行抗体确证试验。结果阴性者，报告“HIV 抗体阴性”，如果有流行病学史，需要 2-4 周后随访，或进行核酸试验；结果阳性者，报告“HIV-1 抗体阳性”，按规定做好检测后咨询和疫情报告。结果不确定者，报告“HIV 抗体不确定”。建议对“HIV 抗体不确定”者进行 HIV-1 核酸试验或 2-4 周后随访。抗体确证试验流程见图 5。

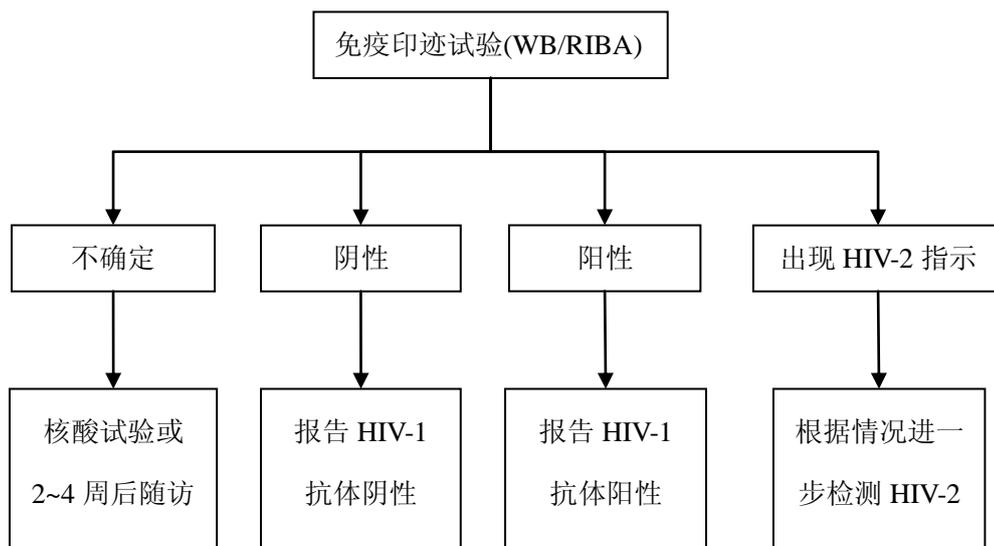


图 5 免疫印迹试验流程

如果使用以检测 HIV-1 抗体为主并含 HIV-2 指示带的抗体确证试剂，当出现 HIV-2 指示带，根据情况进一步检测 HIV-2。HIV-2 检测有两种方法，使用能够区分 HIV-1 和 HIV-2 的抗体确证试剂，根据试剂盒说明书直接判定结果。使用以检测 HIV-1 抗体为主的抗体确证试剂，只有 1 条 HIV-2 指示带，当检测结果出现 HIV-2 指示带时，根据具体情况决定是否进一步检测 HIV-2：

(1) HIV-1 抗体阳性，报告 HIV-1 抗体阳性，不推荐再检测 HIV-2；(2) HIV-1 抗体不确定或阴性，需再用单纯的 HIV-2 抗体确证试剂或能区分 HIV-1 与 HIV-2 感染的确证试剂检测。

4.3.1.2 三种酶联免疫试验、三种快速试验或酶联免疫加快速试验流程

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），三种试剂经过使用地区中心实验室评价。

(1) 三种酶联免疫试验（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 比值是指检测样品 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，至少有一种样品 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”，无需再做免疫印迹试验；否则，应进一步作免疫印迹试验，结果按照免疫印迹试验报告的要求进行，见图 6。

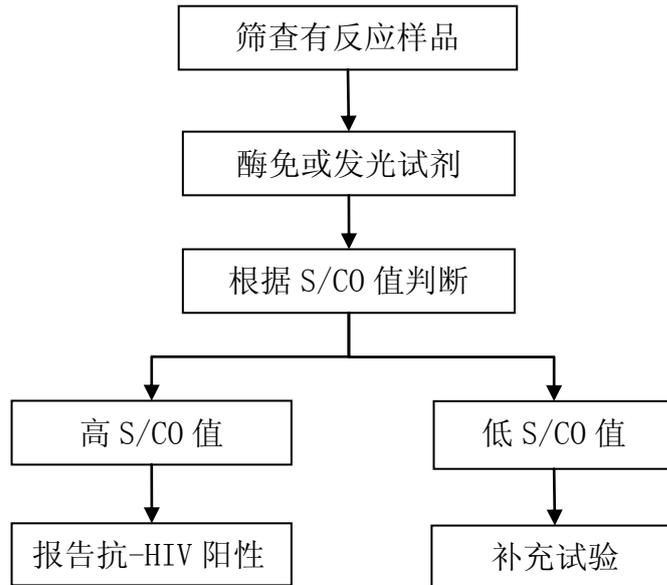


图 6 三种酶联免疫试剂试验流程

(2) 三种快速试剂检测策略

是指应用 3 种快速试剂的检测策略。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；三种快速试剂至少应检测两种不同的生物样本，如血液或口腔黏膜渗出液或尿液，且至少有一种血液快速试剂。另一种策略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的试剂。

快速试剂 1 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，需进一步做抗体确证或核酸试验。检测流程见图 7。

