

《全国艾滋病检测技术规范》

(2025 年修订版)



中国疾病预防控制中心
二〇二五年九月

前言

检测是艾滋病防治工作的重要基石。在个体诊疗层面，HIV 感染者在进入艾滋病期前通常没有特异性的症状和体征，需通过筛查检测发现可能的感染并通过补充试验确诊后，才能启动抗病毒治疗；在治疗过程中，需通过定期检测病毒载量评估疗效并及时监测耐药，同时结合 CD4⁺T 淋巴细胞检测评估免疫重建状态，才能有效实现抗病毒治疗目标。在群体防控层面，HIV 新近感染检测为新发疫情研判提供关键指标，病毒基因测序为分子传播网络构建和分子流行病学研究提供支撑，病毒分离培养为疫苗和药物研发奠定基础。此外，艾滋病检测体系的建设也为疫情监测、血液安全、院感防控和口岸检疫等工作提供了不可替代的技术保障，具有多重公共卫生价值。

扩大检测、促进感染者检测发现是我国长期实施的艾滋病防治策略，《中国遏制与防治艾滋病规划(2024—2030 年)》明确提出到 2030 年经诊断发现并知晓自身感染状况的感染者比例达 95%以上。近年来，国内外艾滋病检测技术快速发展，诊断试剂性能显著提高，新的检测策略不断发展和优化。同时，艾滋病防治工作的发展也对检测工作提出了新的要求，包括急性期感染的早期诊断、暴露前后预防药物干扰下的准确诊断，以及输入性抗体与慢病毒转基因治疗等特殊情况的鉴别诊断等。随着人工智能与信息化技术的深度融合，艾滋病检测技术正在向智能化、便捷化方向发展，有望简化和加速感染者的诊断与治疗效果评估，提升艾滋病综合防治效能。

《全国艾滋病检测技术规范》自 1997 年颁布首版后，已历经四次系统性修订（2004、2009、2015、2020 年），每次修订都立足于国内外技术进步和我国防治工作的现实需求，适时引入新方法并提出新的应用策略，引领和推动我国 HIV 检测技术的标准化、检测流程的规范化、以及检测实验室能力的显著提升。中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心本次组织专家修订的《全国艾滋病检测技术规范（2025 年修订版）》（以下简称《规范》，立足于我国的艾滋病检测体系和检测能力，参考世界卫生组织和国内外的最新技术指南，本着既满足艾滋病检测工作实际需求，又体现检测技术发展的原则，主要对以下几个方面的内容进行了修订、增补和完善：（1）明确要求抗体确证检测结果为不确定时应进行核酸检测，以尽快确认 HIV 感染状态；（2）新增了 HIV-1 DNA 定量检测方法；（3）新增了 HIV-1 基因测序和分型检测技术和方法；（4）新增了慢病毒转基因治疗者的 HIV 检测流程；（5）新增了低病毒载量样本进行基因型耐药检测的处理流程；（6）取消了实验室质量控制

内容，独立编制为《全国艾滋病检测实验室质量控制指南》。

所有附表中的检测报告模板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相关各项政策法规的有效实施提供有力的技术支持，并为艾滋病检测实验室技术人员开展日常检测工作提供切实的技术指导。

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》编写和审核单位：国家卫生健康委临床检验中心、中国食品药品检定研究院、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院、北京协和医院、中国医科大学附属第一医院、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、云南省疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心、河南省疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、陕西省疾病预防控制中心、福建省疾病预防控制中心、广西壮族自治区疾病预防控制中心、天津市疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心。

本《规范》审核专家：张瑞、韩孟杰、吕繁、李太生、吴昊、钟平。

本《规范》学术顾问：蒋岩。

本《规范》编写组人员：金聪、路凯、李敬云、韩扬、潘品良、姚均、邢文革、邱茂锋、李林、马艳玲、廖玲洁、王雅杰、许四宏、王露楠、韩晓旭、冯霞、梁姝、任强、张佳峰、徐晓琴、宁铁林、吴守丽、刘春华、袁丹、梁淑家、苏雪丽、吕毅、张辉。

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(2020年修订版)》。

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。

目 录

第一章 样本的采集和处理	1
1. 范围	1
2. 样本采集要求和要点	1
3. 血液来源样本的制备	2
4. 样本留样和分装	3
5. 样本保存和运送的条件	4
6. 样本运输的包装要求	4
7. 样本接收	5
8. 样本销毁	5
参考文献	6
第二章 HIV 抗原抗体检测	7
1. 范围	7
2. HIV 抗原抗体检测的意义	7
3. HIV 抗原抗体检测的样本类型和要求	7
4. HIV 抗原抗体检测的方法和程序	7
5. HIV 抗体自我检测	10
6. HIV 相关病原体的联合检测	11
7. 结果解释和报告	12
参考文献	16
第三章 HIV 核酸检测	18
1. 范围	18
2. HIV 核酸检测的意义	18
3. HIV 核酸检测的样本类型和要求	18

4. HIV 核酸检测的技术原理	18
5. HIV 核酸检测的方法	19
6. 不同模式的 HIV 核酸检测	20
7. 结果解释和报告	21
参考文献	26
第四章 HIV 感染检测流程	28
1. 范围	28
2. 临床个体诊断相关的检测流程及结果报告	28
3. 婴儿早期诊断相关的检测流程及结果报告	38
4. 血液筛查相关的检测流程及结果报告	41
5. 艾滋病自我采样传递检测	43
6. 疫情监测相关的检测流程	44
参考文献	45
第五章 基于抗体的 HIV-1 新近感染检测	48
1. 范围	48
2. HIV-1 新近感染检测的意义	48
3. HIV-1 新近感染检测的样本类型和要求	48
4. HIV-1 新近感染检测的原理和检测方法	48
5. HIV-1 新近感染检测的程序和操作要点	49
6. 结果解读	49
7. 检测结果的应用	50
参考文献	51
第六章 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞检测	54
1. 范围	54
2. CD4 ⁺ 和 CD8 ⁺ T 淋巴细胞检测的意义	54

3. CD4 ⁺ 和 CD8 ⁺ T 淋巴细胞检测的样本类型和要求	54
4. CD4 ⁺ 和 CD8 ⁺ T 淋巴细胞检测的方法和程序	55
5. 结果解释和报告	57
参考文献	58
第七章 HIV-1 基因型耐药检测	60
1. 范围	60
2. HIV-1 基因型耐药检测的意义	60
3. HIV-1 基因型耐药检测的样本类型和要求	60
4. HIV-1 基因型耐药检测的方法和程序	61
5. 结果解释和报告	65
参考文献	66
第八章 HIV-1 分离培养	68
1. 范围	68
2. HIV-1 分离培养的意义	68
3. HIV-1 分离培养的样本类型和实验室要求	68
4. HIV-1 分离培养的方法和程序	68
5. 病毒生物学鉴定	69
参考文献	70
第九章 HIV-1 基因分型	71
1. 范围	71
2. HIV-1 基因分型的意义	71
3. HIV-1 基因分型的样本类型和要求	71
4. HIV-1 基因分型的方法和程序	71
5. 结果解释和报告	74
参考文献	74

附表 1	HIV 筛查检测报告	77
附表 2	HIV 抗体确证检测报告	78
附表 3	HIV 抗体确证检测报告（替代策略）	79
附表 4	HIV-1 核酸检测报告	80
附表 5	CD4 ⁺ CD8 ⁺ T 淋巴细胞检测报告	81
附表 6	HIV-1 耐药基因型检测报告	82
附表 7	婴儿艾滋病病毒感染早期诊断检测报告	84
附件 1	HIV-1 集合核酸检测及流程	85
附件 2	对低病毒载量样本进行 HIV-1 基因型耐药检测的样本处理流程	88
附件 3	HIV-2 核酸检测	90
附件 4	转基因治疗者的 HIV 感染鉴别诊断流程	96
附件 5	输入性 HIV 抗体检测及流程	99

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（Human Immunodeficiency Virus, HIV）检测的样本采集和处理方法。

2. 样本采集要求和要点

根据检测项目的具体要求,明确样本的类型、处理方法、保存条件及运输时限等。操作需符合临床标本采集相关技术规范,并严格遵守生物安全相关要求。采样前应检查采样所需物品,包括采血用具、皮肤消毒用品、采血管及试管架、硬质废弃物容器等,是否已备齐,是否在有效期内,有无破损,是否足量。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。采样前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。

2.1 血液

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。

2.1.1 静脉血:消毒局部皮肤后,使用加有抗凝剂的真空采血管抽取适量静脉血,或使用一次性注射器抽取静脉血后立即转移至加有抗凝剂的采血管中,轻轻颠倒混匀10~15次后备用。根据检测要求选用适当的抗凝剂,如CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞计数测定可选用乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA）钾盐或钠盐、枸橼酸钠、肝素钠。HIV核酸检测和病毒分离可选用EDTA钾盐或钠盐、枸橼酸钠。如果血液样本不用于核酸检测,可选用肝素钠。

2.1.2 末梢血:成人和1岁以上儿童可选择手指,1岁以下儿童选择足跟采集末梢血。采血前轻轻按摩采血部位,促进局部组织血液循环。消毒采血部位的局部皮肤后,用采血针刺破皮肤,用无菌纱布擦掉第一滴血,在采血位点附近轻轻对组织施加压力,增加血流量。滴出的血液直接进行快速检测或制备干血斑。

2.2 干血斑

2.2.1 将采集的血液样本制备成干血斑,通常使用抗凝静脉血、末梢血或血浆。

2.2.2 用移液器从样本管中吸取100 μL抗凝全血（或血浆）,对准干血斑采集卡印

圈的中心处，将样本滴在采集卡上。或将穿刺后自皮肤伤口滴出的末梢血直接滴加在干血斑采集卡印圈的中心处。根据需要，连续在数个印圈上滴加样本。

2.2.3 在室温自然干燥至少 4 小时（潮湿气候下至少干燥 24 小时），不要加热或堆叠血斑，避免与其它界面接触。

2.2.4 血斑充分干燥后，将采集卡放入密封袋中，每张采集卡单独保存，应注意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。

2.3 尿液

2.3.1 在尿液样本采集前进行采样部位清洁，应注意防止阴道分泌物、月经血、粪便等污染尿液样本。

2.3.2 选取清洁、干燥、无渗漏且无化学物质污染的采尿管或者尿杯采集尿液样本，容量大小根据所需采集的尿液量而定。

2.4 口腔黏膜渗出液

2.4.1 用口腔拭子的软垫端，沿上牙龈线，缓慢来回擦拭，然后翻转拭子，沿下牙龈线同样擦拭，确保采集到足够的牙龈液后，将拭子在稀释液中充分洗脱。

2.4.2 应注意采集口腔黏膜受到挤压或外伤所渗出来的液体，而非唾液。

3. 血液来源样本的制备

3.1 血浆：采集抗凝静脉血后，参照所使用采血管说明书规定的相对离心力和离心时间进行离心。离心后上层液体即为血浆，将其吸出置于合适的容器中备用。

3.2 血清：采集静脉血制备血清可采用以下方法：1）直接使用含促凝剂/分离胶的血清采血管，按说明书要求离心分离血清；2）使用不含抗凝剂的真空采血管采集适量静脉血；或 3）使用一次性注射器采血后注入无抗凝剂或含促凝剂的采血管中。对于方法 2 和 3，需将样本直立静置 1~2 小时，待血液凝固、血块收缩后，参照所用采血管说明书规定的相对离心力和离心时间进行离心，分离出血清，置于合适的容器中备用。

3.3 淋巴细胞富集液：将采集的抗凝全血在 1000-2000 g 离心 15 分钟，吸取血浆层下的淋巴细胞富集液（又称为白膜层，buffy coat 层），置于合适的容器中备用。

3.4 外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC）：在无菌的离心管中加入淋巴细胞分离液，将采集的抗凝全血用生理盐水等体积稀释后，缓慢匀速加至淋巴细胞分离液面之上，使血液稀释液和淋巴细胞分离液形成明显分层（上层为血

液稀释液，下层为淋巴细胞分离液）。在缓慢升降速条件下低速离心（ $\leq 500\text{ g}$ ）20 分钟，通过密度梯度离心使血液分层，小心吸出中间白色的 PBMC 层，转移至新的离心管。在吸出的 PBMC 中加入生理盐水，离心后弃去上清液，重复 2~3 次。洗去残留的淋巴细胞分离液后，将 PBMC 置于合适的容器中备用。

4. 样本留样和分装

4.1 样本管材质的选择

4.1.1 耐腐蚀性：样本管材质应具有良好的耐腐蚀性，以确保在长期存储过程中不会与样本发生化学反应而影响样本质量。

4.1.2 密封性：可采用带有密封塞或螺旋盖的样本管，并确保盖子与管体之间的密封性良好。

4.1.3 稳定性：样本管应在不同的温度和湿度条件下保持结构完整，不会发生变形或破裂，以保证样本的安全存储。

4.2 样本标识

4.2.1 样本标识是保证样本可追溯性和准确性的关键，避免样本混淆和错误结果的产生。应制定样本编码的标准操作程序，规定样本编码的原则和方法，保证每一份样本具有唯一编码或编号。

4.2.2 标识方法主要包括三种。（1）基本信息标识：包括患者信息（如姓名、性别、年龄、病历号）和样本信息（如采集时间、采集部位）等。（2）唯一编码：为每个样本分配一个唯一的编码，可采用数字、字母或两者结合的方式，编码应在整个样本管理过程中保持不变。（3）条形码或二维码：可以在样本管上粘贴条形码或二维码标签，通过扫描设备快速读取样本信息。

4.3 分装的注意事项

4.3.1 选择合适的容器：分装容器应与原始样本管材质相同或具有相似的性能，以确保样本的稳定性和安全性。

4.3.2 标记分装信息：在分装容器上应明确标记与原始样本相同的标识信息，同时注明分装的数量、日期等。

4.3.3 严格遵守操作规程：操作人员应严格遵守样本分装的操作规程，佩戴适当的个人防护设备，以防止自身感染和样本污染。

5. 样本保存和运送的条件

样本采集后的保存温度和时限，因不同的检测项目而异，详见各章相应检测项目的要求。

5.1 用于抗体或抗原检测的血液样本，1 周内检测的可于 2~8℃保存或运送；1 周以上检测的应于-20℃以下保存，在冻存条件下运送。

5.2 用于抗体检测的尿液样本，1 周内检测的可在室温保存和运送，1 个月内检测的应在 2~8℃保存。长期保存应置于-20℃以下，在冻存条件下运送。尿液样本中是否需要添加防腐剂等，以产品说明书为准。

5.3 用于抗体检测的口腔黏膜渗出液样本，一般应即刻使用，如需要长期保存以产品说明书为准。

5.4 用于病毒核酸检测的血液样本，应在采集后 2~4 小时内室温运送到实验室。长期保存应置于-70℃以下。如运送时间超过 24 小时，应在冻存条件下转运。

5.5 用于 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞检测的血液样本，在室温保存和运送，应在 24 小时内尽快进行检测。如在室温保存，时间不超过 48 小时；如果用 CD45 设门检测，样本保存不超过 72 小时。

5.6 PBMC 样本应在分离当天尽快使用，1 个月内使用可保存于-70℃以下，长期保存则需加入细胞冻存液并储存于液氮环境中。

5.7 干血斑样本可在室温运送，如长期保存应置于-70℃以下。

6. 样本运输的包装要求

6.1 HIV 属于高致病性病原微生物，相关感染性材料的包装，按照《人间传染的病原微生物目录》的分类。病毒培养物应按照 A 类包装（UN2814）；其余材料，包括未经培养的感染性材料、灭活材料、无感染性材料，按照 B 类包装（UN3373）。

6.2 感染性材料的包装必须由三部分组成，包括主容器、次容器和刚性外包装。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、样本类型等信息，并应放置次容器和外包装之间。航空运输的包装必须符合国际民航组织《危险品航空运输技术细则》的要求。

6.2.1 主容器：对于液体物质，主容器必须防渗漏，对于固体物质，主容器必须防筛漏；如果在单个次容器内放置多个易碎主容器，必须单独包装或将之分开，以防彼此

接触。样本应置于带盖的容器内，做好标记。必须将吸附材料放在主容器和次容器之间，必须有足够的吸附材料以吸收主容器的全部内含物。

6.2.2 次容器：可以装若干个主容器。对于液体物质，次容器必须防渗漏，对于固体物质，次容器必须防筛漏；要求不易破碎、带盖、防渗漏或筛漏、容器的材料要易于消毒处理。

6.2.3 刚性外包装：对于液体物质，外包装的容量不得超过 4 升，对于固体物质，外包装的容量不得超过 4 千克。外包装要贴上醒目的标记和标签，注明发件人、收样人和负责人的姓名及联系方式，样本数量等信息；贴有向上标签，如果是感染性物质，应贴有感染性物质标签。

7. 样本接收

7.1 样本包装应在具有处理感染性样本条件的实验室内，由经过培训的工作人员佩戴适当的个人防护设备，在生物安全柜中打开。

7.2 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，消毒样本管和容器，同时报告实验室负责人。

7.3 检查样本状况，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。

8. 样本销毁

8.1 艾滋病检测实验室的所有废弃物，包括不再需要的样本、培养物和其它物品，均应视为感染性废弃物，应置于专用的密封防漏容器中，安全运至消毒室，并在高压蒸汽灭菌后再进行处理。

8.2 HIV 感染性样本常用的消毒方法

8.2.1 物理消毒方法：压力蒸汽灭菌，121℃灭活 30 分钟或 134℃灭活 5 分钟。干燥空气烘箱消毒（干烤消毒），140℃灭活 2~3 小时。

8.2.2 化学消毒方法：最常用含氯消毒剂（次氯酸钠，含有效氯 2000-5000 mg/L）、75%乙醇和 2%戊二醛，灭活 10~30 分钟。

参考文献

- [1] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测实验室质量控制指南[Z]. 2024.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 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[S]. 北京, 2006..
- [3] 国家卫健委临床检验中心新生儿疾病筛查室间质量评价委员会. 新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(10): 836-840.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 静脉血液标本采集指南: WS/T 661-2020[S]. 北京, 2020.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 尿液标本的采集与处理: WS/T348-2024[S]. 北京, 2024.
- [6] 中国医师协会检验医师分会儿科疾病检验医学专家委员会, 世界华人检验与病理医师协会. 中国末梢采血操作共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(22): 1752-1760.
- [7] 北京预防医学会. 滤纸片干血斑居家自采样与制备指南: T/BPMA 26-2024[S]. 北京, 2024.
- [8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床微生物学检验标本的采集和转运: WS/T 640-2018[S]. 北京, 2018.
- [9] 中国医药生物技术协会. 人外周血单个核细胞的采集、分离和保存: T/CMBA 011-2020[S]. 北京, 2020.
- [10] 中国中西医结合学会检验医学专业委员会. 临床检验样本转运及保存规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(03): 259-264.

第二章 HIV 抗原抗体检测

1. 范围

本章规定了 HIV 抗原抗体检测的目的及意义、检测样本的类型和要求、检测方法和程序、结果解释和报告。

2. HIV 抗原抗体检测的意义

2.1 HIV 抗体检测

2.1.1 HIV 抗体检测可用于个体诊断、血液筛查、流行病学监测等。

2.1.2 以诊断为目的的抗体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。

2.1.3 以血液筛查为目的的抗体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。

2.1.4 以流行病学监测为目的的抗体检测是为了解不同人群的 HIV 感染率及其变化趋势，包括各类重点人群和一般人群。

2.2 HIV 抗原抗体检测

用于 HIV 感染抗体窗口期的筛查检测。

2.3 HIV 抗原检测

HIV 分离培养和病毒复制状况的监测。

3. HIV 抗原抗体检测的样本类型和要求

用于 HIV 抗原抗体检测的样本主要为全血、血清和血浆样本。此外，口腔黏膜渗出液和尿液也可应用于抗体检测。应根据试剂盒说明书要求选择合适的样本类型。当同一份样本需要进行后续核酸检测时，建议尽量选择血浆样本进行抗原抗体检测，并尽可能在血液样本采集后 6 小时内完成离心和分离血浆。

4. HIV 抗原抗体检测的方法和程序

4.1 酶联免疫吸附试验（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）

酶联免疫吸附试验检测 HIV 抗体的原理是在微孔板固相载体上预先包被 HIV-1 和 HIV-2 的抗原（如 gp41、gp120、p24 等重组蛋白或合成肽段），加入待检样本，若样本中存在相应抗体，则会与固相抗原结合形成复合物。再加入酶标记的 HIV 抗原后，结合形成“固相抗原-待测抗体-酶标抗原”免疫复合物，与底物结合发生显色反应，使用酶标仪测定结果。使用酶联免疫吸附试验联合检测 HIV 抗原抗体的原理与单独检测 HIV 抗体的原理基本相同，固相载体除了包被 HIV 抗原外，还需要包被 HIV 抗体，并且除了加入酶标记 HIV 抗原，还需要加入酶标 HIV 抗体，当样本中存在抗原时，形成“固相抗体-待测抗原-酶标抗体”免疫复合物，与底物结合发生显色反应，使用酶标仪测定结果。

4.2 免疫荧光试验（Immunofluorescence Assay, IFA）

免疫荧光试验检测 HIV 抗体的原理同样是在微孔板上包被 HIV 抗原，以 Eu^{3+} 标记另一 HIV 抗原。微孔内包被的 HIV 抗原与样本中的抗体通过免疫反应形成“固相 HIV 抗原-HIV 抗体”复合物；洗涤后，加入标记 Eu^{3+} 的 HIV 抗原，在微孔内表面形成“固相 HIV 抗原-HIV 抗体-HIV 抗原- Eu^{3+} ”的复合物；洗涤除去游离的 Eu^{3+} 标记 HIV 抗原，加入荧光增强液，增强液将固相表面复合物上的 Eu^{3+} 解离至溶液中， Eu^{3+} 与增强液中的组分形成强荧光络合物，使用荧光免疫分析仪测量荧光强度，其荧光强度与血清中的 HIV 抗体浓度成正相关。使用免疫荧光试验联合检测 HIV 抗原抗体的原理与单独检测 HIV 抗体的原理基本相同，微孔板除了包被 HIV 抗原外，还需包被 HIV 抗体， Eu^{3+} 也需要同时标记 HIV 抗原和抗体。当样本中存在 HIV 抗原时，形成“固相 HIV 抗原-HIV 抗体”复合物；洗涤加入 Eu^{3+} 标记的 HIV 抗体后形成“固相 HIV 抗体-HIV 抗原-HIV 抗体- Eu^{3+} ”复合物，通过后续反应测量荧光强度。常见的有时间分辨免疫荧光分析法。

4.3 化学发光免疫试验（Chemiluminescence Assay, CLIA）

化学发光免疫试验通常采用发光物质为底物（或直接标记发光物质），当检测 HIV 抗体时，将 HIV 抗原包被于固相载体，加入待检样本和酶标记的 HIV-1 p24 抗原，当样本中存在 HIV-1/2 抗体时，形成的“固相抗原-待测抗体-酶标抗原”复合物会催化发光底物（或直接激发标记好的发光物质）显色，用发光仪测定结果，发光强度与 HIV-1/2 抗体含量成正比。当联合检测 HIV 抗原抗体时，将 HIV 抗原和抗体均包被于固相载体，当样本中存在 HIV-1 p24 抗原时，形成的“固相抗体-待测抗原-酶标抗

体”复合物会催化发光底物（或直接激发标记好的发光物质）显色，用发光仪测定结果。

4.4 电化学发光免疫分析试验（Electrochemiluminescence Immunoassay, ECLA）

电化学发光免疫分析试验采用电化学发光标记抗原抗体，可区分 HIV-1/2 抗体和 HIV-1 p24 抗原的检测结果。使用化学发光剂直接标记 HIV-1 p24 抗原和 HIV-1/2 抗体，在检测抗原反应体系中加入待检样本、生物素化的抗-p24 单克隆抗体和化学发光剂标记的抗-p24 单克隆抗体反应，形成“生物素化的抗-p24 单克隆抗体-抗原-化学发光剂标记的抗-p24 单克隆抗体”复合物。在检测抗体反应体系中加入待检样本、生物素化的抗 HIV 特异性重组抗原和化学发光剂标记的 HIV 特异性重组抗原，形成“生物素的化抗 HIV 特异性重组抗原-抗体-化学发光剂标记的 HIV 特异性重组抗原”复合物；在不同反应体系中分别加入包被链霉亲和素的磁珠微粒，通过磁场把结合状态和游离状态的化学发光剂标记物分开，在结合状态部分中加入发光促进剂进行发光反应，发光强度与 HIV-1/2 抗体或 HIV-1 p24 抗原量成正比，并据此分别判断样本中是否存在对应的抗原和抗体。

4.5 快速检测试验（Rapid Test, RT）

快速检测试验检测 HIV 抗体通常使用免疫层析试验，以硝酸纤维膜为固相载体，其表面预先包被 HIV 特异性抗原形成检测线（T 线），样本在毛细作用下沿着固相载体层析迁移。若样本中存在 HIV-1/2 抗体，先与标记抗原（如胶体金标记的 HIV 抗原）结合，当经过检测线时，再与预包被的抗原结合，形成“固相抗原-抗体-标记抗原”夹心复合物，最终在检测线位置显现出肉眼可见的有色条带。有效试验的质控带必须显色方可判读，结果一般可在 15~30 分钟内读取，常见的有胶体金法、胶体硒法、干式荧光法及荧光免疫层析法等。HIV 抗体的快速试验可使用血液、尿液、口腔黏膜渗出液等类型样本，与血液样本相比，口腔黏膜渗出液和尿液具有样本易采集、操作步骤简单、不需要专业实验室且不需要专业人员检测等优点，适合在普通人群中进行自我检测。值得注意的是，样本的采集和保存对检测结果影响较大，必须按照试剂盒说明书要求执行。

当联合检测 HIV 抗原抗体时，HIV-1/2 抗原和 HIV-1 p24 单克隆抗体预先包被在硝酸纤维膜上，样本在毛细作用下沿着硝酸纤维膜移动，至相关抗体、抗原包被区域后，样本中的 HIV-1/2 抗体、HIV-1 p24 抗原分别与硝酸纤维膜上的 HIV-1/2 抗原、

HIV-1 p24 单克隆抗体结合形成复合物，并显色，可根据复合物线条出现的位置判断是否含有 HIV-1/2 抗体或 HIV-1 p24 抗原。质控线用于检测过程质量控制，肉眼判读检测结果。HIV 抗原抗体检测只能使用血液样本。目前常用的 HIV 抗原抗体检测试剂盒多是胶体金和胶体硒法。

快速检测试验具有操作简便、检测时间短、无需设备、对试验条件和人员能力要求较低等优点，但也存在受实验环境影响大、个人主观判断影响因素多等缺点，适用于门诊、急诊检测、自愿咨询检测（Voluntary Counseling and Testing, VCT）及检测点常规检测等。随着人工智能技术的普及，智慧化快速检测产品也已开始上市。

4.6 抗体确证试验

对于 HIV 抗体筛查有反应的样本，应进行抗体确证试验，相对于筛查试验，抗体确证试验特异性更高，但敏感性较低。

4.6.1 免疫印迹试验（Western Blot, WB）

免疫印迹试验采用间接法检测样本中的 HIV-1/2 特异性抗体。将待测样本适当稀释，加至包被有分子量不等的 HIV 抗原蛋白（如 gp160、gp120、p31、p24 等）硝酸纤维素膜上，恒温振荡，使其充分接触反应，血样本中若含有 HIV-1/2 抗体，就会与膜条上的抗原蛋白条带相结合。加入抗人-IgG 酶结合物和底物后，根据出现的条带，按照试剂盒说明书的判定标准，报告待测样本为 HIV-1 抗体或 HIV-2 抗体阳性、抗体阴性或抗体不确定。

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

重组/线性免疫印迹试验同样采用间接法检测样本中的 HIV-1/2 特异性抗体，试剂盒的膜条上包被的是 HIV-1/2 重组抗原或合成多肽抗原，相比于 WB，其采用标准化抗原条带，提高了检测的敏感性和可重复性。待测样本中的抗体与包被的抗原发生特异性免疫反应，随后加入辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase, HRP）标记的抗人 IgG 抗体，与 HIV 特异性 IgG 抗体相结合。加入显色底物后，在酶的催化下，特异性抗体的结合部位出现肉眼可见条带，按照试剂盒说明书的判定标准，报告待测样本为 HIV-1 抗体或 HIV-2 抗体阳性、抗体阴性或不确定。

5. HIV 抗体自我检测

艾滋病自我检测是个体采集自身样本、进行检测和读取结果的过程。主要是基于免疫层析或胶体金技术检测 HIV 感染者血液、尿液、口腔黏膜渗出液中的 HIV 抗体。个体可自己进行检测操作，简便快速，一般可在 10~30 分钟内得到检测结果。近年来，艾滋病自我检测由于方便、快捷及保护隐私等特点受到广泛认可，国际上已有多种获批的基于口腔粘膜渗出液和血液的自检试剂，我国已有基于尿液的自检试剂。自检产品极大提高了检测的可及性，促进了感染者发现。

值得注意的是，世界卫生组织 2016 年发布的 HIV 自我检测指南和 2019 年更新版本的证据审查中明确指出：不建议使用过抗逆转录病毒（Anti-Retrovirus, ARV）药物进行治疗或者预防的个体，如暴露前预防（Pre-exposure prophylaxis, PrEP）或暴露后预防（Post-exposure Prophylaxis, PEP），使用 HIV 检测试剂进行自我检测。

HIV 抗体自我检测的主要步骤包括：（1）采集样本：根据试剂盒说明书，采集相应的样本（如尿液、口腔黏膜渗出液或血液）；（2）检测：将试剂平衡至室温后进行检测，并在规定的时间内读取结果；（3）读取结果：根据说明书指导，读取检测结果。如检测结果有反应，提示可能感染 HIV，应尽快到专业机构进一步检测确定 HIV 感染。如检测结果无反应，提示可能尚未感染 HIV，但如果近期有 HIV 感染高风险行为，不能排除抗体窗口期感染，建议 2~4 周后再次检测。若检测结果无效，建议使用新的试剂重新检测。

6. HIV 相关病原体的联合检测

在一些医疗场景下需要进行 HIV 以及相关病原体的联合检测，这些病原体主要包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和梅毒螺旋体，常见的医疗场景比如手术、输血、血液透析以及接受胃镜、肠镜等有创操作之前，会常规要求多种病原体的联合检测。当出现不明原因的发热、体重下降、皮疹或肝功能异常等临床症状时，医生也会建议进行 HIV 以及相关病原体的联合检测。对多种病原体进行联合检测，既是为了全面评估患者自身的疾病状况，也是保护医护人员免受意外职业暴露的关键措施，同时能有效防止医疗设备导致的交叉感染。此外，血站对献血者血液进行多种病原体的联合检测，是保障用血安全的必要程序。从个人健康角度，在婚前检查、孕期产检时进行多种病原体的联合检测，为阻断艾滋病、梅毒和乙肝母婴传播提供了重要干预时机。在经常发生无保护性行为或共用针具等高风险行为的人群中，进行多种病原体的联合检测可以一次性全面发现可能的感染，实现早发现、早诊断。

HIV 感染相关病原体的联合检测通常使用基于抗原抗体的免疫学检测，比如对乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒抗体、和梅毒螺旋体特异性抗体的检测，初步判断是否存在可能的感染。常用的免疫学联合检测方法为化学发光免疫试验和酶联免疫试验，近年来国内外也在不断发展快速检测方法，可以在快速检测试剂中加入一次样本同时得到多个病原体检测结果，快速检测具有检测时间短、操作简便、无需设备、对实验室条件和人员能力要求较低等特点，适用于急诊、基层以及现场检测，可进一步扩大 HIV 感染相关病原体联合检测的可及性，提升对这些传染性疾病的早期检测发现能力。

需要注意的是，HIV 感染相关病原体的联合检测仅作为一种高效的筛查检测，如果其中任何一项检测指标出现阳性或反应性，必须按照检测诊断流程进行确认，并由专业医生结合临床情况进行诊断。

7. 结果解释和报告

7.1 HIV 抗体和抗原抗体筛查检测

HIV 抗体检测结果应根据试剂盒说明书进行检测结果判断和报告。HIV 抗体和抗原抗体筛查检测的结果报告、解读及建议参见表 2-1，报告模板参见附表 1。

HIV 抗体检测可出现假阳性或假阴性结果，与个体的生理状况以及 HIV 感染进程的特殊性有关。HIV 抗体筛查检测的假阳性主要与其他病原微生物感染、自身免疫状况异常（患有恶性肿瘤、自身免疫性疾病、黄疸、妊娠等）等有关。HIV 抗体筛查检测出现假阴性的可能原因主要包括：处于 HIV 抗体检测窗口期的急性期感染；急性期启动抗病毒治疗或服用暴露前后预防药物引起的 HIV 抗体延迟产生；HIV 感染晚期免疫系统严重受损或存在免疫缺陷等特殊状态导致抗体水平极低等。

此外，HIV 抗原抗体联合筛查检测出现假阳性，除以上原因外还与生产工艺有关。HIV 抗原抗体联合筛查检测试剂的固相载体上同时包被抗 p24 抗原的单克隆抗体和 HIV 抗原，因此在检测过程中，由于载体的表面积有限，吸附到载体上的抗体和抗原的量均会受到限制，导致抗原和抗体检测之间的干扰现象。此外，由于不同厂家试剂所包被的抗原/抗体配比以及抗原/抗体纯度不同，也会影响检测的敏感性和特异性。

HIV 抗体检测产生假阳性或假阴性结果，也可由于实验操作不当导致。以快速检测为例，实验操作不当的原因包括样本非唯一编码或编码错误、加样量不准确、检

测室温过低、未在规定时间内判读、将颜色较浅的弱阳性条带判读为阴性等。通过加强实验室质量控制可减少或避免因实验操作原因造成的假阳性及假阴性。

表 2-1 HIV 抗原抗体检测的结果报告、解读和建议

检测方法	检测结果	结果报告	结果解读	建议
HIV 抗体 筛查检测	抗体有反应	HIV 抗体待确定	可能是真阳性(个体感染 HIV 后产生 HIV 抗体);也可能是假阳性	使用原试剂或其他抗体检测试剂进行复检。复检均有反应, 或一有反应一无反应, 需进一步进行补充试验
	抗体无反应	HIV 抗体阴性	可能是真阴性(未感染 HIV);也可能是假阴性	如近期存在 HIV 感染高风险行为, 不能排除抗体检测窗口期感染, 建议进行核酸检测或 2~4 周后随访检测
不区分抗原抗体结果的 HIV	抗原/抗体有反应	HIV-1 抗原待确定 HIV 抗体待确定	可能是真阳性(机体感染 HIV 后产生 HIV 抗体和/或 p24 抗原);也可能是假阳性	使用原试剂或其他 HIV 抗原抗体联合检测试剂进行复检。复检均有反应, 或一有反应一无反应, 需进一步进行补充试验
抗原抗体联合筛查检测	抗原/抗体无反应	HIV-1 抗原阴性 HIV 抗体阴性	可能是真阴性(机体未感染 HIV);也可能是假阴性	如近期存在 HIV 感染高风险行为, 不能排除抗原/抗体检测窗口期感染, 建议进行核酸检测或 2~4 周后随访检测
区分抗原抗体结果的 HIV 抗原抗体联合筛查检测	抗原、抗体均有反应	HIV-1 抗原待确定 HIV 抗体待确定	可能是真阳性(机体感染 HIV 后产生 HIV 抗体和 p24 抗原);也可能是假阳性	使用原试剂或其他区分 HIV 抗原抗体联合检测试剂进行复检。如复检结果显示 p24 抗原的滴度高于 HIV 抗体滴度, 建议进行核酸检测以及及时诊断感染者

	抗原有反应，抗体无反应	HIV-1 抗原待确定 HIV 抗体阴性。	提示存在急性期感染或极晚期感染的可能；也可能是假阳性	使用原试剂或其他区分 HIV 抗原抗体联合检测试剂进行复检。复检均有反应，或一有反应一无反应，须选择核酸补充试验
	抗原无反应，抗体有反应	HIV-1 抗原阴性 HIV 抗体待确定	提示可能为机体感染 HIV 后产生 HIV 抗体，也可能为 HIV 抗体假阳性	使用原有试剂双孔/双份检测或使用原试剂或其他区分 HIV 抗原抗体联合检测试剂进行复检。复检均有反应，或一有反应一无反应，需进一步进行补充试验
	抗原、抗体均无反应	HIV-1 抗原阴性； HIV 抗体阴性	可能是真阴性（未感染 HIV）； 也可能是假阴性	如近期存在 HIV 感染高风险行为，不能排除抗原/抗体检测窗口期感染，建议进行核酸检测或 2~4 周后随访检测

7.2 HIV 抗体确证检测

HIV 抗体确证检测的结果报告、解读及建议参见表 2-2，报告模板参见附表 2。

HIV 抗体确证检测结果为阳性（含特定条件下的替代策略），排除特殊原因（如疫苗免疫、输入抗体）后，提示 HIV 感染。按照试剂盒说明书，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、疫情报告和抗病毒治疗转介；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、疫情报告和抗病毒治疗转介。

HIV 抗体确证检测结果为阴性，一般提示未感染 HIV。但由于抗体检测窗口期的存在，抗体检测阴性结果不足以排除 HIV 的感染。除各种检测方法的窗口期存在差别外，窗口期还受感染者的免疫状况、用药情况等影响。若感染者患有免疫系统疾病、接受过免疫抑制剂治疗、使用过暴露前后药物预防服务等，都可能使抗体的产生受到影响，从而使窗口期延长，在 HIV 抗体确证检测中出现假阴性结果。一些在感

染急性期就开始接受抗病毒治疗的成人或 6 月龄之前开始治疗的儿童，可能难以产生高水平的抗体，也可导致抗体检测结果为假阴性。此外，处于 HIV 感染晚期的个体，由于免疫系统严重受损导致抗体水平极低，也可能出现假阴性结果。以上抗体假阴性结果可以通过核酸检测辅助判断。

HIV 抗体确证检测结果可出现不确定的情况。在 HIV 感染过程中，人体针对病毒不同表位产生特异性抗体的水平和时间有所不同，在不能检测到足够多的特异性抗体时，确证结果通常会被判断为不确定，此时个体可能处于 HIV 感染早期或疾病晚期。此外，非特异性反应也可导致 HIV 抗体确证检测出现不确定结果。非特异性反应导致不确定结果的原因较复杂，主要与其他病原微生物感染、自身免疫状况异常及疫苗接种等相关。未感染 HIV 的受检者可能因为感染丙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、人类嗜 T 细胞病毒、结核分枝杆菌、登革热病毒等病原而产生与 HIV 抗体有部分同源性的抗体，从而造成 HIV 抗体不确定结果；受检者自身免疫状况异常（患有恶性肿瘤、自身免疫性疾病、黄疸、妊娠等）或正接受透析，都可能导致不确定结果的出现，如怀孕期间的妇女因生理因素的改变，可能产生类似 p24、gp160 等蛋白的抗体；疫苗接种也可导致在抗体确证检测中出现非特异性反应。如果 HIV 抗体随访检测条带无进展或减少，甚至消失，则可确定为非特异性反应。对于 HIV-1 抗体不确定者，需要结合流行病学调查，并通过核酸检测或抗体随访检测确定感染状况。

表 2-2 HIV 抗体确证检测的结果报告、解读和建议

检测结果	结果报告	结果解读	建议
出现可以判断阳性的 HIV-1 特异带	HIV-1 抗体确证阳性	排除特殊原因（如疫苗接种、输入抗体）后，提示感染 HIV-1	做好检测后咨询、疫情报告和抗病毒治疗转介
出现可以判断或提示阳性的 HIV-2 特异带	HIV-2 抗体确证阳性或提示 HIV-2 抗体阳性	排除特殊原因（如疫苗接种、输入抗体）后，提示感染 HIV-2	如确认为 HIV-2 感染阳性，做好检测后咨询、疫情报告和抗病毒治疗转介
无 HIV-1 和/或 HIV-2 特异条带出现	HIV-1 和/或 HIV-2 抗体确证阴性	提示未感染 HIV；但由于抗体确证检测的窗口期较长，如近期有	如怀疑为急性期感染，建议进一步做核酸检测或进行抗体随访检测；

		HIV 感染高风险行为 不能排除 HIV 急性期 感染；此外，也需考虑 极晚期感染等情况	如临床症状提示为极晚 期感染或存在免疫缺陷 等特殊情況，建议进一 步做核酸检测
出现 HIV-1 和/或 HIV- 2 特异条带，但达不到 阳性判定标准	HIV-1 和/或 HIV- 2 抗体确证不确 定	可能未感染，为非特异 性抗体反应；也可能为 HIV 感染早期或晚期 等特殊感染状态	应进行核酸检测或进行 抗体随访检测以确定感 染状况；如临床症状提 示为晚期感染或存在免 疫缺陷等特殊情況，建 议进一步做核酸检测

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准: WS 293-2019[S]. 北京, 2019.
- [2] World Health Organization. Consolidated Guidelines on HIV Testing Services[M]. Geneva: WHO, 2019.
- [3] Association of Public Health Laboratories. Suggested Reporting Language for the HIV Laboratory Diagnostic Testing Algorithm[M]. USA: APHL, 2019.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. False-Positive HIV Test Results[M]. USA: CDC, 2018.
- [5] World Health Organization. Consolidated Guidelines on differentiated HIV Testing Services[M]. Geneva: WHO, 2024.
- [6] World Health Organization. Guidelines on HIV Self-Testing and Partner Notification: Supplement to Consolidated Guidelines on HIV Testing Services[M]. Geneva: WHO, 2016.
- [7] World Health Organization. WHO recommends HIV self-testing—evidence update and considerations for success[M]. Geneva: WHO, 2019.
- [8] World Health Organization. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral

hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030[M]. Geneva: WHO, 2022.

- [9] ABDULLA H, DIN M, WARIS A, et al. The contemporary immunoassays for HIV diagnosis: a concise overview[J]. ASIAN BIOMED, 2023, 17(1): 3-12.
- [10]BHATTA M, BANERJEE S, NANDI S, et al. Performance of commercially available HIV in vitro diagnostic assays: A systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Virol, 2022, 146:105047.
- [11]KABIR MA, ZILOUCHIAN H, CAPUTI M, et al. Advances in HIV diagnosis and monitoring[J]. CRIT REV BIOTECHNOL, 2020, 40(5): 623-38.