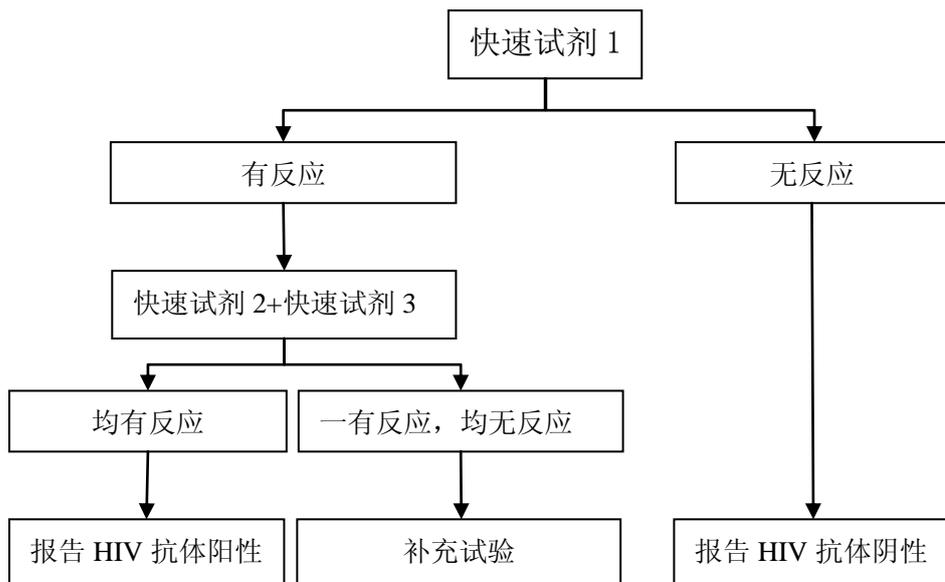


图 7 三种快速试剂试验流程

(3) 快速+酶联试剂的检测策略

是指使用一种快速两种酶联免疫试剂，或两种快速一种酶联免疫试剂的检测策略。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试剂。

试剂 1 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，需进一步做抗体确证或核酸试验。检测流程见图 7。

4.3.2 HIV-1 核酸试验

4.3.2.1 对 HIV 抗体复检试验有反应样品（见图 2），进行 HIV-1 核酸试验，核酸检测结果无反应的样品，建议做抗体确证试验。

4.3.2.2 抗体确证试验不确定或抗体阴性疑似急性期感染的样品，可进行两次 HIV-1 核酸试验。

4.3.2.3 定性检测结果有反应，报告“HIV-1 核酸阳性”；无反应，报告“HIV 核酸阴性”。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。临床医生可结合临床及流行病史、CD4+T 淋巴细胞检测值或 HIV-1 抗体随访检测结果等进行

诊断或排除诊断。检测流程见图 8。

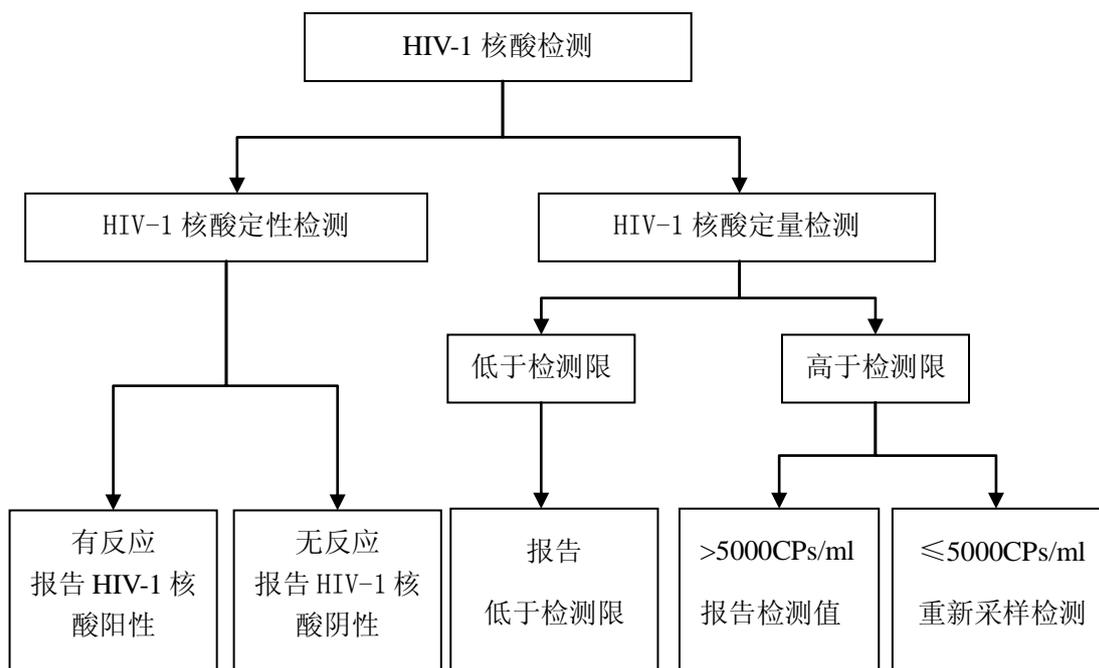


图 8 HIV-1 核酸试验流程

5 血液筛查相关的检测策略及结果报告

血站针对献血者及其捐献的血液进行 HIV 筛查的程序，依据 GB18469—2012《全血及成分血质量要求》、《血站技术操作规程（2012 版）》的相关规定执行。单采血浆站针对供血浆者和血浆产品的 HIV 筛查程序依据《单采血浆站技术操作规程（2011 版）》的相关规定执行。