第三章 HIV 核酸检测

1. 范围

本章规定了 HIV 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 核酸的定性检测和定量测定。

2. HIV 核酸检测的意义

核酸检测可用于 HIV 感染诊断、抗病毒治疗效果监测及血液筛查。

2.1 感染检测诊断

2.1.1 对筛查试验有反应的个体，可作为补充试验。

2.1.2 对筛查试验无反应的个体，如近期有明确病毒暴露史，或临床症状提示为极晚期感染，可通过核酸检测判定是否为急性期感染或极晚期感染。

2.1.3 暴露前后预防用药个体的定期检测。

2.1.4 HIV 暴露婴儿的早期诊断。

2.2 抗病毒治疗效果监测

2.2.1 在抗病毒治疗后定期检测，可监测和评价抗病毒药物治疗效果。

2.2.2 在抗病毒治疗前进行基线病毒载量检测，有助于指导精准治疗方案。

2.2.3 HIV DNA 定量检测可用于 HIV 储存库大小的评估。

2.3 血液筛查

对献血者的血液以及原料血浆进行核酸检测，可排除抗体检测窗口期的急性感染，保证血液安全。

3. HIV 核酸检测的样本类型和要求

HIV RNA 检测可使用血浆、血清、干血斑样本。HIV DNA 检测可使用全血、淋巴细胞富集液、外周血单个核细胞样本(PBMC)、干血斑。核酸检测样本应采用 EDTA 或枸橼酸钠 (Acid-Citrate-Dextrose, ACD) 抗凝剂管，采集血液后立即轻轻上下颠倒抗凝管，使血液与抗凝剂充分混匀。注意尽量不使用抗体确证检测剩余的样本进行核酸检测。

4. HIV 核酸检测的技术原理

4.1 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术(Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)利用热循环仪在变性、退火和延伸三个阶段进行扩增,通过加入荧光染料或荧光探针实时监测 PCR 扩增过程产生的荧光信号,生成 HIV 核酸的定性结果或通过引入内标或外部标准曲线的方法生成 HIV 核酸的定量结果。

4.2 转录介导的扩增技术

转录介导的扩增技术是一类等温扩增技术,其原理是使用含有 T7 RNA 聚合酶结合位点的引物与 RNA 模板结合,通过 MMLV 逆转录酶的作用,将 RNA 逆转录成 cDNA 作为模板,在 T7 RNA 聚合酶的作用下,合成大量的 RNA 产物。这些 RNA 产物又可以作为新的模板,再次进行逆转录和转录,从而形成循环扩增过程,用于 HIV 核酸的定性或定量检测。

5. HIV 核酸检测的方法

5.1 HIV 核酸定性检测方法

定性检测方法通常在产品说明书中会说明阳性阈值。阳性阈值是通过使用具有统计学意义数量的 HIV 阳性和阴性样本,采用特定统计学方法,如受试者工作特征曲线(Receiver Operating Characteristic Curve,简称 ROC 曲线)进行确定。按照产品说明书操作后,将样本检测值(如 Ct 值)与试剂阳性阈值进行比较,当检测值大于阳性阈值报告为阳性(反应性),检测值小于阳性阈值则报告为阴性(非反应性)。

5.2 HIV 核酸定量检测方法

定量检测方法通常在产品说明书中会说明检测限(Limit of detection, LoD)和定量限(Limit of quantitation, LoQ)值。检测限是指通过特定检测方法,能以 $\geq 95\%$ 的置信度被稳定检出的分析物(HIV RNA 或 DNA)的最低浓度(或最小量);定量限是指通过特定检测方法,可实现在既定准确度和精密度下定量检测的分析物浓度,包括定量下限(Lower limit of quantitation, LLoQ)和定量上限(Upper limit of quantitation, ULoQ)。定量下限是在既定准确度和精密度下可以定量的最低测量浓度。定量上限是在既定准确度和精密度下可以定量的最高测量浓度。

我国获批的 HIV-1 核酸定量检测产品包括 RNA 和 DNA 定量检测产品。

5.2.1 RNA 定量检测

RNA 定量检测的单位用每毫升血浆或血清样本细胞中的拷贝数或国际单位（拷贝/mL 或 IU/mL）表示，表示每毫升血浆或血清样本中 HIV RNA 的含量。通常 RNA 定量检测试剂说明书中会说明拷贝/mL 和 IU/mL 之间的转换关系。。

由于 HIV-1 基因的高度变异性可能影响 HIV-1 RNA 定量检测的敏感性，且由于不同试剂的方法学差异（如扩增靶标片段选择、引物和探针设计的差异），同一样本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。为准确评估抗病毒疗效和病程进展，对同一患者建议持续使用同一种检测产品，有助于病毒载量变化的合理解读。此外，需关注试剂版本迭代对检测一致性的潜在影响。一般来说，不同检测产品间的检测数值无固定的换算关系，故不宜直接比较。

5.2.2 DNA 定量检测

DNA 定量检测的单位通常用每 10^6 个细胞中的拷贝数（拷贝/ 10^6 cells）表示，表示每 10^6 个细胞中 HIV DNA 的含量。

与 RNA 定量检测方法类似，DNA 定量检测产品说明书中会说明检测限、定量限以及在不同区间内定量值的结果解释。除针对 HIV-1 的特异性引物探针外，DNA 定量检测试剂通过设置细胞定量体系，标化细胞中的 HIV DNA 含量，可用于 HIV 感染者抗病毒治疗效果的评价以及 HIV RNA 无法检出时感染者体内 HIV 病毒水平的监测。

6. 不同模式的 HIV 核酸检测

6.1 HIV 核酸即时检测（Point-of-care Testing, POCT）

HIV 核酸即时检测通常基于微流控芯片技术，将核酸提取、扩增和检测功能集成在单个芯片/卡盒，通过在微米级通道和腔室中实现样品的自动化处理和检测，完成 HIV 核酸的整个检测过程。POCT 检测技术通常可在 30 分钟到 1 个半小时内完成检测，且具有灵活的通量，可以实现单样本上机检测。基于核酸扩增的 POCT 方法具有高灵敏度和特异性，检测灵敏度可达到 10-100 拷贝/mL。

HIV 核酸即时检测对实验室要求相对较低，实验操作便捷，适用于缺乏专业人员和资源有限的地区，可避免因长途运输导致的样本质量下降。在 HIV 感染诊断、HIV 暴露婴儿感染早期诊断、病程监控及抗病毒治疗效果评价等方面具有重要的应用价值。

但需要注意的是，尽管 HIV 核酸即时检测降低了对实验室硬件条件的要求，简化了操作步骤，但操作人员仍需接受规范化的操作培训，需具备必要的检测技能并严格遵守生物安全规范。

6.2 HIV 集合核酸检测

HIV 集合核酸检测是将多份 HIV 筛查阴性样本集合于 1 支样品管后，进行核酸定性检测的方法。若集合样本检测结果为阳性，则需将集合样本拆分后进一步检测以确定核酸阳性样本；若集合样本检测结果为阴性，则判定集合中的所有样本均为核酸阴性。此模式利用核酸检测技术高度敏感性的优势，对 HIV 筛查阴性的高危人群样本进行集合核酸检测，可及时发现窗口期 HIV 感染者。与单份样本逐一检测相比，集合检测能够提高核酸筛查效率，节约检测成本，适用于血液筛查和 HIV 感染高风险人群筛查检测。具体的检测方法和检测流程详见附件 1。

6.3 HIV 感染相关病原体的核酸联合检测

HIV 感染相关病原体的核酸联合检测是指通过单次检测实验同时检测两种或两种以上与 HIV 具有相似传播途径病原体的核酸检测方法。HIV 感染相关病原体的核酸联合检测主要为定性检测，其中 HIV 感染相关病原体可包括但不限于乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）和丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus, HCV）等。在血站对献血者血液的筛查检测中，HIV/HBV/HCV 三种病原体的核酸联合检测已得到广泛验证和使用，与基于抗原抗体的免疫学检测方法结合使用可有效降低 HIV、HBV 和 HCV 感染的漏检率，保证临床用血安全。近年有研究也探索在 HIV、HBV 和 HCV 合并感染重点人群，以及医疗机构就诊的特殊人群中（比如免疫功能缺陷人群），应用 HIV/HBV/HCV 三种病原体的联合核酸检测快速和准确地发现一些仅通过抗体检测难以发现和诊断的特殊感染者，有效整合检测资源帮助感染者全面了解自身感染以及减少潜在的医源性感染风险。

7. 结果解释和报告

7.1 HIV-1 RNA 的定性检测

HIV-1 RNA 定性检测的结果报告、解读及建议参见表 3-1，报告模板参见附表 4。

（1）根据试剂盒说明书的要求判定检测结果：核酸阳性的检测结果一般报告为“有反应（Reactive）”或“检出（Detected）”；核酸阴性的检测结果一般报告为“无反应（Non-reactive）”或“未检出（Not Detected）”。

（2）报告结果时应标注检测单位，例如常用的检测单位是拷贝/mL，报告结果时应标注检测的技术方法、试剂盒的检测限等信息。对于弱阳性结果，应观察扩增曲线是否为标准“S”型曲线，或在报告检测结果时一并报告原始检测值（如 Ct 值）作为参考。

（3）受限于当前检测系统的灵敏度，HIV 核酸定性检测结果为阴性时，仅表明在该样本中未检出达到试剂检测限的病毒核酸。此结果不能排除 HIV-1 感染的可能，尤其对于存在高风险行为、或曾使用暴露前/暴露后预防（PrEP/PEP）药物的个体。对此类人群，需结合其流行病学史、临床表现及其他实验室检测指标（如抗体检测）进行综合判断。如怀疑个体在核酸检测窗口期或检测结果为假阴性，可间隔适当时间后重新采样复检。

（4）在实际检测过程中，还可能会遇到检测失败或结果无效的情况，这可能与检测试剂的性能、方法学局限及样本质量（如溶血、核酸降解、采集不当）等因素有关。出现此类情况时，应严格按照试剂盒使用说明书的规定执行，进行重新检测或重新采样后再进行复测。

表 3-1 HIV-1 RNA 定性检测的结果报告、解读和建议

检测结果	报告	结果解读	建议
有反应性或检出	HIV-1 RNA 阳性	样本中检出 HIV-1 RNA	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
无反应或未检出	HIV-1 RNA 阴性	样本中未检出 HIV-1 RNA	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。如怀疑个体在核酸检测窗口期或检测结果为假阴性，可间隔适当时间后重新采样送检

7.2 HIV-1 RNA 定量检测

7.2.1 HIV-1 定量检测用于个体感染诊断

HIV-1 RNA 定量检测根据试剂盒说明书的要求判定检测结果，用于感染诊断的结果报告、解读及建议参见表 3-2，报告模板参见附表 4。

（1）当血浆 HIV-1 RNA 定量检测值在定量范围内，报告“检出 HIV-1 RNA，（检测值）”并可作为 HIV-1 感染诊断依据。

（2）当血浆 HIV-1 RNA 定量检测值高于定量上限，报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果高于定量上限”并可作为 HIV-1 感染诊断依据。

（3）当定量检测值高于检测限但低于定量检测下限时，报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果低于定量检测下限”，需结合流行病学史、临床病史、暴露前或暴露后预防用药史、CD4⁺ T 淋巴细胞计数和抗体随访检测结果等进行综合判断。由于样本质量与检测方法均可能影响结果，如怀疑核酸假阳性，建议使用不同方法重新检测或重新采样复测。

（4）当定量检测值低于检测限时，报告“未检出”。对于暴露前或暴露后预防用药的个体或者自身免疫系统可有效抑制病毒复制的精英控制者，定量检测结果为未检出，不能完全排除 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。如怀疑核酸假阴性，可使用不同方法重新检测或重新采样复测。

根据试剂盒说明书的要求，可以在报告检测结果时选择一并报告原始检测值（如 Ct 值）作为参考。报告结果时应标注检测单位、检测的技术方法、试剂盒的检测限、定量范围等信息。

表 3-2 HIV-1 RNA 定量检测用于感染诊断的结果报告、解读和建议

检测结果	报告	结果解读	建议
定量检测值在定量范围内	报告“检出 HIV-1 RNA，（检测值）”	样 本 中 检 出 HIV-1 RNA	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
定量检测值高于定量上限	报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果高于定量上限”	样 本 中 检 出 HIV-1 RNA	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
定量检测值高于检测限但低于定量检测下限	报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果低于定量下限”	样 本 中 检 出 HIV-1 RNA，但定量结果不准确	需结合流行病学史、临床病史、暴露前或暴露后预防用药史、CD4 ⁺ T 淋巴细胞计数等综合诊断。如怀疑核酸假阳性，可

			使用不同方法重新检测或重新采样复测，以确认结果
定量检测值低于检测限	报告“未检出”	样本中未检出 HIV-1 RNA	对于暴露前或暴露后预防用药个体或者精英控制者，不能完全排除感染，需根据流行病学史、临床表现和实验室其他相关指标综合判断。如怀疑核酸假阴性，可使用不同方法重新检测或重新采样复测

7.2.2 HIV-1 RNA 定量检测用于疗效监测

HIV-1 RNA 定量检测根据试剂盒说明书的要求报告定量检测结果，用于疗效监测的结果报告、解读及建议参见表 3-3，报告模板参见附表 4。

（1）定量检测值在试剂盒定量范围内时，报告“检出 HIV-1 RNA，（检测值）”。例如某试剂盒的定量范围是 $50 \sim 10^7$ 拷贝/mL，检测结果为 1000 拷贝/mL，则报告“检出 HIV-1 RNA，1000 拷贝/mL”。

（2）当检测值显示高于定量上限时，报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果高于定量上限”。如果需要精确定量结果，可将样本稀释至线性范围内再次进行定量检测。

（3）当定量检测值显示为低于试剂盒定量下限时，报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果低于定量下限”。例如某试剂盒的定量下限是 20 拷贝/mL，检测结果显示 <20 拷贝/mL，则报告“检出 HIV-1 RNA， <20 拷贝/mL”。

（4）当定量检测值为无扩增信号或低于试剂盒的检测限时，报告“未检出”。

根据试剂盒说明书的要求，可以在报告检测结果时选择一并报告原始检测值（如 Ct 值）作为参考。报告结果时应标注检测单位、检测的技术方法、试剂盒的检测限、定量范围等信息。

表 3-3 HIV-1 RNA 定量检测用于疗效监测的结果报告、解读和建议

检测结果	报告	结果解读	建议
定量检测值在定量范围内	报告“检出 HIV-1 RNA，（检测值）”	样本中检出 HIV-1 RNA，定量值在该	报告检测值

		检测方法的定量范围内	
定量检测值大于定量上限	报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果高于定量上限”	样本中检出 HIV-1 RNA，定量值超过该检测方法的定量上限	如果需要精确定量结果，可将样本稀释至线性范围内再次进行定量检测
定量检测值大于检测限但小于定量检测下限	报告“检出 HIV-1 RNA，定量结果低于定量下限”	样本检出 HIV-1 RNA，但定量结果不准确	表明样本中 HIV-1 RNA 含量极低，定量结果仅供参考
定量检测值小于检测限	报告“未检出”	样本中未检出 HIV-1 RNA	继续加强治疗依从性

7.3 HIV-1 DNA 的定量检测

HIV-1 DNA 定量检测根据检测试剂盒的说明书内容，报告 DNA 定量测定结果，结果报告、解读及建议参见表 3-4，报告模板参见附表 4。

（1）当检测值处于定量范围内时，报告报告“检出 HIV-1 DNA，（检测值）”。例如某试剂盒的定量范围是 $100 \sim 10^6$ 拷贝/ 10^6 cells，检测结果为 1000 拷贝/ 10^6 cells，则报告“检出 HIV-1 DNA，1000 拷贝/ 10^6 cells”。

（2）当检测值高于定量上限时，报告“检出 HIV-1 DNA，定量结果高于定量上限”。如果需要精确定量结果，可将样本稀释至线性范围内再次进行定量检测。

（3）当检测值高于检测限且低于定量下限时，同时细胞定量结果有效，报告“检出 HIV-1 DNA，低于定量下限”。例如某试剂盒的定量下限是 100 拷贝/ 10^6 cells，检测结果显示 <100 拷贝/ 10^6 cells，则报告“检出 HIV-1 DNA， <100 拷贝/ 10^6 cells”。

（4）当检测值小于检测限时，同时细胞定量结果有效，报告“低于试剂盒检测下限”。

根据说明书的要求，可以在报告检测结果时选择一并报告检测 Ct 值作为参考。若细胞定量结果不满足试剂盒要求，则此次检测结果无效，并对此样本进行重复检测。报告结果时应标注检测的技术方法、试剂盒的检测限、定量范围等信息。

表 3-4 HIV-1 DNA 定量检测的结果报告、解读和建议

检测结果	报告	结果解读	建议
定量检测值在定量范围内	报告“检出 HIV-1 DNA，（检测值）”	样本中检出 HIV-1 DNA，定量值在该检测方法的定量范围内	检测结果为样本中 HIV-1 DNA 的载量
定量检测值高于定量上限	报告“检出 HIV-1 DNA，定量结果高于定量上限”	样本中检出 HIV-1 DNA，定量值超过该检测方法的定量上限	如果需要精确定量结果，可将样本稀释至线性范围内再次进行定量检测
定量检测值高于检测限但低于定量检测下限	报告“检出 HIV-1 DNA，低于定量下限”	样本检出 HIV-1 DNA，但定量结果不准确	表明样本中 HIV-1 DNA 含量极低，定量结果仅供参考
定量检测值低于检测限	报告“低于试剂盒检测下限”	样本中 HIV-1 DNA 含量低于该检测方法的检测下限	继续加强治疗依从性

参考文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention. Technical Update for HIV Nucleic Acid Tests Approved for Diagnostic Purposes[M]. USA: CDC, 2023.
- [2] Association of Public Health Laboratories. Use and Interpretation of Quantitative HIV-1 RNA Test Results: Guidance for Laboratories[M]. USA: APHL, 2021.
- [3] Association of Public Health Laboratories. Suggested Reporting Language for the HIV Laboratory Diagnostic Testing Algorithm[M]. USA: APHL, 2019.
- [4] PREISER W, VAN ZYL GU. Pooled testing: A tool to increase efficiency of infant HIV diagnosis and virological monitoring[J]. Afr J Lab Med, 2020,9(2): 1035.
- [5] DELANEY KP, HANSON DL, MASCIOTRA S, et al. Time Until Emergence of HIV Test Reactivity Following Infection With HIV-1: Implications for Interpreting Test

- Results and Retesting After Exposure[J]. Clin Infect Dis, 2017,64(1): 53-59.
- [6] PAI NP, KARELLIS A, KIM J, et al. Modern diagnostic technologies for HIV[J]. Lancet HIV, 2020,7(8): e574-e581.
- [7] WANG Y, PAN P, XING W, et al. A comparative performance evaluation of 12 HIV-1 viral load testing assays: advancing the clinical application of HIV-1 nucleic acid testing in China. Microbiol Spectr. 2025; 13(7): e0321824.
- [8] PAN P, XUE Y, GAO J, et al. Fifteen years of the proficiency testing program for HIV-1 viral load testing laboratories in China, 2005-2019. J Clin Virol. 2021; 142: 104911.
- [9] ROUZIOUX C, AVETTAND-FENOEL V. Total HIV DNA: a global marker of HIV persistence[J]. Retrovirology, 2018, 15(1): 30.
- [10] LIN L, YUE YS, WANG ND, et al. Whole blood as an alternative to peripheral blood mononuclear cell for detection of total HIV-1 DNA[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 941.
- [11] DRAIN P K, DORWARD J, BENDER A, et al. Point-of-Care HIV Viral Load Testing: an Essential Tool for a Sustainable Global HIV/AIDS Response[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3).
- [12] 张鑫, 段星, 刘静, 等. HIV-1 核酸定量检测在云南省德宏州抗体不确定样本中的应用[J]. 中国艾滋病性病, 2022, 28(03): 321-324.