血站和单采血浆站针对血清学 HIV 检测初次反应性标本的进一步试验程序和结果判定规则可参照图 9、10 执行。

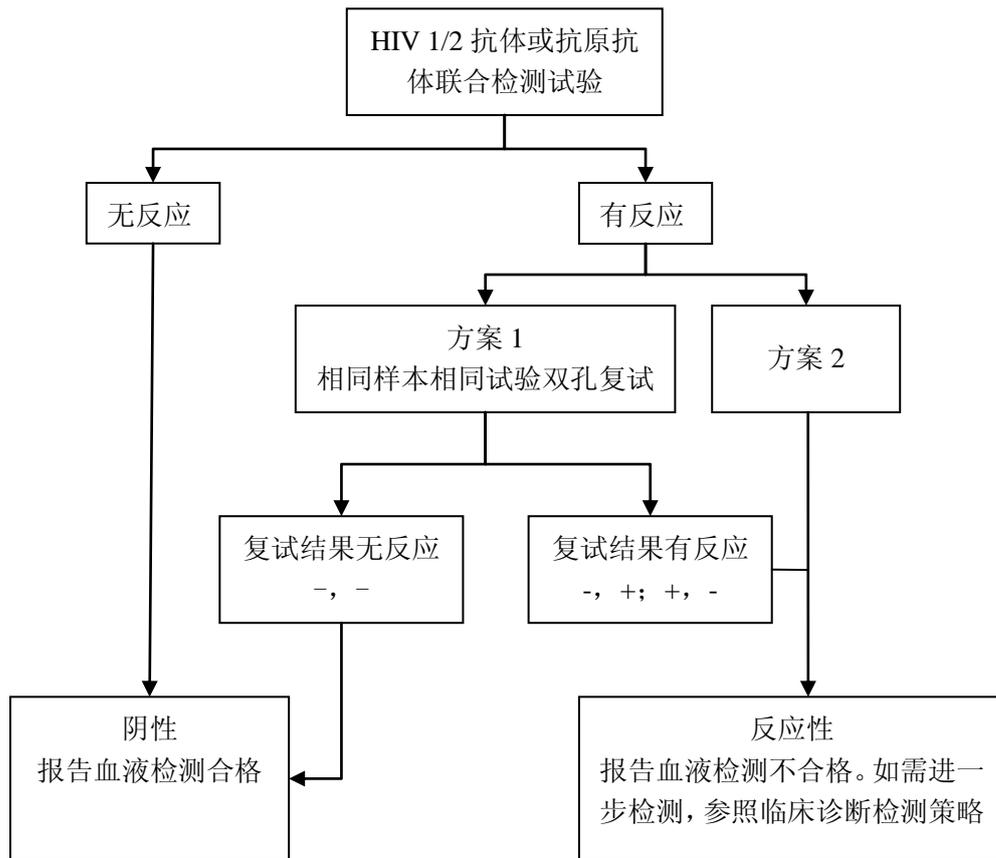


图9 血液抗原抗体筛查试验流程

血站或单采血浆站采用抗-HIV1+2 或 HIV AgAb 联检 ELISA 试剂进行 HIV 检测，检测结果无反应则判断抗-HIV 或 HIV AgAb 血液检测合格。检测结果有反应，可以直接判断抗-HIV 或 HIV AgAb 血液检测不合格，或者采用相同样本和试剂，对初次反应性样本进行双孔重复检测，双孔均无反应则判断抗-HIV 或 HIV AgAb 血液检测合格，否则判断抗-HIV 血液或 HIV AgAb 血液检测不合格。所有不合格样本的进一步检测参照临床诊断检测策略。