第四章 HIV 感染检测流程

1. 范围

本章规定了适用于不同检测诊断应用场景下的 HIV 检测流程，包括结果报告、结果解释及建议。

2. 临床个体诊断相关的检测流程及结果报告

用于对成人、青少年及 18 个月龄以上儿童进行个体诊断的 HIV 感染检测流程包括两个步骤：筛查检测，补充检测。

2.1 筛查检测流程

HIV 感染的筛查检测通常使用 HIV 抗原抗体联合检测试验或者 HIV 抗体检测试验。筛查检测报告见附表 1。

2.1.1 使用不区分抗原抗体检测结果的 HIV 抗原抗体联合检测试验进行筛查检测的流程

使用不区分抗原抗体检测结果的 HIV 抗原抗体联合检测试验进行初筛时，检测试验如无反应，报告“HIV 抗体阴性、HIV-1 抗原阴性”；检测试验如有反应，使用原试剂或者其他 HIV 抗原抗体联合检测试剂进行两次重复检测。两次复检试验如均无反应，报告“HIV 抗体阴性、HIV-1 抗原阴性”；两次复检试验如均有反应或一有一无反应，报告“HIV 抗体或 HIV-1 抗原待确定”，需进行 HIV-1 核酸试验或 HIV 抗体确证试验确认感染。

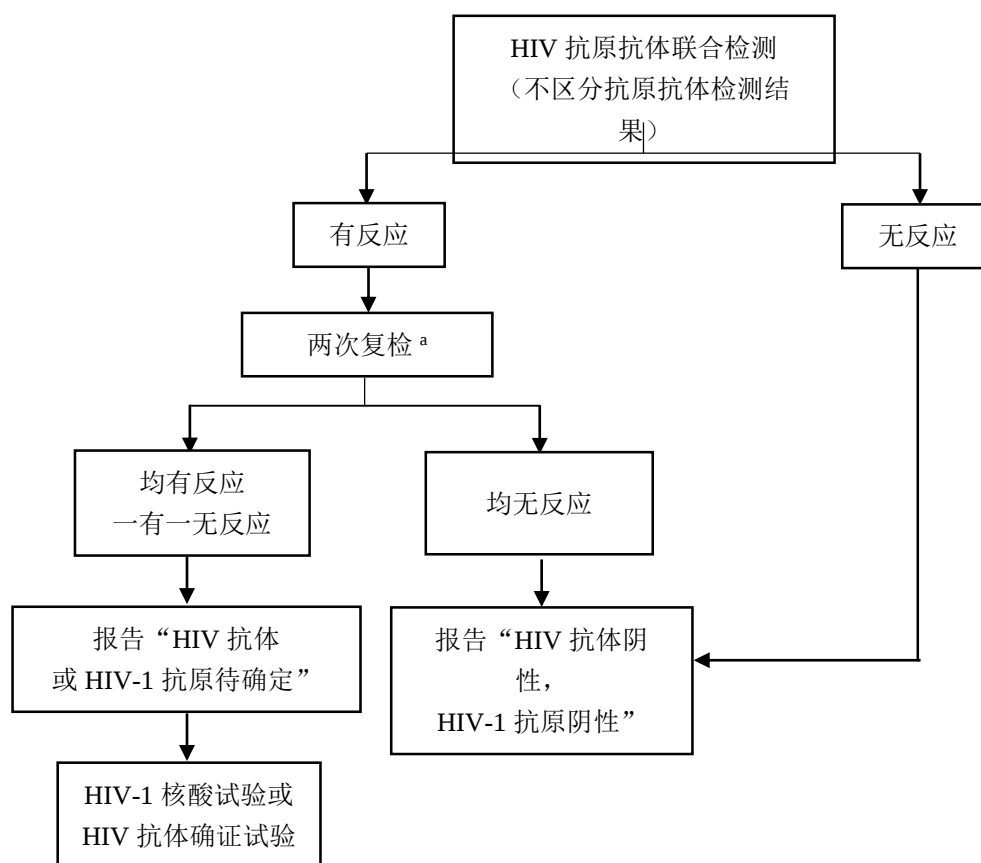


图 4-1 使用 HIV 抗原抗体联合检测试验（不区分抗原抗体检测结果）
的筛查检测流程

a 可使用原试剂或者其他 HIV 抗原抗体联合检测试剂

2.1.2 使用区分抗原抗体检测结果的 HIV 抗原抗体联合检测试验进行筛查检测的流程

使用区分抗原抗体检测结果的 HIV 抗原抗体联合检测试验进行初筛时，检测试验如无反应，报告“HIV 抗体阴性，HIV-1 抗原阴性”；检测试验如有反应，用原试剂或者其他可区分抗原抗体检测结果的 HIV 抗原抗体联合检测试剂进行两次重复检测。两次复检试验如均无反应，报告“HIV 抗体阴性，HIV-1 抗原阴性”；两次复检试验如出现抗体均无反应而抗原检测结果均有反应或一有一无反应时，报告“HIV 抗体阴性，HIV-1 抗原待确定”，需进行 HIV-1 核酸检测试验确认感染；两次复检试验如出现抗原均无反应而抗体检测结果均有反应或一有一无反应时，报告“HIV 抗体待确定，HIV-1 抗原阴性”，需进行 HIV-1 核酸检测试验或 HIV 抗体确证试验确认

感染；两次复检试验如出现抗体和抗原的检测结果均有反应或一有一无反应时，报告“HIV 抗体待确定，HIV-1 抗原待确定”，需进行 HIV-1 核酸试验或 HIV 抗体确证试验确认感染。

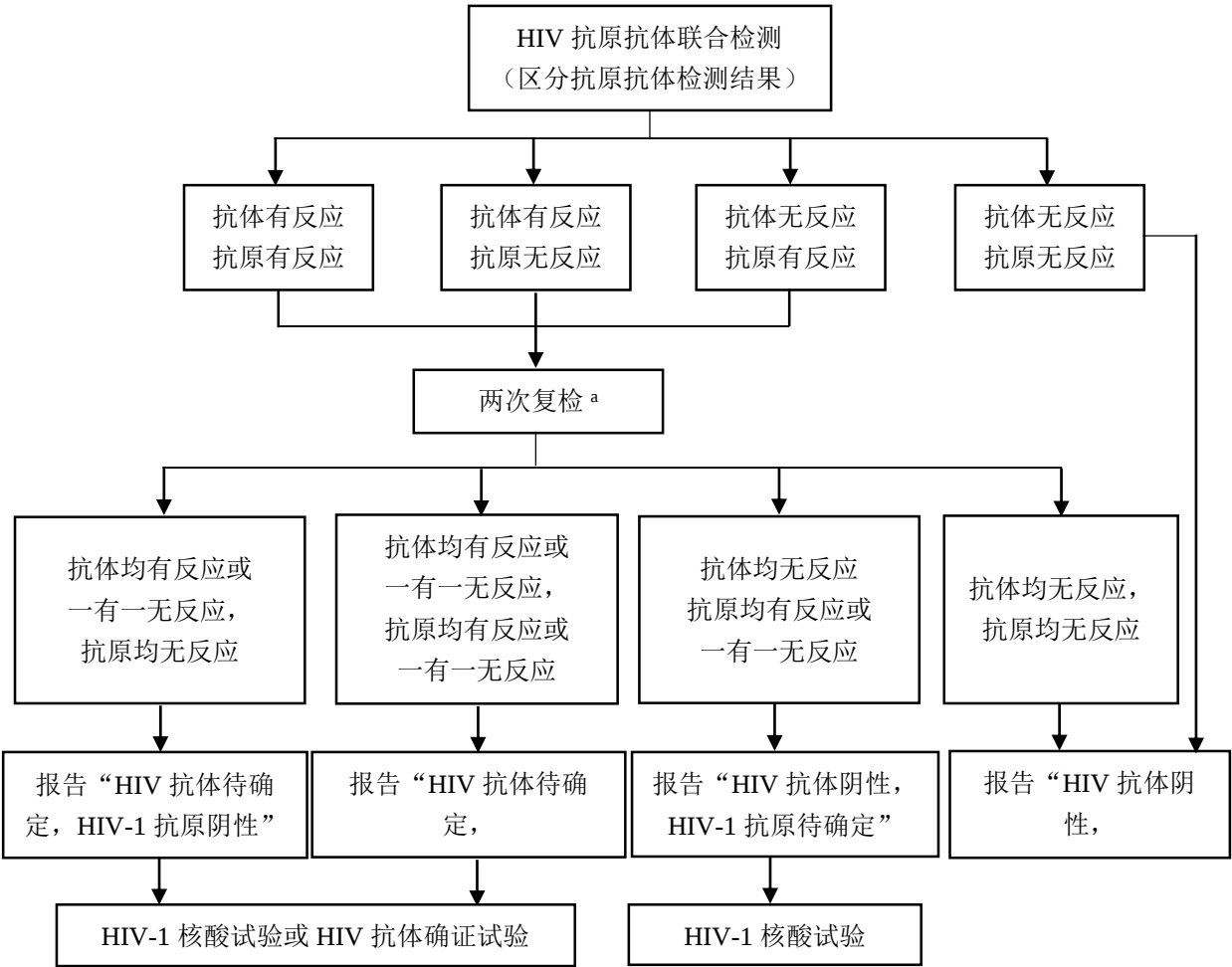


图 4-2 使用 HIV 抗原抗体联合检测试验（区分抗原抗体检测结果）的筛查检测流程

a 可使用原试剂或者其他 HIV 抗原抗体联合检测（区分抗原抗体检测结果）试剂

2.1.3 使用 HIV 抗体检测试验进行筛查检测的流程

使用 HIV 抗体检测试验进行初筛时，检测试验如无反应，报告“HIV 抗体阴性”；检测试验如有反应，用原试剂或其他 HIV 抗体检测试剂进行两次重复检测。两次复检如均无反应，报告“HIV 抗体阴性”；两次复检如均有反应或一有一无反应，报告“HIV 抗体待确定”，需进行 HIV-1 核酸试验或 HIV 抗体确证试验确认感染。

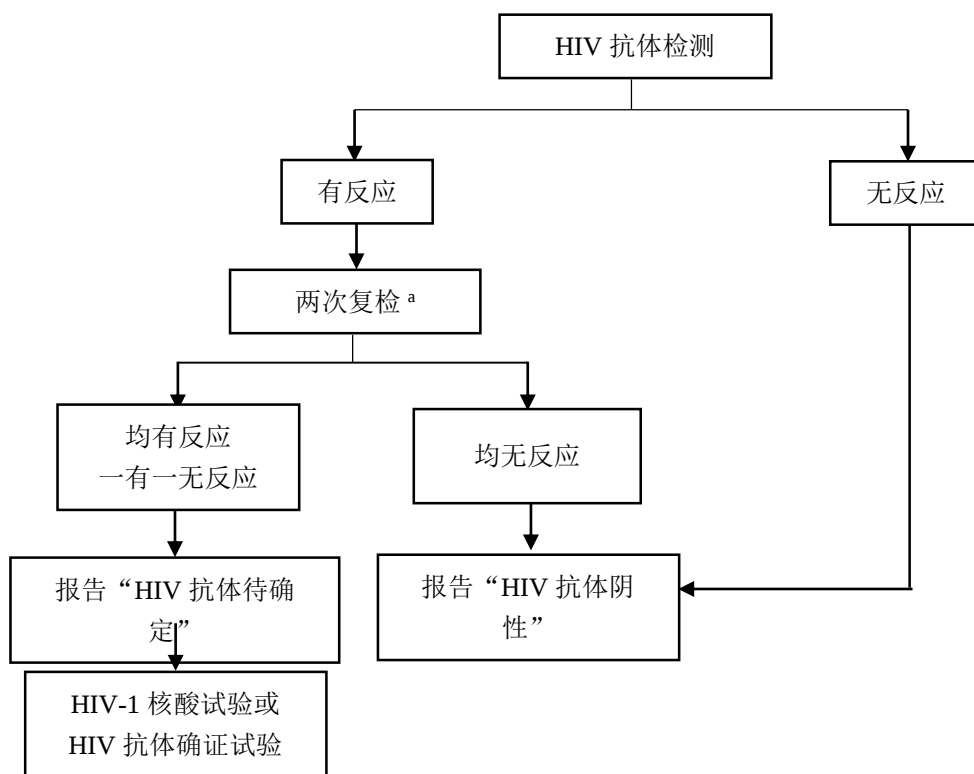


图 4-3 使用 HIV 抗体检测试验的筛查检测流程

a 可使用原试剂或者其他 HIV 抗体检测试剂

2.1.4 对疑似急性期感染者使用 HIV-1 核酸检测试验进行筛查检测的流程

如果个体在近 6 个月内有 HIV 暴露的流行病学史、出现 HIV 感染急性期或极晚期临床症状、不规范使用过暴露前后预防药物、或存在免疫抑制和免疫缺陷等特殊情况，当 HIV 抗原抗体联合检测或 HIV 抗体检测无反应，可进行 HIV-1 核酸筛查检测以提示是否存在抗体或抗原检测窗口期内的急性期感染。HIV-1 核酸筛查检测试验如无反应，报告“HIV-1 核酸阴性”；如有反应，报告“HIV-1 核酸待确定”，需使用 HIV-1 核酸补充试验以确认感染。

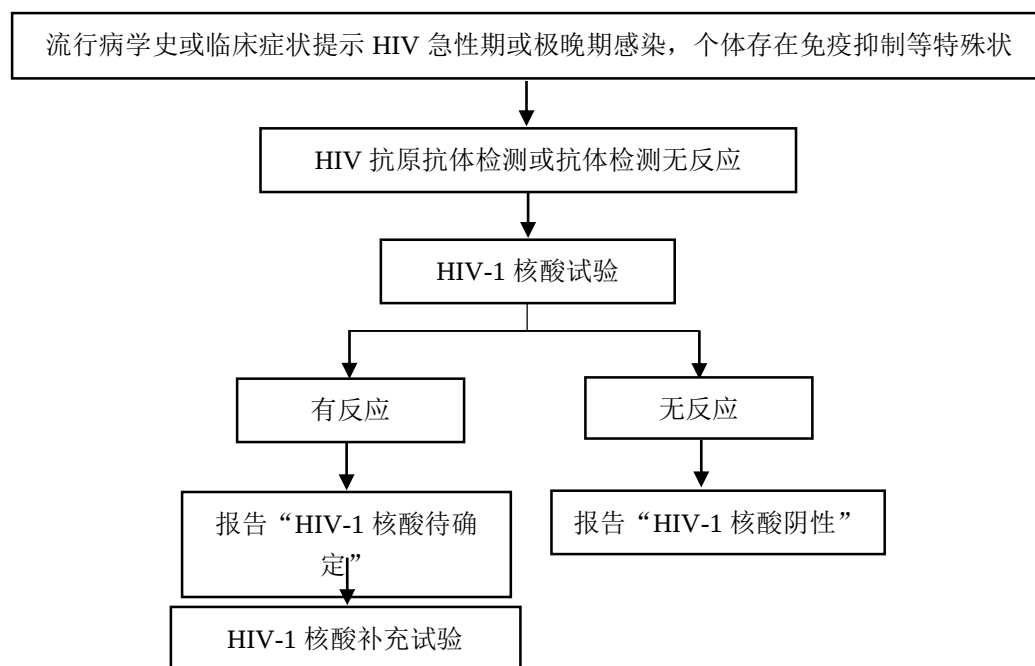


图 4-4 使用 HIV-1 核酸试验的筛查检测流程

2.2 补充检测流程

对筛查检测有反应的个体，可根据筛查检测结果和实验室检测能力选择使用 HIV-1 核酸试验或 HIV 抗体确证试验进行补充检测，以进一步提供实验室检测数据辅助临床诊断。为加快诊断时效性，建议首选使用 HIV-1 核酸试验进行补充检测以确认感染。

2.2.1 HIV-1 核酸试验

当使用 HIV-1 核酸试验进行补充检测时，首选推荐适用于个体诊断的核酸定性检测试验，当核酸定性检测试验不可及时，可使用核酸定量检测试验。

当使用 HIV-1 核酸定性检测时，根据试剂盒说明书报告检测结果。如检测结果为阳性，报告“HIV-1 核酸阳性”；如检测结果为阴性，报告“HIV-1 核酸阴性”，并进行 HIV 抗体确证检测。

当使用 HIV-1 核酸定量检测时，根据试剂盒说明书报告检测结果。如检测结果在试剂盒定量范围之内，报告核酸检测值。如检测结果高于检测限但低于定量下限，报告“HIV-1 核酸检出”；如果所使用核酸定量检测试验的检测限与定量下限一致，当检测结果高于检测限/定量下限时，报告核酸检测值。如检测结果低于检测限，报

告“HIV-1 核酸未检出”，并进行 HIV 抗体确证试验以排除精英控制者、接受抗病毒药物治疗或抗体筛查试验假阳性的情况。当核酸定量检测值较低时，如怀疑存在样本质量问题或假阳性结果，可重新采样检测。

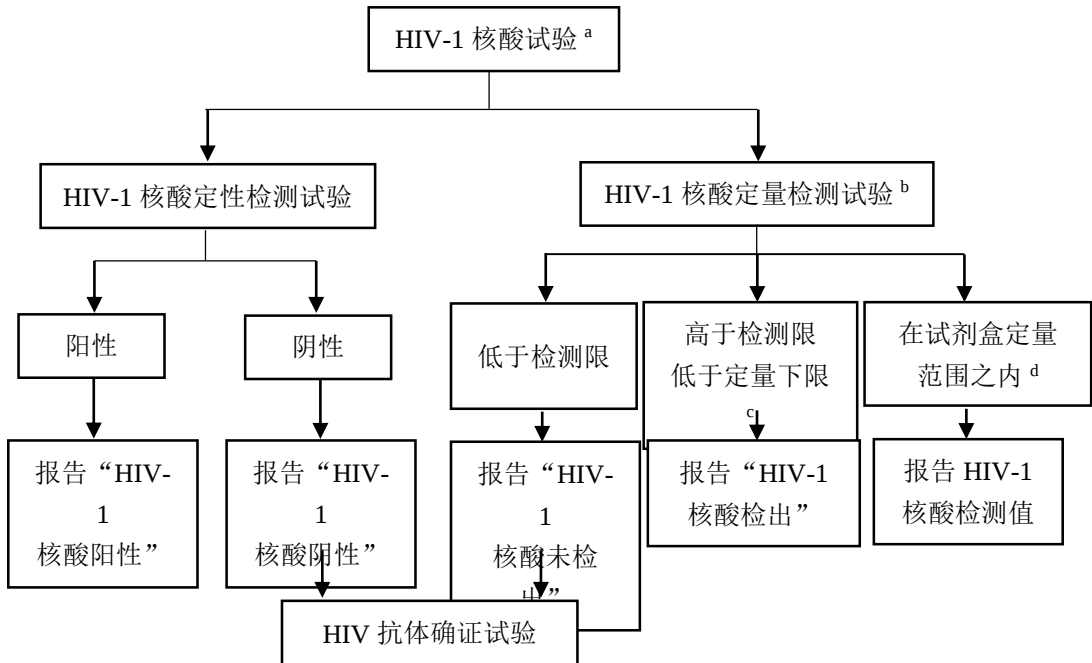


图 4-5 先使用 HIV-1 核酸试验的补充检测流程

- a 首选推荐适用于个体诊断的核酸定性检测试验，当核酸定性检测试验不可及时，可使用核酸定量检测试验。
- b 当核酸定量检测值较低时，如怀疑存在样本质量问题或假阳性结果，可重新采样检测。
- c 如果所使用核酸定量检测试验的检测限与定量下限一致，报告核酸检测值。
- d 如果核酸定量检测试验结果大于定量上限，需稀释样本后重新检测。

2.2.2 HIV 抗体确证试验

使用 HIV-1 抗体确证试验或者可区分 HIV-1 和 HIV-2 的抗体确证试验时，如出现 HIV-1 抗体条带并符合试剂盒说明书中的阳性判定标准时，报告“HIV-1 抗体确证阳性”；如出现 HIV-2 抗体条带并符合试剂盒说明书中的阳性判定标准时，报告“HIV-2 抗体确证阳性”。如无条带出现，报告“HIV-1 和/或 HIV-2 抗体确证阴性”；如出现 HIV-1 和/或 HIV-2 抗体条带但不符合试剂盒说明书中的阳性判定标准时，报告“HIV-1 和/或 HIV-2 抗体不确定”。当 HIV-1 抗体确证结果为不确定时，进行 HIV-

1 核酸检测试验。当 HIV-1 抗体确证结果为阴性时，如果个体在近 6 个月内有 HIV 暴露流行病学史、出现 HIV 感染急性期或极晚期临床症状、不规范使用过暴露前后预防药物、或存在免疫抑制和免疫缺陷等特殊状态，应进行 HIV-1 核酸试验以确认可能的急性期感染。

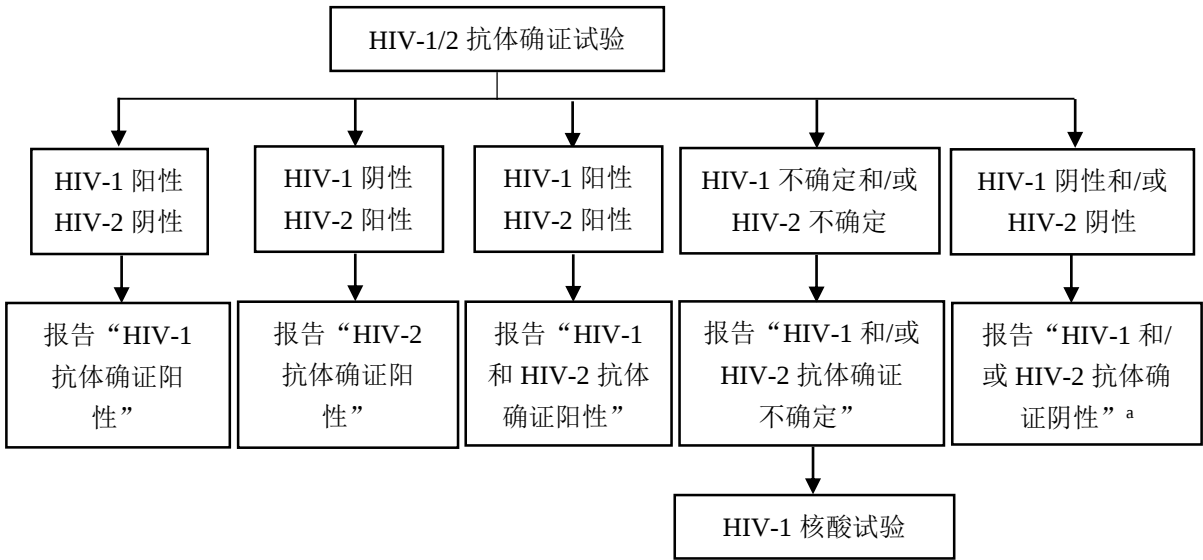


图 4-6 先使用 HIV 抗体确证试验的补充检测流程

a 如果个体在近 6 个月内有 HIV 暴露的流行病学史、出现 HIV 感染急性期或极晚期临床症状、不规范使用过暴露前后预防药物、或存在免疫抑制和免疫缺陷等特殊状态，应进行 HIV-1 核酸试验以确认可能的感染

2.3 特定条件下的 HIV 感染检测流程（替代策略检测流程）

对于 HIV 感染率大于 5% 的高风险人群及疫情严重地区的一般人群，可采用特定条件下的 HIV 感染检测替代策略。该策略以联合使用多种高灵敏度和高特异性的免疫学筛查检测作为补充试验，替代传统的 HIV 抗体确证试验。替代策略需满足以下要求：1、阳性预测值大于 99%；2、所使用的免疫学筛查试剂，其灵敏度大于 99%，特异性大于 98%。该策略及其采用的筛查检测试剂组合，须经所在地区省级艾滋病确证中心实验室评估，确认符合上述要求后方可实施。

2.3.1 HIV 感染高风险人群

对于 HIV 感染率大于 5% 的高风险人群，可联合使用 3 种筛查试剂进行补充试验。在选用试剂时，3 种试剂中至少 2 种试剂应具有不同的检测方法或原理，可最大

限度避免因检测原理及包被相同抗原而造成的假阳性，如可使用 1 种酶法+1 种化学发光法+1 种快速；两种酶法+1 种快速；1 种酶法+2 种快速等检测组合。若使用 3 种快速检测试剂，应考虑使用不同的样本类型，如血液、尿液、口腔粘膜渗出液；如均选用 3 种血液快速检测试剂，应考虑不同原理，如免疫层析法、免疫渗滤法等；如使用相同的检测方法，应选择不同的标记方法，如胶体金法、胶体硒法和乳胶法等。无论使用何种试剂，需要考虑检测结果的强度，如酶法、化学发光法的 S/CO 值应大于等于 6，快速检测的结果应为强阳性（加样后条带出现时间快、且颜色明显）。

2.3.2 疫情严重地区的一般人群

对于疫情严重地区的一般人群，可联合使用 4 种筛查试剂进行 HIV 抗体补充试验，4 种试剂中至少 3 种试剂应具有不同的检测方法或原理，试剂组合要求参见 2.3.1。

2.3.3 检测流程

替代策略检测流程详见图 4-7。初筛检测使用高敏感性的试剂，如检测无反应，报告“HIV 抗体阴性”；如检测有反应，使用 2 种试剂进行复检（可以使用原有试剂双份/双孔或原有试剂和另一种试剂）。在复检时，如 2 种试剂检测均无反应，报告“HIV 抗体阴性”；如其中 1 种试剂检测为无反应或弱反应，应进行常规补充试验（HIV-1 核酸试验或 HIV 抗体确证试验）；如 2 种试剂检测均为强阳性，根据人群的感染风险高低，选择联合使用 3 种或 4 种试剂进行替代检测（若与复检试剂相同试剂，无需重复检测）。在替代检测时，如所有 3 种或 4 种试剂检测为强阳性，报告“HIV 抗体阳性”，如其中至少 1 种试剂检测为无反应或弱反应，报告“HIV 感染待确定”，进行 HIV-1 核酸检测或 HIV 抗体确证检测。当 HIV 抗体检测为阴性，但怀疑为急性期感染，可重新采样进行 HIV-1 核酸检测。替代策略下的 HIV 抗体确证检测报告见附表 3。

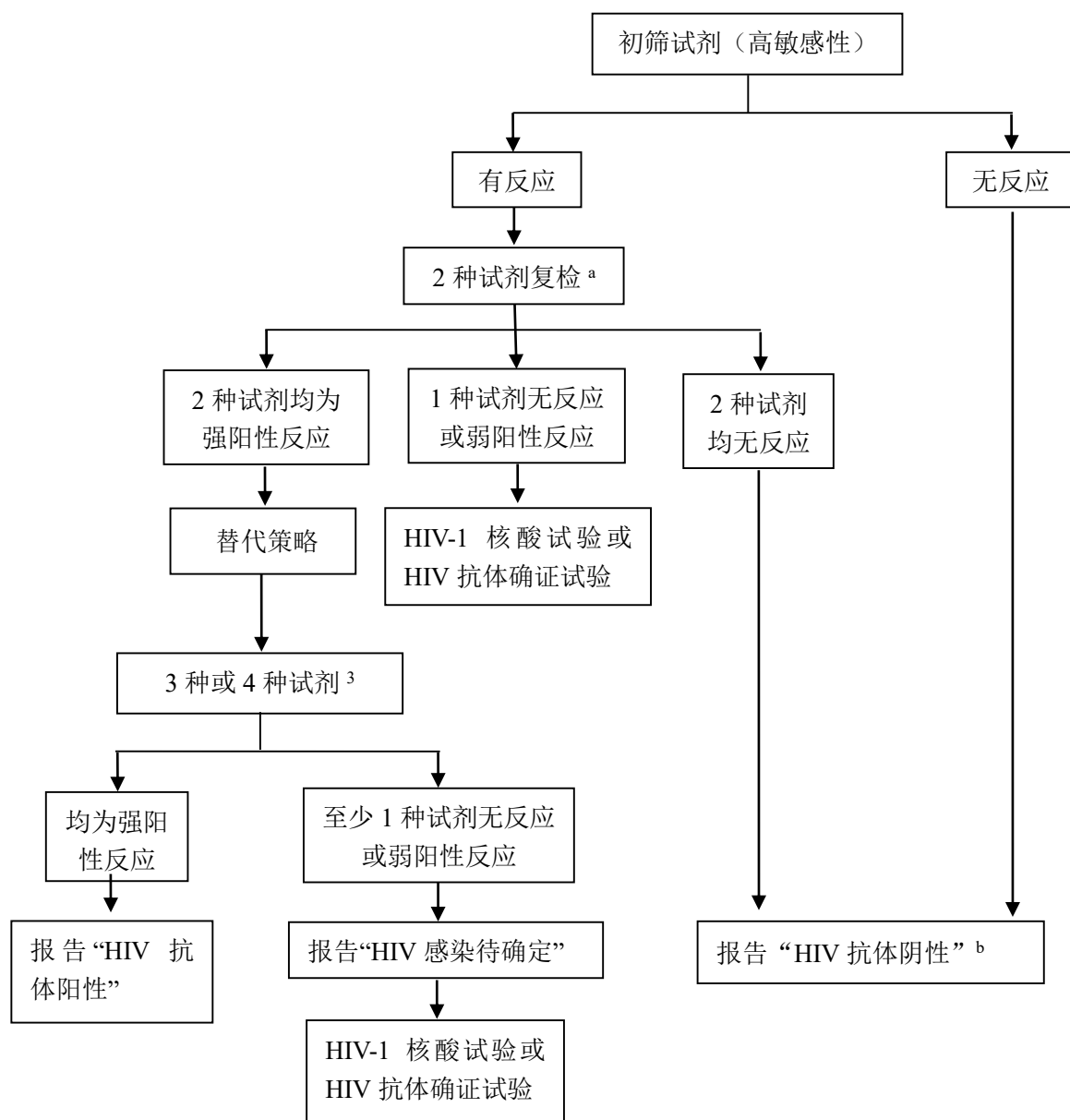


图 4-7 替代策略检测流程

a 可使用原有试剂双份/双孔或原有试剂和另一种试剂

b 若怀疑为急性期感染，建议进行 HIV-1 核酸检测

2.4 检测结果解读和建议

根据实验室检测结果的组合，可初步提示 HIV 感染情况（表 4-1 和表 4-2）。

但由于实验室检测人员通常难以获得个体的流行学史、临床症状、以及接受预防性药物服务或抗病毒治疗药物使用的信息，难以做出诊断。实验室应将检测结果报告给临床医生，由临床医生依据实验室检测结果，综合考虑个体的流行病学史、临床症

状和抗病毒药物服用史进行诊断。对难以准确判定感染的疑难情况，可通过进一步补充其他检测试验，或进行随访检测以确认感染。

如果个体诊断为 HIV 感染，应按规定和要求做好检测后咨询和疫情报告。如果个体的 HIV 抗体筛查有反应，但 HIV-1 核酸检测为阴性，HIV 抗体确证检测为阴性或不确定，个体确认近期没有 HIV 暴露史并且没有使用过预防性药物和抗病毒治疗药物，原则上可考虑排除 HIV 感染。如果个体近期有 HIV 暴露史或者使用过预防性药物和抗病毒治疗药物，随访三个月后，如果 HIV-1 核酸检测仍为阴性，HIV 抗体确证检测为阴性或不确定，原则上可考虑排除 HIV 感染，不再继续随访检测。

表 4-1 首选 HIV-1 核酸试验进行补充检测的结果解读和建议

序号	检测结果			结果解读	建议
	筛查检测	补充检测 1	补充检测 2		
	HIV 抗原抗体或抗体检测	HIV-1 核酸试验	HIV 抗体确证试验		
1	抗体有反应或抗原抗体有反应	阳性或检出	N/A	HIV-1/2 抗体或 HIV-1 p24 抗原阳性、HIV-1 核酸阳性，提示 HIV-1 感染	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗
2	抗体有反应或抗原抗体有反应	阴性或未检出	HIV-1 阳性	HIV-1 抗体确证阳性，提示 HIV-1 感染。但 HIV-1 核酸阴性，提示为精英控制者、或使用预防性或治疗性抗病毒药物	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗。注意排除 HIV-1 疫苗接种和输入性抗体的可能性
3	抗体有反应或抗原抗体有反应	阴性或未检出	HIV-2 阳性	HIV-2 抗体确证阳性，提示 HIV-2 感染	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗
4	抗体有反应或抗原抗体有反应	阴性或未检出	HIV-1 不确定或阴性	HIV-1 抗体确证不确定或阴性、HIV-1 核酸阴性，提示抗体或抗原抗体检测假阳性，未感染 HIV	如怀疑急性期感染，或近期使用过抗病毒药物，可 2-4 周后随访检测以确认 HIV-1 感染
5	抗体有反应或抗原抗体有反应	阴性或未检出	HIV-2 不确定或阴性	HIV-2 抗体确证不确定或阴性、HIV-1 核酸阴性，提示未感染 HIV-1，HIV-2 感染待确认	可使用另一种 HIV-2 抗体确证试剂或 HIV-2 核酸检测试剂进行检测，或者 2-4 周后随访检测，以确认 HIV-2 感染
6	仅抗原有反应	阳性或检出	N/A	HIV-1 p24 抗原阳性、HIV-1 核酸阳性，提示 HIV-1 急性期感染	如确诊感染，做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗
7	仅抗原有反应	阴性或未检出	N/A	HIV-1 p24 抗原阳性、HIV-1 核酸阴性，提示抗原检测假阳性	如怀疑急性期感染，或近期使用过抗病毒药物，可 2-4 周后随访检测以确认 HIV-1 感染

表 4-2 首选 HIV 抗体确证试验进行补充检测的结果解读和建议

序号	检测结果			结果解读	建议
	筛查检测	补充检测 1	补充检测 2		
	HIV 抗原抗体或抗体检测	HIV 抗体确证试验	HIV-1 核酸试验		
1	抗体有反应或抗原抗体有反应	HIV-1 阳性	N/A	HIV-1 抗体确证阳性，提示 HIV-1 感染	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗。注意排除 HIV-1 疫苗接种和输入性抗体的可能性
2	抗体有反应或抗原抗体有反应	HIV-2 阳性	N/A	HIV-2 抗体确证阳性，提示 HIV-2 感染	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗
3	抗体有反应或抗原抗体有反应	HIV-1 阳性 HIV-2 阳性	N/A	HIV-1 和 HIV-2 抗体确证阳性，提示 HIV-1 和 HIV-2 感染	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗。可进行 HIV-1/2 核酸检测，以确认是否存在 HIV-1/2 合并感染
4	抗体有反应或抗原抗体有反应	HIV-1 不确定或阴性	阴性或未检出	HIV-1 抗体确证不确定或阴性、HIV-1 核酸阴性，提示抗体或抗原抗体检测假阳性，未感染 HIV-1	孕妇人群较易出现这种检测结果，通常为免疫学检测假阳性，需结合流行病学史排除感染；如怀疑急性期感染，或近期使用过抗病毒药物，可 2-4 周后随访检测
5	抗体有反应或抗原抗体有反应	HIV-2 不确定或阴性	阴性或未检出	HIV-2 抗体确证不确定或阴性，HIV-1 核酸阴性，提示未感染 HIV-1，HIV-2 感染待确认	可使用另一种 HIV-2 抗体确证试剂或 HIV-2 核酸检测试剂进行检测，或者 2-4 周后随访检测，以确认 HIV-2 感染
6	抗体有反应或抗原抗体有反应	HIV-1 不确定或阴性 HIV-2 不确定或阴性	阳性或检出	HIV-1/2 抗体或 HIV-1 p24 抗原阳性、HIV-1 核酸阳性，提示 HIV-1 急性期感染，也可能为晚期感染	如确诊感染，应做好检测后咨询和疫情报告，尽早启动治疗。可通过 CD4 ⁺ T 淋巴细胞检测辅助判断感染时期

3. 婴儿早期诊断相关的检测流程及结果报告

艾滋病感染孕产妇所生儿童应于出生后 48 小时内、6 周和 3 个月时，分别采集血液样本，进行婴儿艾滋病感染早期诊断检测。两次核酸检测结果均为阳性，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，筛查结果为阴

性，排除 HIV 感染；筛查结果为阳性，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的艾滋病早期诊断与抗体检测服务流程见图 4-8。

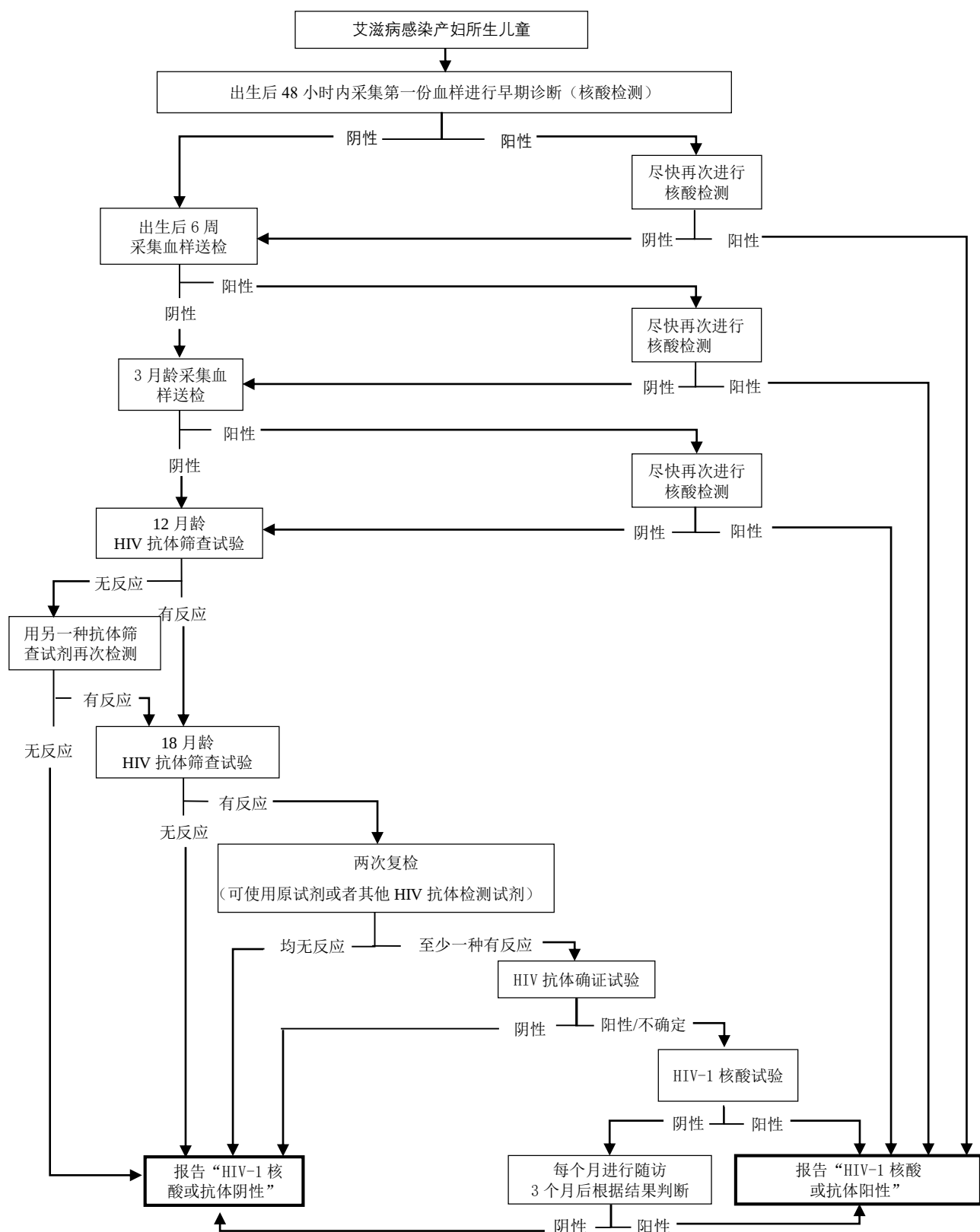


图 4-8 艾滋病感染孕产妇所生儿童的艾滋病早期诊断检测流程

4. 血液筛查相关的检测流程及结果报告

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。

4.1 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-1 p24 抗原（HIV-1/2 Ag/Ab）；核酸标志物主要为 HIV-1 核酸（HIV-1 RNA），或者为 HIV-1/2 核酸（HIV-1/2 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 4-9 执行。

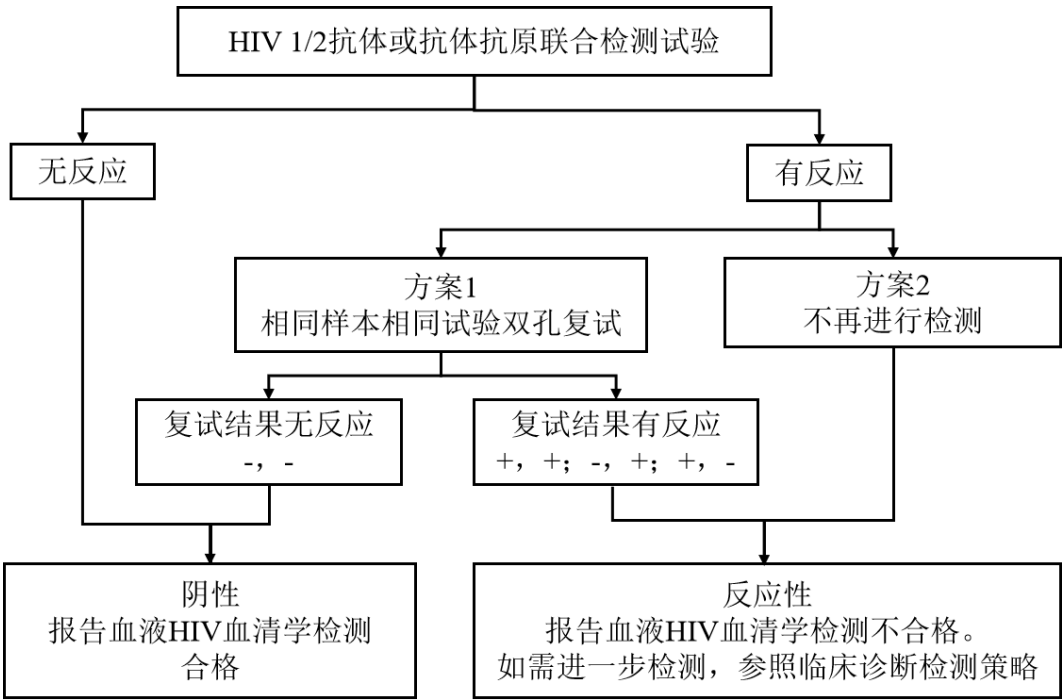


图 4-9 HIV 血液筛查血清学检测试验流程

HIV 血液筛查核酸检测试验流程程序和结果判定规则参照图 4-10 执行。

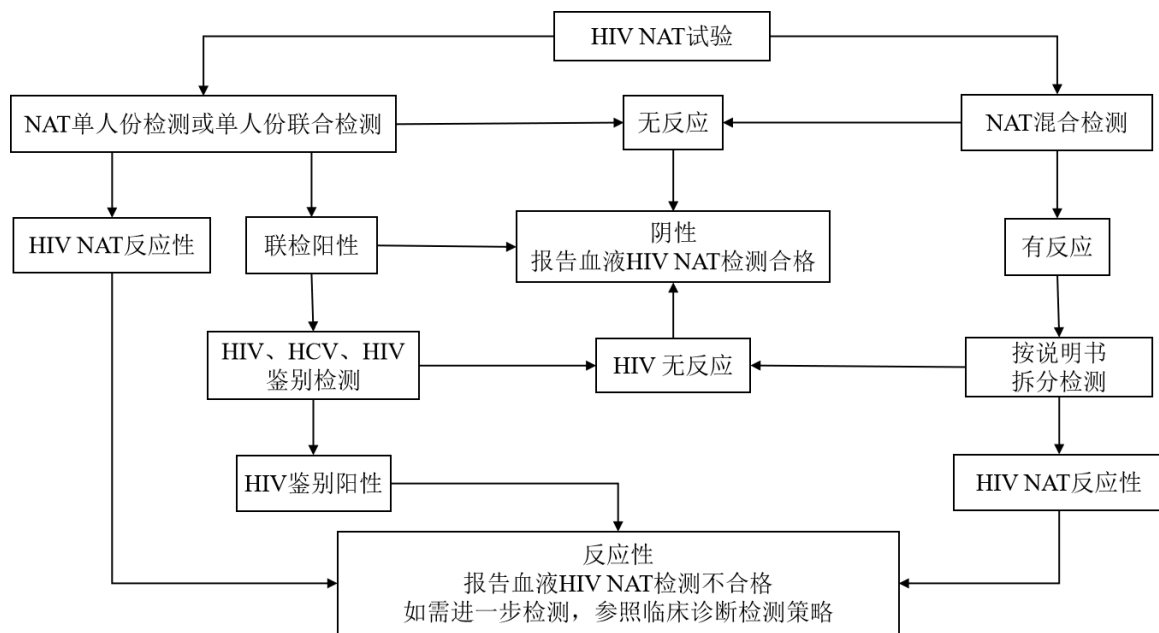


图 4-10 HIV 血液筛查核酸检测试验流程

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。两种检测方法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 4-11 执行。