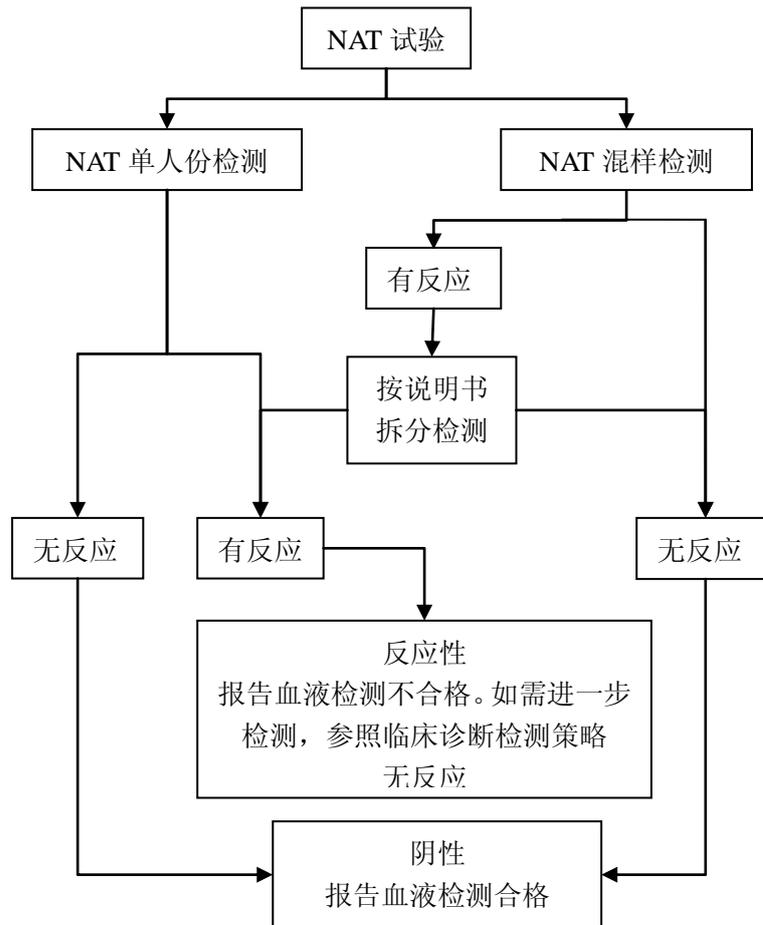


图 10 血液 HIV 核酸试验流程

血站或单采血浆站可采用单检或混样方式进行 HIV-1 NAT 检测。检测结果无反应则判断 HIV NAT 血液检测合格。单检 HIV NAT 试验检测结果有反应，可以直接判断 HIV NAT 血液检测不合格。混样 HIV NAT 试验检测结果有反应，还需要根据试剂说明书的要求，进行拆分检测。拆分检测结果无反应，判断相应血液样本 HIV NAT 血液检测合格；拆分检测结果有反应，判断相应血液样本 HIV NAT 血液检测不合格。所有不合格样本的进一步检测参照临床诊断检测策略。

6 婴儿 HIV-1 感染早期诊断相关的检测策略及结果报告

6.1 核酸检测策略（RNA/DNA）及结果报告

婴儿出生后 6 周（42 天）采集第一份血样本（血样本可制备成 DBS 或 EDTA 抗凝

全血), 送检。若第一份血样本检测呈阳性反应, 尽快再次采集第二份血样本进行检测。若两份血样本检测均呈阳性反应, 报告“婴儿 HIV 感染早期诊断检测结果阳性”, 诊断儿童 HIV 感染, 流程见图 11 艾滋病感染产妇所生儿童 HIV 感染早期诊断试验流程。及时对 HIV 感染儿童进行追踪和病情监测, 将其转介到儿童抗病毒治疗医疗机构, 并为其提供机会性感染预防等服务措施; 若第二份血样本检测呈阴性反应, 待婴儿满 3 个月再次采集血样本进行检测。若第一份血样本检测呈阴性反应, 继续提供儿童保健和随访服务, 待婴儿满 3 个月再次采集血样本进行检测。

若婴儿满 3 个月再次检测呈阴性反应, 报告“婴儿 HIV 感染早期诊断检测结果阴性”, 按照未感染儿童处理, 继续提供儿童保健随访服务; 于儿童满 12 个月时, 按照“HIV 感染产妇所生儿童 HIV 抗体检测流程”(图 12), 开始 HIV 抗体检测, 最终确定儿童感染状态。若婴儿满 3 个月再次检测呈阳性反应, 尽快再次采集血样本进行检测。第三份血样本检测呈阳性反应, 报告“婴儿 HIV 感染早期诊断检测结果阳性”; 若第三份血样本检测呈阴性反应, 报告“婴儿 HIV 感染早期诊断检测结果阴性”; 分别按照前述流程提供相应服务。

不同时间“婴儿 HIV 感染早期诊断”检测均呈阴性反应的喂哺母乳的儿童, 应在完全停止喂哺母乳后的 6 周和 3 个月(若 6 周时检测结果为阳性可尽快)再次采血进行核酸 HIV-1 定性检测, 进行早期诊断。儿童满 18 个月后可直接进行抗体检测。

如果婴儿第一次采血时已满 3 个月, 但未满 12 个月, 则应尽快在不同时间采集两份血样本; 同时将两份血样本送检, 按照前述流程进行检测。如果儿童第一次采血时已满 12 个月, 则应首先按照“艾滋病感染产妇所生儿童 HIV 抗体检测流程”(图 12)进行 HIV 抗体检测。若两种不同原理或厂家生产的 HIV 抗体检测试剂检测结果均为阴性, 则排除儿童感染; 若 HIV 抗体检测试剂检测结果呈阳性反应, 不能通过抗体检测确定儿童感染状态, 则可在不同时间采集两份血样本, 按照前述流程进行“婴儿 HIV 感染早期诊断”检测。如果儿童第一次采血时已满 18 个月, 则应按照 HIV 抗体检测流程(图 2)进行 HIV 抗体检测, 无需进行“婴儿 HIV 感染早期诊断”检测。