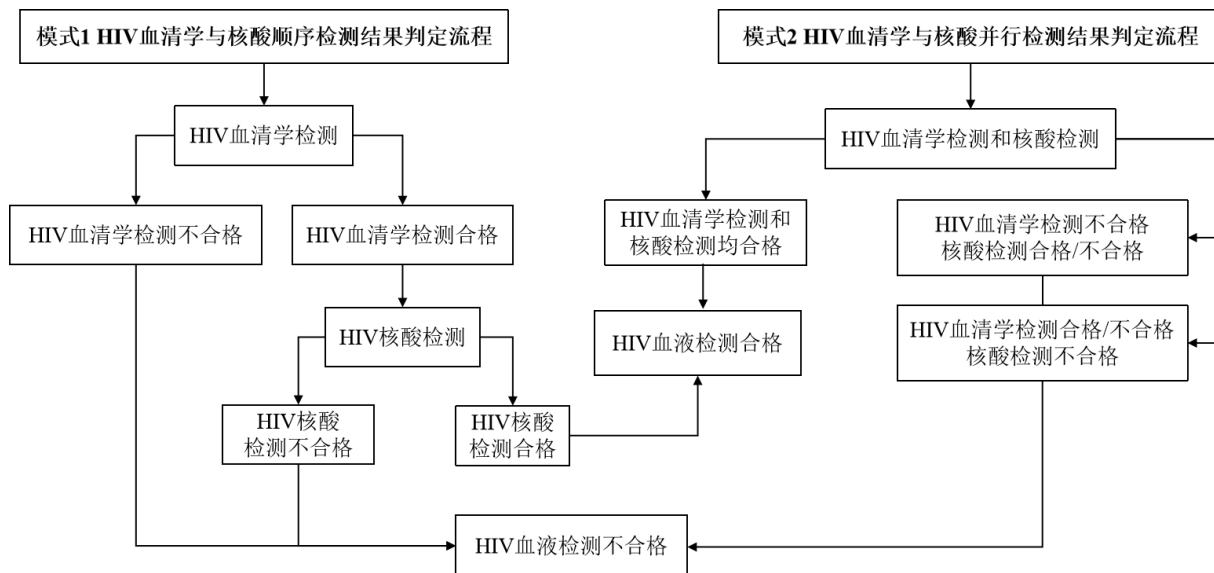


图 4-11 HIV 血液筛查血清学和核酸顺序检测和并行检测试验流程

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。

4.2 供血浆者和血浆产品 HIV 检测策略及结果报告

供血浆者及其血浆产品的 HIV 血清学检测，按照 4.1 血液筛查血清学检测流程（图 4-9）进行。供血浆者及其血浆产品如需进行 HIV 核酸检测，则按照 4.1 血液筛查核酸检测流程（图 4-10）进行。HIV 血清学和/或 HIV 核酸检测呈反应性的样本，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。

5. 艾滋病自我采样传递检测

自我采样传递检测是由需要检测的个体获取自我采样服务包，根据说明书独立完成样本（尿液或干血斑）的采集制备后，将其通过邮寄或放回样本回收箱等方式传递至专业检测机构，由专业人员完成检测，自我采样者可通过在线平台、电话、电子邮件等方式匿名查询检测结果、并获得专业机构提供的咨询和转介服务的一种筛查检测模式。这种检测方式不仅保护了个体隐私，还能提高检测的可及性和便利性，促进主动检测。艾滋病自我采样传递检测检测流程见图 4-12。

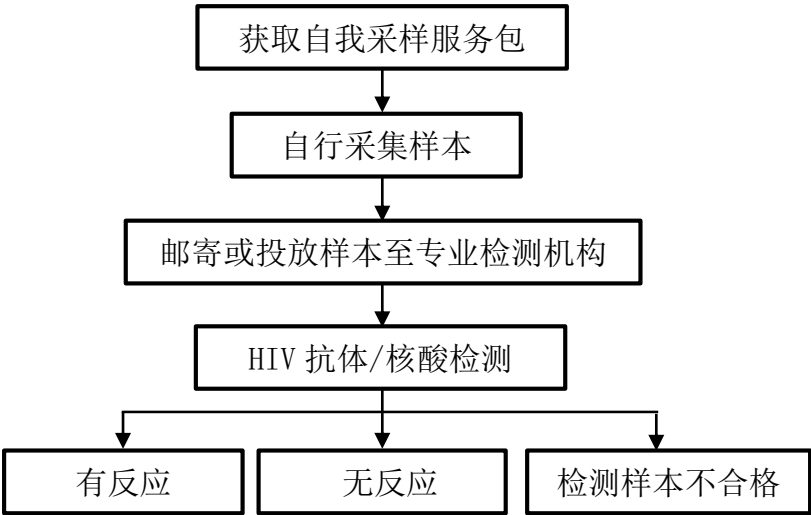


图 4-12 艾滋病自我采样传递检测流程

主要步骤包括：

(1) 获取自我采样服务包：个人可以通过在线订购、药店购买、自动售货机、社区小组或医疗卫生机构领取自我采样服务包。服务包内通常包括详细的操作说明、采样器具（如指尖采血针和滤纸片、尿液采集器等）、样本容器和回寄包装。

(2) 自行采集样本：个人在家中或任何私密环境中，按照服务包内的操作说明进行自我采样。常见的采样方法包括采指尖血制备干血斑或采集尿液。其采集过程简单、且不需要专业的医疗知识。

(3) 传递样本：将采集好的样本通过邮寄或投放到指定的样本回收箱等方式送至指定的专业检测机构。

(4) 实验室检测：样本被送至实验室，由专业人员进行检测。自我采样传递检测的主要检测方式包括：

a. 尿液 HIV 抗体检测：尿液 HIV 抗体检测使用国家市场监督管理总局批准的适用于尿液样本的酶联免疫吸附试验试剂，通过检测尿液中的 HIV 抗体初步判断是否感染 HIV。尿液 HIV 抗体检测具有无创和安全的特点。

b. 干血斑 HIV 核酸检测：干血斑 HIV 核酸检测使用国家市场监督管理总局批准的适用于干血斑样本的 HIV 核酸定性检测试剂。如用于公共卫生项目对高风险人群的扩大筛查检测，也可使用实验室自建的 HIV 核酸检测方法。干血斑 HIV 核酸检测具有高灵敏性和高特异性，应用于艾滋病感染高风险人群可筛查出更多 HIV 急性期感染者。

(5) 结果解读和建议：若抗体或核酸检测结果有反应，提示个体可能感染了 HIV，应为个体提供自愿咨询检测机构的相关信息，引导其尽快到当地的疾病预防控制中心或医院等专业机构进行确认。若检测结果无反应，提示可能尚未感染 HIV。但若近期有 HIV 感染高风险行为，不能排除窗口期感染，建议 2-4 周后重新采样送检。若检测样本不合格，建议立刻重新采样送检。

(6) 获取结果：检测结果和建议会通过安全保密的方式传递给个人。常见的结果传递方式包括电话通知、短信通知、电子邮件或通过在线平台查询。有些服务还提供专业的咨询支持，帮助个人理解检测结果并提供后续建议和资源。

6. 疫情监测相关的检测流程

6.1 HIV 匿名无关联检测流程

使用 HIV 匿名无关联检测流程时，先用具有高灵敏性的试剂 1 进行初筛试验，如无反应，则报告“HIV 抗体阴性”，不再进行复检试验；如有反应，则进入复检试验。

所有初筛检测有反应的样本，使用具有高特异性的试剂 2 进行复检，如无反应，则报告“HIV 抗体阴性”；如有反应，则报告“HIV 抗体阳性”。用于疫情监测的检测流程见图 4-13。

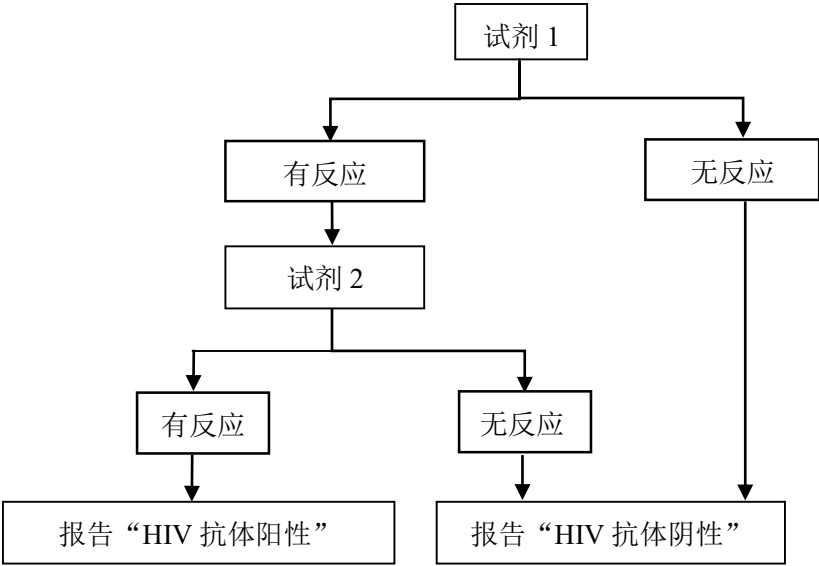


图 4-13 HIV 匿名无关联检测流程

6.2 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。

参考文献

[1] Centers for Disease Control and Prevention. Technical Update for HIV Nucleic Acid Tests Approved for Diagnostic Purposes[M]. USA: CDC, 2023.

[2] Association of Public Health Laboratories. Use and Interpretation of Quantitative HIV-1 RNA Test Results: Guidance for Laboratories[M]. USA: APHL, 2021.

[3] Association of Public Health Laboratories. Suggested Reporting Language for the HIV

- Laboratory Diagnostic Testing Algorithm[M]. USA: APHL, 2019.
- [4] World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV testing services[M]. Geneva: WHO, 2019.
- [5] World Health Organization. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030[M]. Geneva: WHO, 2022.
- [6] World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV, viral hepatitis and STI prevention, diagnosis, treatment and care for key populations[M]. Geneva: WHO, 2022.
- [7] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组, 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南(2024版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2024, 17(3): 161-190.
- [8] 韩孟杰, 金聪, 李敬云, 等. 扩大艾滋病检测促进早检测专家共识[J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27(11): 1202-1206.
- [9] 金聪, 张鑫, 刘静, 等. 艾滋病检测技术不断创新推动发展高质量检测服务[J]. 中国艾滋病性病, 2023, 29(4): 367-371.
- [10] 张秋月, 张路坤, 何云. 急性 HIV 感染诊疗管理专家共识(2025版)[J]. 中国艾滋病性病, 2025, 31(03): 226-235.
- [11] 吕玮, 蔡卫平, 陈耀凯, 等. 晚发现艾滋病病毒感染临床管理专家共识[J]. 中国艾滋病性病, 2024, 30(7): 670-682.
- [12] 田文, 王晓楠, 安明晖, 等. HIV 急性/早期感染者队列低病毒载量分布及对 HIV 核酸诊断的影响[J]. 中国艾滋病性病, 2020, 26(5): 5.
- [13] LI L, FENG X, ZHAO F, et al. Real-world performance of HIV low viral load values in diagnosing acute HIV infection in a tertiary care hospital in Beijing, China[J]. BMC Infect Dis, 2024, 24(1): 587.
- [14] ZHANG X, NING TL, YAO J, et al. Improper use of TDF/FTC PrEP leading to acute HIV infection with low-level viremia and transient K70KR mutation: diagnostic challenges and drug resistance dynamics[J]. Virol J. (网络预发表)
- [15] 袁丹, 叶黎, 李一平, 等. 四川省 HIV 抗体确证阴性和不确定样本核酸检测结果分析[J]. 中国艾滋病性病, 2024, 30(06): 646-648.
- [16] World Health Organization. Guidelines for HIV post-exposure prophylaxis[M]. Geneva: WHO, 2024.

- [17]张路坤, 王辉. 中国 HIV 暴露前预防用药专家共识 (2023 版) [J]. 中国艾滋病性病, 2023, 29(09): 954-961.
- [18]World Health Organization. WHO recommends HIV self-testing: evidence update and considerations for success: policy brief[M]. Geneva: WHO, 2019.
- [19]中国疾病预防控制中心. 自我采样传递检测艾滋病指导手册(2018 年版)[Z]. 2018.
- [20]中国疾病预防控制中心. 艾滋病自我检测指导手册 (第一版) [Z]. 2019.

第五章 基于抗体的 HIV-1 新近感染检测

1. 范围

本章规定了基于抗体的 HIV-1 新近感染检测的意义、检测样本要求、检测方法和程序、质量控制、结果解释以及新发感染率估算应用。

2. HIV-1 新近感染检测的意义

HIV-1 新近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 新近感染检测可用于估计国家和地区的 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，HIV-1 新近感染检测还可用于评估干预措施的效果、发现新近感染集中的人群和地区、以及指导对新近感染者进行追踪检测等防控工作。

3. HIV-1 新近感染检测的样本类型和要求

来源于哨点监测、病例报告或研究项目的新诊断感染者的 HIV-1 抗体阳性样本，样本类型为血清、血浆、干血斑。样本要求清亮、无严重溶血。样本在 2~8℃ 储存应不超过 1 周，超过 1 周以上应保存在 -20℃ 或以下，反复冻融次数不多于三次。

3.1 样本的入选标准和排除标准

3.1.1 入选标准

新诊断 HIV-1 感染者的抗体阳性血清、血浆、干血斑样本。

3.1.2 排除标准

艾滋病病人的样本，以及接受过抗病毒药物治疗的 HIV 感染者样本。

4. HIV-1 新近感染检测的原理和检测方法

世界卫生组织在 HIV-1 新近感染检测指南中对 HIV 新近感染的定义是抗体阳转后 1 年之内。HIV-1 新近感染检测可利用生物标志物随感染时间的变化规律建立检测实验。最初的 HIV-1 新近感染检测利用 HIV 抗体滴度在阳转后增加的规律、病毒特异性抗体占总抗体比例等。早年应用较广的 BED 捕获酶联免疫实验（BED-CEIA）通过检测与 HIV 的 B、E、D 亚型 gp41 抗原优势表位（Immunodominant Epitope, IDE）结合 IgG 占总 IgG 的比例判定新近感染。但由于抗体水平受个体差异影响较

大、以及容易受到艾滋晚期免疫抑制和抗逆转录病毒治疗的影响，BED-CEIA 将长期感染误判为新近感染的假新近感染错判率（False Recent Rate, FRR）较高，在 5-8%，后来逐渐停用。

目前国内外广泛应用的 HIV-1 限制性抗原亲和力酶联免疫方法（HIV-1 Limited Ag-Avidity Enzyme Immunoassay, LAg-Avidity EIA），基于人体感染 HIV 后产生的特异性抗体与抗原结合的亲和力随感染时间而增加的原理，通过检测抗体与 gp41 抗原免疫优势多肽（rIDR-M）的亲和力高低判定新近感染。LAg-Avidity EIA 的假新近感染错判率在 2-5%，判定新近感染的平均持续时间（mean duration of recent infection, MDRI）约为 3 个月。LAg-Avidity EIA 可受到 HIV 亚型、艾滋晚期免疫抑制、以及抗逆转录病毒治疗的影响，但与 BED-CEIA 方法相比受到的影响较小。

近年来出现的基于抗体亲和力检测的 HIV-1 新近感染快速检测方法，与 HIV-1 限制性抗原亲和力酶联免疫方法相比，假新近感染错判率（False Recent Rate, FRR）略高，但操作简便、可快速获得结果，不需要检测设备，适合应用于现场检测。

需要注意的是，由于抗体亲和力的成熟具有个体差异性，HIV-1 新近感染检测仅在人群水平应用于新发疫情监测和评估，不能应用于个体诊断。

5. HIV-1 新近感染检测的程序和操作要点

HIV-1 新近感染检测实验的操作、结果处理和解释以试剂盒说明书为准。

操作要点包括：

（1）用于新近感染检测的样本应清亮、无严重溶血，反复冻融次数不多于三次。检测之前样本应完全融化并充分混匀。

（2）进行检测实验室时，实验室温度应为 18~25 °C。

（3）当同一份样本的初筛和确认实验的 OD_n 值相差较大、一致性较差，需进行三孔复检，以两次一致性较好的结果为最终结果。

（4）HIV-1 新近感染酶联免疫检测试剂盒中带有阴性对照、弱阳性对照、强阳性对照和校准品。每次检测的 OD 值和 OD_n 值均需规定的质控范围内，否则视为无效，须重新进行检测。

（5）HIV-1 新近感染快速检测试剂包含质控线（C 线），每次检测时，质控线均应出现，否则视为无效，需重新进行检测。

6. 结果解读

6.1 HIV-1 新近感染酶联免疫检测结果解读

6.1.1 初筛试验：

样本进行单孔检测。

- 当样本的 ODn 值 > 2.0 时，该样本判为长期感染样本，不需进行确认试验；
- 当 ODn 值 ≤ 2.0 时，该样本需进行确认试验。

6.1.2 确认试验：

初筛试验中 ODn 值 ≤ 2.0 的样本应进行三孔重复检测。

- 如果样本 $0.4 \leq ODn \leq 1.5$ ，该样本判为新近感染样本；
- 如果样本 $ODn > 1.5$ ，该样本判为长期感染样本；
- 如果样本 $ODn < 0.4$ ，则需进一步确认该样本是否为 HIV-1 阳性样本。若检测结果为阴性，该样本判为 HIV-1 阴性样本，若检测结果为阳性，该样本判为 HIV-1 新近感染样本。

6.2 HIV-1 新近感染快速检测结果解读

HIV-1 新近感染快速检测试剂包含质控线（C 线）、筛查线（T 线）以及长期线（LT 线）。

- 如果只出现质控线，该样本为 HIV-1 阴性样本；
- 如果同时出现质控线和筛查线，该样本为 HIV-1 阳性样本并且为新近感染；
- 如果质控线、筛查线和长期线均出现，该样本为 HIV-1 阳性样本并且为长期感染。

7. 检测结果的应用

7.1 估算新发感染率

可应用世卫组织推荐的公式估算基于横断面的新发感染率：

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

I: HIV 新发感染率

R: 通过 HIV 新发感染检测实验判定为新近感染的人数

P: 调查中 HIV 检测阳性人数（剔除已知既往阳性病例）

N: 调查中 HIV 检测阴性人数

FRR: 新近感染检测实验的错判率，即长期感染被误判为新近感染的比例

ω: 以天为单位的新近感染检测窗口期

如果只有部分 HIV-1 抗体阳性的样本完成了新近感染检测，即进行新近感染检测的有效样本数减少，则需要根据完成新近感染检测的 HIV-1 抗体阳性样本数调整 HIV 阴性数之后 ($N' = N \times P'/P$)，再进行新发感染率估算。

7.2 使用新近感染综合判定算法 (RITA) 更加准确地判定新近感染

由于 HIV-1 新近感染检测方法可能受到抗病毒治疗、感染晚期的免疫抑制、以及精英控制者等因素影响，使部分长期感染样本被误判为新近感染。为了减少 HIV-1 新近感染错判率，提高 HIV-1 新近感染检测的准确性，近年来世界卫生组织推荐使用 HIV-1 新近感染检测综合判定算法 (Recent Infection Testing Algorithm, RITA)，结合多项检测结果，比如病毒载量和 CD4⁺ T 淋巴细胞计数，进行综合判断。

在 RITA 判定流程中，如样本的 HIV-1 新近感染检测结果显示为新近感染时，需进一步结合其他指标进行综合判断，包括但不限于：

- 如样本的 HIV-1 病毒载量 < 1000 拷贝/mL，提示可能为接受抗病毒治疗后的病毒抑制或精英控制者自身免疫系统对病毒的抑制，应将样本判定为长期感染样本；

- 如样本的 CD4⁺ T 淋巴细胞计数 < 200 cells /μL，提示可能进入感染晚期，应将样本判定为长期感染样本。

使用 RITA 判定流程有助于更加准确地判定 HIV-1 新近感染，从而提升 HIV 新发感染率估算的准确性，也为识别新近感染热点人群和热点地区、评估干预效果、指导精准防控、优化资源配置等工作提供数据支持。

参考文献

- [1] World Health Organization. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level[M]. Geneva: World Health Organization, 2011: 1-44.