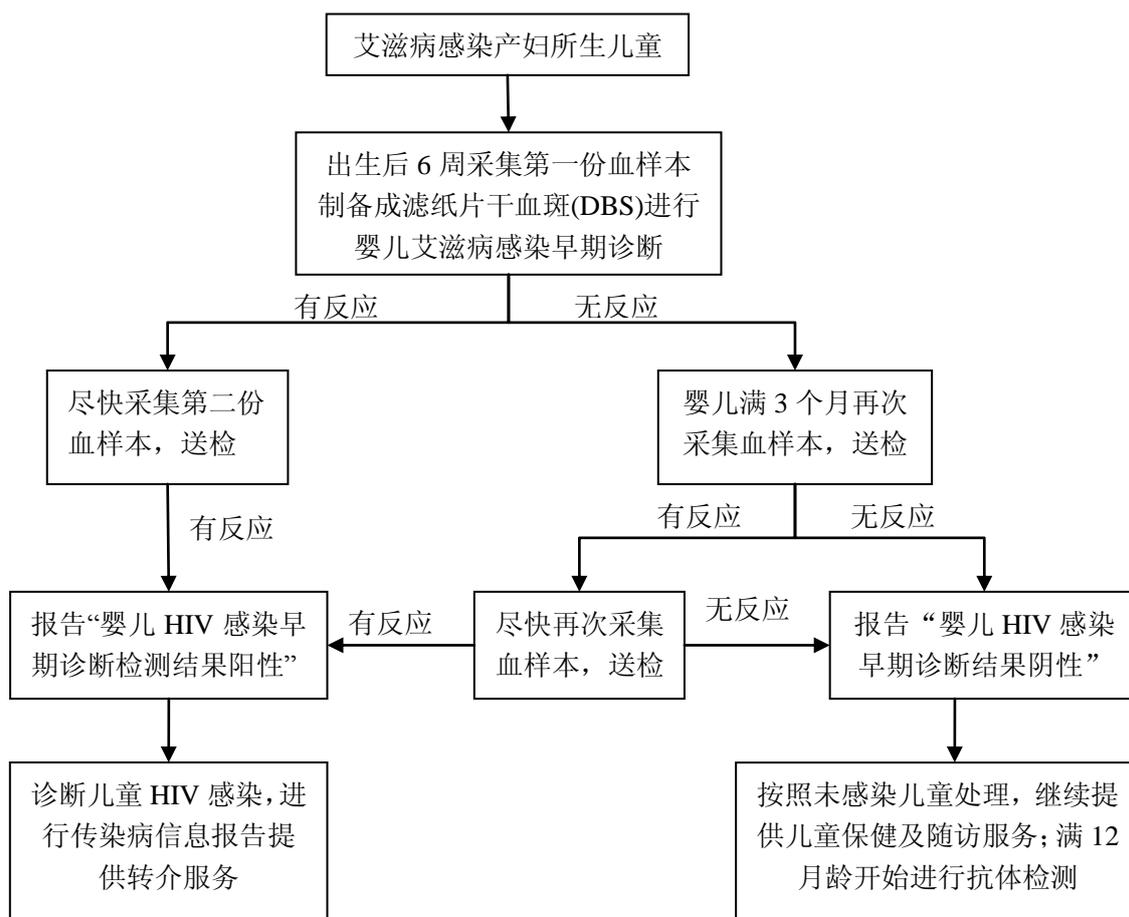


图 11 艾滋病感染产妇所生儿童 HIV 感染早期诊断试验流程

6.2 抗体检测策略及结果报告

对于 12 月龄内没有进行 HIV-1 核酸早期诊断和早期诊断为阴性的婴儿，待婴儿满 12 个月进行第一次 HIV 抗体检测（图 12）。使用一种筛查试剂进行抗体检测，如无反应用另一种试剂进行复检，两种筛查试剂检测结果均为阴性反应，报告“HIV 抗体阴性”，可排除感染。检测结果出现阳性反应（一种为阴性反应一种为阳性反应或两种均呈阳性反应），不能排除感染，应继续追踪随访，至儿童满 18 个月按照 HIV 抗体检测流程（图 2）进行 HIV 抗体检测。

在发放检测报告的同时上报疫情做好检测后咨询

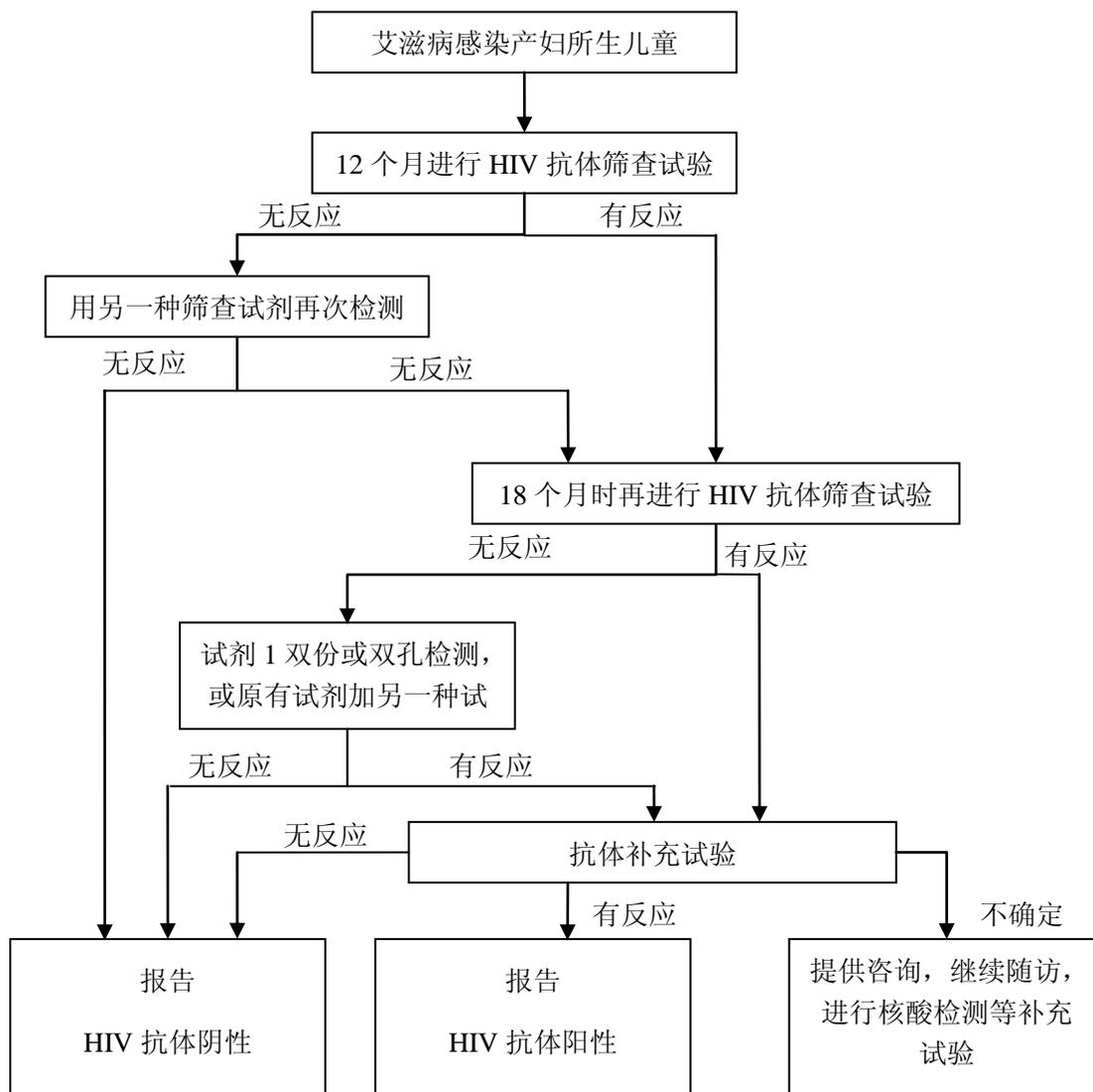


图 12 艾滋病感染产妇所生儿童 HIV 抗体检测流程

第七章 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 规范性文件引用

《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）。

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 号）。

Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Top HIV Med, 2014.

《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）。

Global Strategy for the Surveillance and Monitoring of HIV Drug Resistance, WHO, 2012.

《HIV 耐药监测策略和检测技术》人民卫生出版社，2010 年。

《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册（第三版）》（人民卫生出版社，2012 年）。

Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. DHHS, USA, 2015.

3 HIV-1 基因型耐药检测的意义

3.1 群体耐药监测

3.1.1 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的治疗前人群、曾服用抗病毒药物的治疗前人群如暴露前/后预防人群和母婴阻断的母亲的耐药情况，可作为制定一线抗病毒治疗方案的参考依据。

3.1.2 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，可作为制定二线治疗方案和耐药发生的措施的参考依据，指导和完善公共卫生模式抗病毒治疗的程序。

3.1.3 婴幼儿耐药监测

在 18 个月龄下的新诊断婴幼儿中行基因型耐药检测，分析母婴阻断后 HIV 感染婴幼儿的耐药情况，可作为制定母婴阻断和婴幼儿抗病毒治疗方案的参考依据。

3.1.4 传播性耐药监测

在新近感染人群中的耐药性监测，了解耐药毒株流行的情况，可为制定耐药传播的措施提供参考依据。

3.2 个体耐药检测

3.2.1 抗病毒治疗前

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。

3.2.2 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。

3.2.3 在抗病毒治疗中断 1 个月以上、病毒载量小于 500-1000 拷贝/毫升时不推荐进行常规基因型耐药检测。

4 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合适的实验室中进行，严格满足分子生物学和 PCR 扩增实验室的要求。

4.1 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、样品处理区、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。

4.2 实验室人员和要求

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

4.3 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。

5 HIV-1 基因型耐药检测方法及程序

5.1 样品

HIV-1 基因型耐药检测可使用血浆、血清、滤纸片干血斑等样品，其中血浆样品采用抗凝剂 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。

5.2 检测原理

常规 HIV-1 基因型耐药检测采用 RT-PCR 扩增和 Sanger 测序法获得相关基因片段的序列，通过与野生型和耐药毒株的序列比较，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。

5.3 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。

5.3.1 ViroSeq™ 是美国 FDA 批准的 HIV-1 基因耐药检测方法，使用血浆样品、病毒载量范围为 2000~750000 CPs/毫升；利用一轮 RT-PCR 扩增 1.8kb 的 *pol* 区片段，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）的基因区域；采用正反向的 7 条引物进行测序，通过系统自带的软件行序列编辑和拼接，以 HXB-2 作为参考序列得到待检样品的耐药相关突变位点和耐药程度的报告。

5.3.2 实验室自建（In-house）方法一般使用套式 PCR 方法行两轮扩增。应根据所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。

5.4 耐药分析

5.4.1 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。

5.4.2 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。

5.4.2.1 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。

5.4.2.2 In-house 方法通常使用 HIVDB 系统

(<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>), 判断耐药相关突变和组合的耐药程度。

5.4.2.3 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>)。

5.5 结果报告和解释

5.5.1 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) 和逆转录酶 (RT) 两个基因区的基因突变分开报告 (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。

5.5.2 耐药程度分析

ViroSeq™试剂盒将耐药程度分为敏感 (S)、可能耐药 (I) 和显示耐药 (R) 三个水平, 其中后 2 个水平为耐药。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, 其中后 3 个水平为耐药。