- [2] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, World Health Organization. Using Recency Assays for HIV Surveillance: 2022 Technical Guidance[M]. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and the World Health Organization, 2022.
- [3] DUONG YT, QIU M, DE AK, et al. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: potential for HIV-1 incidence estimates and avidity maturation studies[J]. PLoS One, 2012,7(3): e33328.
- [4] DUONG Y T, QIU M, DE AK, et al. Recalibration of the Limiting Antigen Avidity EIA to Determine Mean Duration of Recent Infection in Divergent HIV-1 Subtypes[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0114947.
- [5] 刘平, 刘静, 程焕义, 等. 2016-2021 年我国 HIV-1 亲和力新发感染检测实验室能力验证考核结果分析[J].中国艾滋病性病, 2022, 28(04): 397-401.
- [6] GRANADE TC , NGUYEN S , KUEHL DS ,et al. Development of a novel rapid HIV test for simultaneous detection of recent or long-term HIV type 1 infection using a single testing device.[J]. Aids Research & Human Retroviruses, 2013, 29(1): 61-67.
- [7] YUFENYUY EL , DETORIO M, DOBBS T, et al. Performance evaluation of the Asante Rapid Recency Assay for verification of HIV diagnosis and detection of recent HIV-1 infections: Implications for epidemic control[J]. PLOS Global Public Health, 2022, 2.
- [8] ZHU Q, WANG Y, LIU J, et al. Identifying major drivers of incident HIV infection using recent infection testing algorithms (RITAs) to precisely inform targeted prevention[J]. Int J Infect Dis, 2020, 101: 131-137.
- [9] KARATZAS-DELGADO EF, RUIZ-GONZALEZ V, GARCIA-CISNEROS S, et al. Evaluation of an HIV recent infection testing algorithm with serological assays among men who have sex with men in Mexico[J]. J Infect Public Health, 2020, 13(4): 509-513.
- [10]TORRES TS, TEIXEIRA S, HOAGLAND B, et al. Recent HIV infection and annualized HIV incidence rates among sexual and gender minorities in Brazil and Peru (ImPrEP seroincidence study): a cross-sectional, multicenter study[J]. Lancet Reg Health Am, 2023, 28: 100642.
- [11]ZHU Q , JIKE C , XU C, et al.A New Strategy to Quantitatively Identify Hot-Spot Areas in Growth of New HIV Infections for Targeted Interventions[J].Frontiers in

Public Health, 2021, 9: 680867.

- [12] YANG H, LI Y, XU M, et al. The Update of HIV-1 Prevalence and Incidence and Spatio-Temporal Analyses of HIV Recent Infection Among Four Sub-Groups in Sichuan, China During Surveillance Period Between 2016 and 2022[J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 6535-6548.
- [13] 王译葵, 刘平, 刘静, 等. 应用 HIV 感染的常规检测指标辅助判定新发感染的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2020, 34(6): 6.

第六章 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、检测程序以及结果解读，适用于从事相关工作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 淋巴细胞计数检测是了解艾滋病患者免疫状态、疾病进展、确定疾病分期、判断治疗效果的重要指标。

2.2 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 淋巴细胞数量可评估艾滋病患者机会性感染的风险，辅助判断是否需进行预防性治疗。

2.3 免疫重建监测。CD4⁺ T 淋巴细胞数量和 CD4⁺ / CD8⁺ T 淋巴细胞比值是抗病毒治疗后免疫功能重建的重要指标，可判断免疫系统恢复情况，辅助指导优化临床治疗方案。

3. CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞检测的样本类型和要求

CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞计数检测均使用抗凝全血样本。

3.1 样本采集

3.1.1 选择合适的抗凝剂，用于血液学检测的抗凝剂：K₂EDTA 或 K₃EDTA；用于流式细胞仪免疫表型检测的抗凝剂：K₂EDTA、K₃EDTA、酸性枸橼酸葡萄糖溶液（ACD）或肝素。

3.1.2 抗凝管的准备和标记，选择含有抗凝剂的采血管（2 mL 或 5 mL）作为血样采集管。采血量应达到但不超过抗凝管容积的水平，以保证抗凝剂的最终有效浓度。尽可能采用真空管，避免使用注射器采集血样。在采血管上应标明样本编码、采集日期等信息。

3.1.3 采集静脉血，成人采集 5 mL，儿童采集 2 mL，婴儿样本采集较为困难，可用小采样管采集 0.5-1 mL。所有血样应立刻注入事先加入适当抗凝剂的采血管。采血后立即握住试管两端，轻轻垂直来回颠倒 6~8 次，使血液与抗凝剂充分混匀，防止血液凝固。

3.2 样本运输

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。

3.3 样本接收和处理

3.3.1 溶血、凝血或结冰的样本应视为不合格样本，需重新采样。

3.3.2 当样本运输过程中温度超出 18~25℃温度时，若样本没有明显的溶血或结冰，可以处理样本，但不可加热或冷冻样本使其达到室温范围（18~25℃），否则会影响免疫表型检测结果。

3.3.3 用于 CD4⁺ T 淋巴细胞检测的全血应保存在室温，在 48 小时之内完成检测。如果用 CD45 设门，则可延长至 72 小时内完成检测。超过检测允许时间的样本不可检测。

4. CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞检测的方法和程序

目前，CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞计数的方法主要包括流式细胞仪测定法和 POCT 细胞计数法。

4.1 流式细胞仪检测

4.1.1 检测方法

流式细胞仪是以激光作为发射光源，对荧光染色的细胞或者微粒进行检测。通常荧光染色的细胞在一定压力作用下，进入流式细胞仪的流动室，鞘液包裹着待检细胞高速流动，待检细胞排列成单行依次通过流式细胞仪的检测区域。荧光染色的细胞在激光束照射下产生散射光和激发荧光。散射光中前向散射（Forward Scatter, FSC）信号反映细胞体积的大小，侧向散射（Side Scatter, SSC）信号反映细胞结构信息，荧光信号表示所检测细胞表面抗原或细胞内物质，其强弱表明细胞表面抗原强度或细胞内物质浓度。

CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞计数的流式细胞仪检测方法分为双平台法和单平台法。

（1）双平台法是一种用于细胞群体绝对计数的方法。该方法首先使用血球计数仪检测淋巴细胞数量，再根据流式细胞仪获得的 T 细胞亚群百分比，计算得出每微升的全血中该亚群淋巴细胞的绝对数量。由于需要整合两种仪器（血球计数仪和流式细胞仪）的数据，且仪器存在系统误差，导致结果的重复性和准确性受多种因素影响。

在 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞计数应用中，不同实验室间的结果差异往往较大。该方法主要局限在于操作步骤繁琐，人力需求高且耗时，因此难以将变异系数降至最低。

(2) 单平台法是相对双平台法而言的，单平台法仅需使用流式细胞仪。其核心原理是在单次流式检测中，通过引入内部参照标准来直接计算目标细胞的绝对数量。最常用的方式是使用已知浓度的荧光标记绝对计数微球（内参微球）：这些微球在样本制备时被精确加入待测血样中，与细胞混合。在流式获取过程中，仪器同时记录通过检测区域的目标细胞（如 CD4⁺ T 淋巴细胞）数量和微球数量。根据目标细胞数量与微球数量的比值，再乘以微球已知的浓度（个/ μ L），即可直接计算出每微升全血中目标细胞的绝对数量。替代方法是体积法，其依赖于流式细胞仪高精度的流体控制系统，通过精确控制并测量通过检测器的样本体积，直接统计该固定体积内的目标细胞数，进而换算得到单位体积浓度。该技术的核心优势在于消除了双平台法因使用不同仪器而产生的系统误差，所有关键步骤（染色、获取、计算）均在单台仪器内完成，并利用内参微球或精确体积对操作变异进行校正，从而显著提高了绝对计数结果的重复性和准确性。

4.1.2 流式细胞仪检测程序

(1) 试剂准备：利用不同荧光染料标记的 CD45、CD3、CD4、CD8 等特异性抗体，对不同的细胞进行染色。其中，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 淋巴细胞）和单核细胞；CD8 表达于细胞毒性 T 细胞（CD8⁺ T 淋巴细胞）和单核细胞。实验前，需将上述荧光标记抗体试剂于室温避光平衡 20 分钟。

(2) 仪器准备：打开设备预热，并调试到检测条件。

(3) 样本制备：按照试剂盒说明书的要求进行样本的制备和荧光标记抗体的孵育。

(4) 上机检测：根据不同流式细胞仪的要求对制备好的样本进行检测，完成检测后输出或打印检测结果。

(5) 冲洗仪器：每次完成检测后，需按照要求做好仪器的维护和保养。

4.2 POCT 细胞计数仪检测

4.2.1 检测方法

目前 CD4⁺T 淋巴细胞计数 POCT 检测方法主要基于荧光免疫成像技术，其原理为不同荧光染料标记的 CD3 和 CD4 特异性抗体与样本中的细胞表面抗原结合，仪器通过集成的光学成像系统和专用分析软件，自动识别并计算样本中 CD4⁺T 淋巴细胞的绝对数量（个/ μ L）及其百分比。POCT 检测方法支持指尖血样本检测，避免了样本运输，可在实验室或非实验室环境（如基层诊所、现场）实现全自动操作，提升了基层 CD4⁺T 淋巴细胞检测的可及性和便捷性。

4.2.2 检测程序

（1）仪器准备：样本检测前仪器必须开机进行仪器自检或标准板检测，应自检通过或标准板检测合格。

（2）试剂准备：从包装袋中取出 CD4 检测板，将样本采集器完全暴露，样本加入检测板过程中应佩戴无粉手套，以避免粉尘对检测造成干扰。

（3）样本准备：样本可使用指尖血、无任何处理的静脉全血及 EDTA 抗凝全血，样本无需预处理。指尖血及不使用任何抗凝剂收集的静脉血应即采即做。EDTA 抗凝全血应在室温保存，保存时间不超过 36 小时，使用前应混匀。

（4）加入样本：加样时应以 45 度角手持检测板。使用指尖血检测时，须使血液顺畅地从穿刺手指直接流入样本采集器，待采集器毛细管完全注满血液后，将检测板从手指移开。使用静脉全血检测时，移液器吸取样本后须将枪头插入样本采集器加入样本，为防止出现气泡勿反向加样。加样后，直立检测板，观察控制窗以保证加载入足量样品，如果从控制窗中看到毛细管注满血液，表示加样量足够。

（5）完成检测：加入血液样本后，应在 1 分钟内将检测板插入仪器检测位进行检测。

（6）处理样本：检测完成后，根据屏幕提示取出检测板，用过的检测板应作为生物垃圾安全处理。测试结果可立即输出或打印。

5. 结果解释和报告

5.1 双平台法用淋巴细胞总数（来自于血球计数仪检测血液中的白细胞及分类） $\times$ 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。

5.2 单平台法应客观体现分析软件的结果，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。

5.3 原始实验记录中应记录仪器设备、分析软件、主要荧光素标记抗体的相关信息, 并应包括样本唯一识别号、样本类型(必要时注明抗凝剂类型)、采集时间、接收时间、报告时间等。

5.4 检测结果报告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比)。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。参考范围可参考产品说明书或文献资料, 在参考范围验证的基础上应用。按照实验结果填写 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞检测报告, 单平台法检测结果报告格式参见附表 5。如有其他可能影响检验结果的相关信息(如特殊治疗或样本状态)应予以备注。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准: WS 293-2019[S]. 北京, 2019.
- [2] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组. 艾滋病免疫功能重建不全者临床诊疗专家共识(2023 版)[J]. 中华传染病杂志, 2024, 42(01): 3-13.
- [3] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组, 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南(2024 版) [J]. 中华临床感染病杂志, 2024, 17(3): 161-190.
- [4] SERRANO-VILLAR S, MARTINEZ-SANZ J, RON R, et al. Effects of first-line antiretroviral therapy on the CD4/CD8 ratio and CD8 cell counts in CoRIS: a prospective multicentre cohort study[J]. Lancet HIV, 2020, 7(8): e565-e573.
- [5] MA J, WANG G, ZHU X, et al. Combining CD4 count, CD8 count and CD4/CD8 ratio to predict risk of mortality among HIV-positive adults after therapy: a group-based multi-trajectory analysis[J]. Front Immunol. 2023, 14: 1269650.
- [6] World Health Organization. Consolidated Guidelines on HIV Prevention, Testing, Treatment, Service Delivery and Monitoring: Recommendations for a Public Health Approach[M]. Geneva: WHO, 2021.
- [7] 中国中西医结合学会检验医学专业委员会. 流式细胞术临床检验图文报告书写

- 专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(07): 729-739.
- [8] 国家医学检验临床医学研究中心, 中华医学会检验医学分会, 国家卫生健康委临床检验中心,等. 流式细胞术的临床应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(08): 792-801.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南: WS/T 360-2024[S]. 北京, 2024.
- [10] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测实验室质量控制指南[Z]. 2024.

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、程序、结果解释和报告，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 个体在抗病毒治疗前进行耐药检测，可辅助临床医生制定有效的抗病毒治疗方案，确保治疗效果。在抗病毒治疗过程中，如出现病毒学失败或治疗效果不佳，进行基因型耐药检测，可帮助临床医生分析治疗失败原因，为调整治疗方案提供依据。对新诊断的 18 个月龄以下婴幼儿进行基因型耐药检测，分析其 HIV 耐药情况，为制定一线和二线婴幼儿抗病毒治疗方案提供参考。

2.2 群体耐药监测

2.2.1 治疗前耐药（Pretreatment Drug Resistance, PDR）监测

在开始抗病毒治疗前，对从未服用抗病毒药物者、曾服用抗病毒药物者（如暴露前/后预防者、母婴阻断的母亲）进行基因型耐药检测，了解其耐药情况，可为制定一线治疗和暴露预防用药方案提供参考依据。

2.2.2 传播性耐药（Transmitted Drug Resistance, TDR）监测

了解 HIV 耐药毒株在人群中的传播情况，有助于制定防控耐药传播的有效措施，遏制 HIV 耐药毒株在人群中的扩散，提高整体防控效果。

2.2.3 获得性耐药（Acquired Drug Resistance, ADR）监测

了解耐药突变的类型、比例、模式和趋势，分析耐药发生的影响因素，为制定二线治疗方案和减少耐药发生的措施提供参考，指导公共卫生抗病毒治疗模式的持续优化，提升治疗效果。

3. HIV-1 基因型耐药检测的样本类型和要求

用于 HIV-1 基因型耐药检测的样品类型可以是全血、血浆、淋巴细胞富集液、外周血单个核细胞（PBMC）和滤纸片干血斑（Dried Blood Spot, DBS）。通常 RNA 耐药检测以血浆为首选样本，DNA 耐药检测以全血为首选样本。

4. HIV-1 基因型耐药检测的方法和程序

4.1 检测原理

常规 HIV-1 基因型耐药检测通过 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信息，经与野生型毒株及已知耐药毒株的比对，解析耐药相关基因突变。基于基因型耐药解释系统（如斯坦福大学艾滋病毒耐药数据库），通过突变位点所对应的耐药评分判定耐药水平（包括耐药与否及程度分级）。对于低病毒载量的患者，其血浆游离的 HIV-1 RNA 水平过低从而导致耐药检测时扩增效率偏低，国际抗病毒学会、欧洲艾滋病学会以及美国卫生与公众服务部推荐采用前病毒 DNA 扩增目的基因片段。需要注意的是此类检测可能会漏掉部分或全部既有耐药性突变，结果解读应结合患者治疗史、病毒抑制状态等临床信息进行综合分析。

4.2 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。

4.2.1 商品化试剂盒

通常要求使用血浆样本、病毒载量大于 2000 拷贝/mL。扩增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）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。

4.2.2 实验室自建（In-house）方法

通常采用巢式 PCR 技术进行两轮靶基因扩增后测序。该方法要求样本病毒载量大于 1000 拷贝/mL，如遇低病毒载量样本（<1000 拷贝/mL），需进行相应处理后提高扩增成功率。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四大类，分别为：蛋白酶抑制剂（Protease Inhibitors, PIs）、核苷类或核苷酸类逆转录酶抑制剂（Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs）、非核苷类逆转录酶抑制剂（Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs）和整合酶抑制剂（Integrase Strand Transfer Inhibitors, INSTI）。针对这四类药物，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（推荐的扩增和测序引物以及反应条件见表 7-1）。针对整合酶链转移抑制剂（INSTI）的扩增片段需至少覆盖 50-288 位氨基酸。

4.3 低病毒载量样本进行耐药检测的处理方法

对病毒载量低于 1000 拷贝/mL 的 HIV 感染者，进行耐药检测是一个挑战，因为标准的基因型耐药检测依赖于足够的病毒 RNA 量。近年来，为了提高对低病毒载量样本的检测准确性，开发和优化了对低病毒载量样本进行耐药检测的样本浓缩处理方法，包括超速离心法和使用商品化病毒浓缩液，这两种方法均可使病毒颗粒沉淀实现浓缩，具体检测方法和检测流程见附件 6。

4.4 测序技术应用

4.4.1 一代测序技术，即 Sanger 测序法，主要基于链终止法和毛细管电泳的原理，读长在 600-1000bp，可以获得检测样本中优势毒株的共识序列(Consensus Sequence)。一代测序的结果稳定，准确性高，测序数据分析简单，有成熟的结果解读系统。经过大量临床实践，基于一代测序的基因型耐药检测结果与临床表型耐药的相关性明确，可满足大多数临床检测需求，且检测流程标准化、成本可控，是目前 HIV 基因型耐药检测的首选方法。国外也有商业化试剂盒与分析软件获批上市。但一代测序只能检测出丰度>20%的高频突变，无法检测到低频耐药突变位点。

4.4.2 二代测序技术（Next Generation Sequencing, NGS）是一种高通量测序方法，主要基于大规模并行测序（边合成边测序）的原理，具有超高灵敏度，可检测低至 1%~5%的低频突变，能更早地预警耐药风险，实现更精准的个体化管理。但二代测序的读长短（通常 100-500bp），数据分析复杂，需要专业的生物信息学软件和分析能力，目前尚未统一检测下限和报告标准，并且成本高于一代测序。二代测序正逐渐从科研走向临床，作为一代测序的重要补充，用于解决更复杂的临床难题，如低频耐药、不明原因的治疗失败等，指导精准治疗方案。已有基于二代测序的商业化 HIV-1 基因型耐药突变检测试剂盒获得美国食品药品监督管理局批准上市，该试剂盒搭配高度自动化的二代测序工作流程，序列分析和耐药性解释也完全自动化，消除了 Sanger 测序中因人工判断信号峰可能发生的错误，可实现从 RNA 提取至产生耐药报告的全程自动化。

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途		反应条件
							及方向		
pol区基因 扩增方案 一	第一轮 RT-PCR	Maw26	5'-TGGAAATGTGGAAAAGAAGGAC-3'	22	2028-2050	1458	正向	50℃ 30分钟，94℃ 2分钟， 55℃ 30秒，72℃ 2分30秒，30个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温	
		RT-21	5'-CTGTATTTCAGCTATCAAGTCTTTTGATGGG-3''	31	3509-3539		反向		
	第二轮 PCR	PRO1	5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3''	20	2147-2166	1315	正向	94℃ 5分钟，1个循环；94℃ 30秒，63℃ 30秒，72℃ 2分30秒，30个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温	
		RT20	5'-CTGCCAATTCTAATTCTGCTTC-3'	22	3441-3462		反向		
	测序	PROS3	5'- GCCAACAGCCCCACCA -3'	16	2151-2166		正向	96℃ 5分钟，1个循环；96℃ 10秒，50℃ 5秒，60℃ 4分钟，25个循环；4℃ 保温	
		PRO1*	5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3'	20	2151-2166		正向		
		RTAS	5'-CTCAGATTGGTTGCAC -3'	16	2524-2539		正向		
		RTAS-qian#	5'-GGACCTACACCTGTCAAC-3'	18	2484-2501		正向		
		RTB	5'-CCTAGTATAACAATGAGACAC-3'	22	2946-2967		正向		
		PROC1S	5'-GCTGGGTGTGGTATTCC-3'	17	2826-2842		反向		
pol区基因 扩增方案 二	第一轮 RT-PCR	RT20S3	5'- GTTCTAGCTCTGCTTC -3'	16	3456-3441		反向	50℃ 45分钟，94℃ 2分钟， 50℃ 20秒，72℃ 2分钟，35个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温	
		RT20-07BC**	5'- CTGCCAATTCTAATTCTGCTTC -3'	22	3462-3441		反向		
	第二轮 PCR	RT20-07	5'-CTGCCAATTCTAATTCTGCTTC-3'	22	3300-3322		反向	94℃ 4分钟，1个循环；94℃ 15秒，55℃ 20秒，72℃ 2分钟，30个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温	
		F1a	5'-TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT -3'	29	2057-2085	1291	正向		
	F1b	5'-ACTGARAGRCAGGCTAATTTTTTAG-3'	25	2068-2092	反向				
	RT-R1	5'-ATCCCTGCATAAAATCTGACTTGC -3'	23	3370-3348		正向			
	PRT-F2	5'-CTTTARCTTCCCTCARATCACTCT -3'	24	2243-2266	1061	正向			
	RT-R2	5'- CTTCTGTATGTCATTGACAGTCC -3'	23	3326-3304		反向			
	测序	SeqF3	5'- AGTCCTATTGARACTGTRCCAG -3'	22	2556-2577		正向		
		SeqF4	5'-CAGTACTGGATGTGGRGAYG-3'	21	2869-2889		正向		
SeqR3		5'-TTTCTCTCTGTCAATGGCCA-3'	21	2639-2619		反向			
SeqR4		5'- TACTAGGTATGGTAAATGCAGT -3'	22	2952-2931		反向			
注：*备用测序引物，替代PROS3，用于CRF07_BC毒株测序；#备用测序引物，替代RTAS，用于B和CRF07_BC毒株测序；**备用测序引物，替代PRT20S3，用于CRF07_BC毒株测序									