5.5.3 当耐药毒株在个体内病毒群体中的比例低于 10~20%时, 通常检测不到其存在, 因此未检出耐药时, 只可报告本次实验结果为“未发现耐药”, 不可报告为“敏感”。

6 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。包括从样品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)。

6.1 室内质控

6.1.1 检测过程质量控制

6.1.1.1 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。

6.1.1.2 In-house 方法除待测样品外,还应设立阳性、阴性和空白对照。阳性对照为与待测样品同质、含有目的基因片段的样品;阴性对照为与待测样品同质、不含有目的基因片段的样品;空白对照为不含模板的扩增试剂。

6.1.1.3 从样品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品中。从 RT 反应开始加入空白对照。

6.1.1.4 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。

6.1.1.5 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。

6.1.2 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。

6.1.3 定期进行实验室内部质量评价:随机选择经耐药基因型检测过的样品,送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,进行质量控制。

6.2 外部质控

开展 HIV-1 耐药检测的实验室每年至少接受二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》。

第八章 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 规范性文件引用

《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，有效版本）。

《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册（第三版）》（人民卫生出版社，2012 年）。

《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）。

《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 424 号，2004 年 11 月 12 日）。

《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）。

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.

3 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测的意义

3.1 HIV 感染临床分期

CD4+T 淋巴细胞数量可评价 HIV 感染者免疫状况，辅助临床进行疾病分期。我国《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，WS293-2008）将 CD4+T 淋巴细胞值作为成人及 15 岁（含 15 岁）以上青少年 HIV/AIDS 临床分期标准的主要依据之一。

3.2 HIV 感染儿童免疫抑制分级和治疗辅助指标

CD4+T 淋巴细胞百分数可以作为儿童免疫抑制分级指标， 可以作为儿童临床治

疗分期和辅助条件。

3.3 疾病进展监测

《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册（第三版）》推荐对无症状 HIV 感染者及 CD4+T 淋巴细胞计数高的感染者每年进行一次 CD4+ T 淋巴细胞计数检测以评估疾病进展，判断预后状况；对接受抗病毒治疗患者，每六个月进行一次 CD4+T 淋巴细胞计数检测，评估治疗效果。

3.4 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的预防性治疗。

3.5 抗病毒治疗适应症选择及疗效评价

《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册（第三版）》将 CD4+T 淋巴细胞数量作为是否开始抗病毒治疗的重要实验室指标之一，并规定治疗后定期检测 CD4+T 淋巴细胞数量，判断免疫系统恢复情况。

3.6 CD8+T 淋巴细胞为抑制性/细胞毒性 T 细胞，HIV 感染者 CD8+T 细胞数量增加，导致 CD4/CD8 比值下降。

4 CD4+ 和 CD8+T 淋巴细胞检测实验室要求

4.1 人员

4.1.1 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。

4.1.2 进行 HIV/AIDS 患者 CD4+T 淋巴细胞检测的人员须具有上岗资格，正式检测患者样品前，应检测一定数量的样品或者质控品，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。

4.1.3 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。

4.1.4 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。

4.2 功能分区

实验室原则上应分为样品准备区和样品检测区，各区的功能为：

样品准备区应达到生物安全Ⅱ级（BSL-2）实验室要求，用于样品制备。

样品检测区用于制备好的样品在流式细胞仪上检测。

4.3 设施和设备

4.3.1 样品准备区：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（ $5\mu\text{l}$ ~ $50\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ ~ $200\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ ~ $1000\mu\text{l}$ ）。

4.3.2 样品检测分析区：流式细胞仪或 CD4 检测分析仪及配套设备、打印机。

5 常规 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞检测的方法和程序

5.1 样品采集、运输和接收

5.1.1 样品采集

5.1.1.1 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品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 小时的样品。

5.1.1.2 采血管上注明样品编号、采集日期等信息。

5.1.1.3 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。

5.1.2 样品运输

5.1.2.1 运输感染者样品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。

5.1.2.2 在室温（ $18\sim 25^\circ\text{C}$ ）保存和运输样品，避免极端温度（结冰或大于 37°C ）。高温季节，需用隔热容器盛装样品，并将其置于有冰袋和吸热物质的容器中。

5.1.3 样品接收及保存

5.1.3.1 专人接收样品，检查样品质量、数量并核对标识。

5.1.3.2 溶血、凝血或结冰的样品应视为不合格样品，超过检测允许时间的样品不可检测。

5.1.3.3 如果样品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，可以处理样品，但要在工作表的报告上注明温度条件。不能立即加热或冷冻样品以使其达到室温，否则会影响免疫表型检测结果。

5.1.3.4 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。

5.2 方法

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

5.2.1 流式细胞仪检测方法

5.2.1.1 双平台方法是一种细胞群体的绝对计数方法，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，计算得到每微升的淋巴细胞数量，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，不同实验室差异很大。这种方法最大的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。

5.2.1.2 单平台方法是相对双平台法而言的，即应用三色、四色流式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、参考微球数量和样品体积，得到每微升的淋巴细胞数量，也可用体积法获得 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得到了良好的保证。

5.2.2 非流式细胞仪测定法

5.2.2.1 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。在红细胞中,以绵羊红细胞最为常用。

5.2.2.2 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;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。

5.2.2.3 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品中的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对值。

5.3 试剂

5.3.1 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。

5.3.2 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(和单核细胞;CD8 表达于细胞毒 T 细胞。

5.4 实验资料的记录

5.4.1 及时、准确地记录实验结果。

5.4.2 实验记录中应包括以下内容:日期、操作者、所有样品信息、实验内容、过程(步骤)、结果及有无事故等。

5.4.3 所有实验资料应统一由专人负责,按固定格式记录在案。

5.4.4 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。

5.5 结果报告

5.5.1 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。

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

5.5.3 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，单平台检测结果报告格式参见附表 5。

5.5.4 报告单经检测者和复核者签字，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。

5.5.5 报告发放时，可经挂号邮寄或直接交给送检人。

6 质量控制

6.1 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）。

6.2 室内质控要求工作人员做好仪器质控和过程质控。

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

6.2.2 过程质控主要包括试剂质控、样品质控和数据质控。

6.2.2.1 试剂质控要求所用试剂应在有效期内等。

6.2.2.2 样品质控包括正确的样品采集、运输、接收、贮存、处理、分析方法以及室内质控的应用。稳定的全血样品可用于室内质控。通过每日绘制质控图检查实验质量，帮助分析和判断样品处理、仪器的准备和分析是否均处于最佳状态。

6.2.2.3 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。

6.3 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 CD4+T 淋巴细胞检测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 1-2 次，每次 2 支质控品。有条件的实验室可参加国际认可机构的质控。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。

第九章 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 规范性文件引用

NIAID , Virology Manual for HIV Laboratory, NIH Publication, No. 97-3828. Jan 1997

3 HIV-1 分离的意义

- 3.1 HIV 抗体不确定或 HIV-1 阳性母亲所生婴儿的鉴别诊断及诊断
- 3.2 HIV 表型耐药检测及其他 HIV 生物学特征的研究。
- 3.3 HIV 感染的辅助诊断。

4 实验室要求

- 4.1 实验室：经过认可的生物安全 3 级实验室。
- 4.2 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）、压力蒸汽灭菌器、液氮罐、-80℃冰箱、酶标仪等。
- 4.3 材料：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。细胞培养瓶、细胞培养板、吸管等。

5 HIV-1 分离的方法及程序

一般采用靶细胞（HIV 阴性者外周血淋巴细胞，PBMC）与受检者标本（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。

- 5.1 样本：首选新鲜抗凝全血，也可以使用血浆、精液及其他体液。
- 5.2 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。

5.3 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。

5.4 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。

5.5 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。

5.6 判定结果和解释

5.6.1 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。

5.6.2 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。

5.6.3 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。

6 质量控制

6.1 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。

6.2 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。

6.3 受检者样本必须无菌, 培养过程中注意无菌操作。

6.4 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。

6.5 可同时接种一株已经分离成功的 HIV-1 原代毒株, 以证明实验方法的可靠性。

附表 1

HIV 抗体筛查检测报告

编号：

送检单位				送检日期	年 月 日		
送检样品	全血 <input type="checkbox"/> 血浆 <input type="checkbox"/> 血清 <input type="checkbox"/> 口腔黏膜渗出液 <input type="checkbox"/> 尿 <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> PA <input type="checkbox"/> 化学发光 <input type="checkbox"/> RT <input type="checkbox"/> 其它实验：_____		ELISA <input type="checkbox"/> PA <input type="checkbox"/> 化学发光 <input type="checkbox"/> RT <input type="checkbox"/> 其它实验：_____		ELISA <input type="checkbox"/> PA <input type="checkbox"/> 化学发光 <input type="checkbox"/> RT <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 无反应 <input type="checkbox"/>		有反应 <input type="checkbox"/> 无反应 <input type="checkbox"/>		有反应 <input type="checkbox"/> 无反应 <input type="checkbox"/>		
筛查结论	HIV 感染待确定 <input type="checkbox"/> HIV 抗体 阴性 <input type="checkbox"/>						
检测者				审核者			
检测单位（公章）： 电话： 邮编：				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	
送检样品		全血 <input type="checkbox"/> 血浆 <input type="checkbox"/> 血清 <input type="checkbox"/> 口腔黏膜渗出液 <input type="checkbox"/> 尿 <input type="checkbox"/> 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			
WB							
RIBA/LIA							
其他							
结论		阳性 <input type="checkbox"/>		阴性 <input type="checkbox"/>		不确定 <input type="checkbox"/>	
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	
样品类型				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		
送检标本				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 <input type="checkbox"/>		阴性 <input type="checkbox"/>			
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+T 淋巴细胞检测报告

编号：

基本信息					
送检单位				送检日期	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					
CD45+CD3 百分数	CD3+ 绝对数(个 /u1)	CD3+CD8+CD45+ (百分数)	CD3+CD8+ (绝对数)	CD3+CD4+CD45+ (百分数)	CD3+CD4+ (绝对数)
参考范围					
CD45+CD3 百分数	CD3+ 绝对数(个 /u1)	CD3+CD8+CD45+ (百分数)	CD3+CD8+ (绝对数)	CD3+CD4+CD45+ (百分数)	CD3+CD4+ (绝对数)
检测者				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						
标本类型				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)							
				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)							
				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	
标本寄出日期		标本收到日期	
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	Abbott RealTime HIV-1 Test () AMPLICOR HIV-1 DNA Test () 其他		
试剂厂家			
批号			
试剂有效日期			
检测结果			
检测者		签发者	
实验室负责人（签字或盖章）：		备注：	