表 7-1 我国 HIV 耐药监测 *pol* 区推荐扩增引物表

4.4.3 三代测序技术基于单分子实时测序的原理，具有超长读长（通常 1-10 kb，甚至更长），并且可在几个小时内完成检测，可检测到低频突变，并明确其连锁关系。但原始读长的错误率较高，目前成本高，仪器相对昂贵，数据分析流程不如一代和二代数据分析流程成熟，在临床耐药检测中的标准化流程仍在探索中。近年来随着准确性的提升、成本的下降、数据分析流程的标准化，三代测序技术有望成为未来基因型耐药检测的新标准，并可应用于资源有限地区或需要快速结果的现场检测。

4.5 基于一代测序数据的序列拼接

基于一代测序数据进行序列拼接，主要包括测序片段清理、组装和混合碱基判断。

4.5.1 测序片段清理：对测序片段两端较为集中的模糊碱基（ambiguity）或碱基信号可信度较低的区域进行剪切。

4.5.2 测序片段组装：利用测序片段的重叠区（overlap）或与参考序列比对进行片段组装。

4.5.3 混合碱基判断：参照国际纯粹与应用化学联合会-国际生化联合会（IUPAC-IUB）的命名规则，按照次级峰信号高于附近基线噪音信号的 3 倍并且达到主峰的 20% 及以上的标准，判定混合碱基。

4.6 耐药位点分析

4.6.1 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。

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

4.6.3 通常可使用 HIVDB 系统（<https://hivdb.Stanford.edu/hivdb>）或者中国艾滋病病毒基因序列数据平台（<https://nmhc.cn/hiv/>）系统，判断耐药相关突变和组合的耐药程度。

4.6.4 使用 CPR 工具（CPR, <http://cpr-v.stanford.edu/cpr/servlet/CPR>）判断传播性耐药突变。

4.7 基于二代测序和三代测序技术的 HIV 耐药突变位点分析

应用二代测序与三代测序技术进行 HIV 耐药分析，产生的大量序列信息数据需依托专业生物信息学软件及分析方法进行处理。由于不同测序平台的技术特性存在差异，需针对性选择适配的专业分析工具。在序列分析过程中，数据的质量控制与科学的分析方法至关重要，以确保结果准确可靠。使用二代与三代测序技术检测耐药突

变时，应注意在不同阈值获得的共享序列所判定的耐药突变有所不同，在 10%和 20% 阈值获得的共享序列与一代测序分析得到的耐药突变结果相一致，但低于 5%阈值时所发现耐药突变的临床意义有待进一步研究。

5. 结果解释和报告

5.1 结果解释

5.1.1 耐药相关的基因突变的识别

在 HIV 基因型耐药检测中，检测结果会罗列在 HIV 基因中发现的所有突变，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，例如，M184V 表示第 184 位的氨基酸从甲硫氨酸（M）变为缬氨酸（V）。检测者应按照国家不同基因分别解释和报告耐药相关的基因突变，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别报告（详见附表 6）。

5.1.2 耐药基因突变的解释

（1）已知耐药突变：测序结果会标记出与药物耐药性相关的已知突变，突变位点的基因型改变会直接导致针对不同药物的耐药性。这些信息通常来源于已知公认的 HIV 耐药分析数据库和研究文献，例如常用的中国疾控中心开发的《中国艾滋病病毒基因序列数据平台》（<https://nmhc.cn/hiv/>），以及美国斯坦福大学开发的 Stanford HIV Drug Resistance Database 数据库等，在出具检测报告时会逐一说明。

（2）已知的耐药性相关辅助突变：通过和数据库比对，依据现有临床和研究证据显示起到辅助突变的作用，其单独突变尚不引起耐药性，需联合其他突变一起形成耐药性，例如 K103R 突变，单独的突变不会导致对 NNRTI 类药物的耐药性，但若同时出现了 V179D 突变时，K103R+V179D 就会对依非韦伦和奈韦拉平产生高度耐药性。

（3）不确定的基因突变：测序中会发现有一些突变频次高的位点，但尚无证据是否直接导致耐药性或辅助耐药性的突变，通过数据库的比对，也应给出注释说明，提示报告和临床关注。例如在整合酶基因检测时会出现的 L74I 突变，目前尚无确切证据证明其属于耐药性或辅助耐药性突变，但在检测报告中也会注明这一点，并建议进一步监测和研究。

5.1.3 耐药程度分析

若使用商业化的检测试剂盒，应采用试剂盒配套的说明书上确定的 HIV-1 基因型耐药检测的解释系统进行分析与报告。若采用实验室自建（In-house）方法进行的耐药性检测，此处以采用斯坦福大学 HIV 耐药解释系统（HIV Drug Resistance Database, HIVDB）进行分析与报告为例，HIVDB 系统将 HIV-1 耐药程度分为五档：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，一般将后 3 个水平判断为耐药。

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；即使采用第二代测序技术（Next-Generation Sequencing, NGS）检测耐药突变时，最高灵敏度也只能达到 1-5% 之间，因此当基因型耐药检测结果显示未检出耐药突变时，只可报告本次实验结果为“未发现耐药突变”，不可简单报告为“敏感”，因为不排除样本中可能仍存在有比例较低的耐药毒株。

5.2 结果报告

5.2.1 报告结构

- （1）患者信息：包括患者的基本信息和检测日期。
- （2）样本信息：样本类型（如血浆）、采集日期和样本编号。
- （3）检测方法：详细描述使用的检测方法和技術，如 Sanger 测序或 NGS。
- （4）结果总结：包括发现的突变、耐药性解释和治疗建议。
- （5）详细结果：列出所有检测到的突变、对应的氨基酸变化及其耐药性影响。
- （6）参考文献和数据库：引用用于解释突变和耐药性的参考文献和数据库。

5.2.2 临床建议

根据检测结果，报告可提供临床建议，包括：

- （1）继续现有治疗：如果检测到的突变对现有治疗方案无显著影响。
- （2）调整治疗方案：如果检测到的突变影响现有治疗方案的有效性，建议替换或增加其他药物。
- （3）进一步监测：对于新发现的突变或未确定耐药性影响的突变，建议密切监测患者的病毒载量和临床症状。

参考文献

- [1] World Health Organization. HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational

- framework[M]. Geneva: WHO, 2020.
- [2] ONWUAMAH CK, OKWURAIWE AP, AHMED RA, et al. Laboratory Optimization Tweaks for Sanger Sequencing in a Resource-Limited Setting[J]. J Biomol Tech, 2020, 31(4): 157-164.
- [3] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测实验室质量控制指南[Z]. 2024.
- [4] 深圳市标准化协会. 基于聚合酶基因序列的人免疫缺陷病毒 1 型基因型耐药检测技术规范: T/SZAS 96-2025[S]. 深圳, 2025.
- [5] HHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents With HIV[M]. USA: 2021.
- [6] TZOU PL, RHEE SY, DESCAMPS D, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing to Sanger Sequencing for HIV-1 Drug Resistance Genotyping[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(3): e01961-19.
- [7] WENSING AM, CALVEZ V, CECCHERINI-SILBERSTEIN F, et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1[J]. Top Antivir Med, 2019, 27(3): 111-121.
- [8] YU F, LI Q, WANG L, et al. Drug Resistance to HIV-1 Integrase Inhibitors Among Treatment-Naive Patients in Beijing, China[J]. Pharmgenomics Pers Med, 2022, 15: 195-203.
- [9] JENNINGS C, PARKIN N T, ZACCARO D J, et al. Application of a Sanger-Based External Quality Assurance Strategy for the Transition of HIV-1 Drug Resistance Assays to Next Generation Sequencing[J]. Viruses, 2020, 12(12).

第八章 HIV-1 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 感染的辅助诊断

2.2 HIV 表型耐药检测

2.3 病原学检测质控品制备

2.4 疫苗株筛选

2.5 HIV 遗传学和生物学特征的研究

3. HIV-1 分离培养的样本类型和实验室要求

HIV-1 毒株的分离培养优先选用 HIV 感染者新鲜的外周血单个核细胞(PBMC), 也可使用新鲜抗凝全血、血浆、精液及其他体液样本。

4. HIV-1 分离培养的方法和程序

最常用的方法是采用靶细胞(HIV 阴性者外周血淋巴细胞)与受检者样本(PBMC、全血、血浆、精液及其他体液)共培养的方法。可同时接种一株 HIV-1 原代毒株, 以证明实验方法的可靠性。

4.1 样本处理: 首选受检者 PBMC, 也可以使用全血、血浆、精液及其他体液。若使用 PBMC 作为样本, 需在生物安全防护条件下从受检者新鲜的抗凝全血样本中通过密度梯度离心法分离出 PBMC。受检者样本必须无菌, 培养过程中注意无菌操作。

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 (Interleukin-2, IL-2) 和植物血凝素 (Phytohemagglutinin-P, PHA-P) 的培养基中培养 3 天, 使淋巴细胞充分活化。使用多位 HIV 阴性者 PBMC 混合, 去除受检者 PBMC 中的 CD8⁺T 淋巴细胞有助于提高分离成功率。

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。通过 PBMC 共培养分离 HIV 时, HIV

感染者 PBMC 与活化的 HIV 阴性者 PBMC 细胞数比例通常为 1:1~1:7，调整细胞密度及混合比例可以改变病毒分离效果。混合后的细胞应置于含有胎牛血清和抗生素的培养基中培养，加入 polybrene 可以提高病毒的分离成功率。

4.4 监测病毒生长：培养过程中每 3~4 天倒置显微镜下观察细胞病变，并取培养上清液，检测其中 HIV p24 抗原浓度或逆转录酶活性。

4.5 培养上清液 p24 抗原或逆转录酶活性连续 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，并经鉴定培养上清液中提取的 RNA 或细胞中提取的基因组 DNA 含有 HIV 基因序列，判为 HIV-1 分离阳性。

4.6 若共培养至第 28 天，培养上清液 p24 抗原或逆转录酶活性始终为阴性，判为 HIV-1 分离阴性。

4.7 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. 病毒生物学鉴定

5.1 HIV 的滴度检测

测定 HIV 的感染性滴度应采用终点稀释法。用梯度稀释的病毒培养上清液感染 TZM-bl 细胞。37℃，5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后检测 TZM-bl 细胞荧光值。采用荧光素酶分析试剂检测化学发光值（Relative Luminescence Units, RLU）。以阴性对照孔的平均 RLU 值的 2.5 倍为阈值，试验孔 RLU 高于阈值判定为阳性（+），试验孔 RLU 低于阈值则判定为阴性（-）。根据阳性/阴性判定结果，使用 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀ 值。

5.2 病毒嗜性鉴定

HIV 与宿主 CD4⁺T 淋巴细胞表面的 CCR5 或 CXCR4 辅助受体选择性结合的生物学特性。

嗜性预测：通过对 V3 环关键氨基酸的分析可预测 HIV-1 辅助受体的可能使用情况。V3 环中的 S/GXXXGPGXXXXXXXXXE/D（V3 环位置为 11-25）为预测 HIV-1 辅助受体 CCR5 使用的共同基序。如果这些关键的预测位点被带正电荷的精氨酸（R）或谷氨酰胺（Q）替换，则 HIV-1 毒株使用 CXCR4 辅助受体进入细胞。

嗜性检测：将分离培养得到的病毒培养上清液分别感染表达 CCR5 或 CXCR4 辅助受体的 Ghost 细胞，设置阳性对照及阴性对照，放置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培

养 48 小时,在荧光显微镜下观察细胞的绿色荧光蛋白(Green fluorescent Protein, GFP)表达情况。结果判定:只有 Ghost-CXCR4 细胞显示绿色荧光的为 CXCR4 嗜性,只有 Ghost-CCR5 细胞显示绿色荧光的为 CCR5 嗜性, Ghost-CXCR4 和 Ghost-CCR5 细胞均显示绿色荧光的为双嗜性。

5.3 病毒合胞体诱导测定

HIV 感染导致细胞融合形成合胞体的过程。将毒株的病毒培养上清液接种于 MT-2 细胞,连续培养 2~3 周,显微镜下观察 MT-2 细胞融合现象。在培养孔观察到“空泡”或细胞融合体,则为合胞体诱导(Syncytia Inducing, SI)型毒株;培养孔中未观察到细胞融合现象,为非合胞体诱导(Non Syncytia Inducing, NSI)型毒株。

参考文献

- [1] DISPINSERI S, SABA E, VICENZI E, et al. HIV-1 isolation from infected peripheral blood mononuclear cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1087: 187-196.
- [2] TSAI W, CONLEY S, KUNG H, et al. 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 Cells1[J]. *Virology*, 1996, 226(2): 205-216.
- [3] CHENG-MAYER C, SETO D, TATENO M, et al. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host [J]. *Science*, 1988, 240(4848): 80-2.
- [4] 中华预防医学会. 病原微生物菌(毒)种标准株 艾滋病病毒毒株建立技术规范: T/ CPMA 027—2023[S]. 北京, 2023.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 病原微生物菌(毒)种国家标准株评价技术标准: WS/T 812-2022[S]. 北京, 2022.

第九章 HIV-1 基因分型

1. 范围

本章阐述了 HIV-1 基因分型的意义、规定了相应的技术方法、结果解释和报告，适用于各级各类实验室对 HIV-1 进行基因测序、亚型检测和重组鉴定。

2. HIV-1 基因分型的意义

HIV-1 分为 4 个组，分别是 M、N、O、P 组，组间的基因离散率为 30%~50%；其中 M 组在全球广泛流行，又可分为 10 个亚型（A、B、C、D、F、G、H、J、K、L），亚型间的基因离散率为 20%~30%，亚型内的基因离散率为 7%~20%。M 组还包括大量流行重组型（Circulating Recombinant Form, CRF）和独特重组型（Unique Recombinant Form, URF）。通过基因分型可以了解 HIV-1 的变异特点，为病毒检测、分子进化分析、分子传播网络构建、免疫表位分析、以及致病机制研究等提供重要的基础数据。

3. HIV-1 基因分型的样本类型和要求

用于 HIV-1 基因分型和全基因组测序的样品类型可为全血、血浆、淋巴细胞富集液、外周血单个核细胞和滤纸片干血斑。其中血浆样本采用抗凝剂为 EDTA 或 ACD，不能使用肝素抗凝剂，避免 PCR 反应受到抑制。

对于低病毒载量样本可以通过对病毒颗粒进行浓缩。如可采用超速离心浓缩亦可通过病毒浓缩试剂实现，或采用磁性二氧化硅富集，以提高核酸检测成功率。

4. HIV-1 基因分型的方法和程序

HIV 基因分型目前主要使用实验室自建方法，通过对 HIV 部分基因序列进行逆转录巢式 PCR 扩增和测序，根据系统进化分析模型推断的遗传距离判定病毒亚型。HIV-1 的三个结构基因 *pol*、*env*、*gag* 都可用于亚型鉴定，一般应首选基因序列变异最大的 *env* 区序列，但由于 *pol* 区序列还可用作基因型耐药检测，使用 *pol* 区序列可同时得到耐药突变和基因亚型的信息，因此实际工作中常用 *pol* 区序列进行基因分型。

4.1 靶基因扩增

根据靶基因序列设计特异性引物，引物应选择在相对保守区设计，至少能覆盖我国现有 HIV-1 主要流行亚型。常用的 *pol* 区扩增和测序引物可参考 HIV 耐药检测一章中的表 7-1 或国内外文献中已报道的基因扩增引物。为更加准确地判定亚型，建议选择两个及以上靶基因进行分析（如 *pol*, *env*, *gag*），对 HIV 基因分型不明确或潜在的重组样本，建议扩增全长或近全长 HIV 基因序列进行重组断点分析。

4.2 测序技术应用

HIV-1 基因分型可以使用一代测序、二代测序和三代测序技术。

一代测序的读长在 600-1000 bp，可以覆盖亚型分型所需的关键区域。准确性极高（<0.1%误差），技术成熟、标准化，数据分析简单，获得的数据为单一共识序列。但检测通量低，色谱峰图无法检测鉴别准种、混合感染和复杂重组毒株。对单一优势毒株进行快速、准确的亚型鉴定，适合用于常规基因分型检测和流行病学监测。

二代测序的读长短在 100-500bp，但检测通量极高，可同时处理大量样本，获得数千至数百万条短读长序列，拼接得到长片段序列。二代测序具有高分辨率和超高灵敏度，可检测出低至 1% 的劣势准种，精确鉴定混合感染和复杂重组亚型。但短读长难以解析复杂重组亚型，并且数据分析复杂，重组断点的精确判定依赖于高性能的专业生物信息学软件分析。适用于大规模测序、研究复杂重组病毒、鉴定低频 HIV 准种等。

三代测序的超长读长在 1-20 kb，甚至更长，可以一次性完整读取接近整个 HIV 基因组序列（~9.7kb）。检测通量高，可同时获得数万到数十万个长读长序列。超长读长可直接跨越重组断点，并且无需 PCR，避免了 PCR 扩增引入的突变和偏倚。但三代测序的原始读长错误率较高，需要通过高测序深度或循环一致性测序纠错，以获得高准确度的共识序列。目前成本仍较高，数据分析算法仍在发展中，数据分析的成熟度不如一代和二代测序。适用于解析复杂重组事件，获得完整 HIV 病毒基因组序列，无扩增偏倚地研究病毒准种。由于检测速度快，随着准确性的提升和成本的下降，有望在偏远地区和溯源现场实现快速测序和实时监测。

4.3 基于一代测序数据的序列拼接和重组分析流程

4.3.1 序列质量评价

可使用 Sequence Scanner, Sequencher、FinchTV、ChromaPro 软件，或在线质量控制软件（recall.bccfe.ca/who_qc）等对获得序列的质量进行初步评价和清理。质量

合格序列的图谱应该峰形清楚、无杂峰和套峰等,或通过 ABI 图谱质量分数(Quality Value, QV) 指标判断。如序列质量不合格或序列混合无法校正,需重新进行检测和分析。

4.3.2 序列拼接和编辑

可使用 Sequencher、BioEdit、ChromaPro、CLUSTAL X、Vector NTI 等软件对序列进行拼接和编辑。对拼接后的序列还需进行清理校准,查找模糊碱基,包括不同片段不一致的位置、混合碱基位置以及质量分数低的位置(默认设置为 20)。

4.3.3 拼接后序列的校对、整理和比对分析

初次清理完毕的序列尚需通过序列比对的方法进行校正,可使用 BioEdit、CLUSTAL X 等软件。注意序列比对分析中出现的 inconsistent 的地方,例如影响开放阅读框架的缺失、插入、终止密码、连续重复的碱基以及序列中的突变碱基。应根据序列比对分析结果并结合序列图谱进行校对,产生新的序列后再次进行比对。根据序列研究目标的不同,该过程可能会循环数次。

4.3.4 HIV-1 基因亚型的分析方法

HIV 基因分型的分析方法有三类:基于相似性(Stanford HIV DB、NCBI、Euresist、Geno2pheno)、基于统计(COMET、jpHMM 和 STAR)和基于系统发育(REGA、SUDI、SCUEAL)。其中,基于系统发育的分析工具能够显示 HIV 的谱系关系和进化因素,因此常用于亚型分析,又可分为两类:一类是基于算法(距离矩阵)的程序,如邻接法(Neighbor-joining, N-J)和 UPGMA 法;另一类是基于最优性准则,也称为统计方法,如最大似然法(Maximum-likelihood, ML)或贝叶斯系统发育分析。常用的系统进化分析软件包括:MEGA、Phylip、PhyML、RAxML、iqtree、MrBayes 和 Beast 等。

4.3.5 HIV-1 基因亚型的判定

拼接校正好的序列可使用美国 Los Alamos 国家实验室在线 HIV 核酸序列库(HIV Sequence Database, <http://www.hiv.lanl.gov>) 中的 BLAST 软件进行初步基因亚型分析。也可从 HIV Sequence Database 下载 HIV 分型参考株序列,用 BioEdit、CLUSTAL X 等软件进行序列比对分析,使用系统进化分析软件构建系统进化树,根据系统进化树分析结果进行亚型鉴定。如获得近似全长或者全长基因组序列,可根据 HIV BLAST、Quality Control 及 COMET HIV-1 等软件的分析结果判定亚型。

4.3.6 基因重组鉴定

对未明确分型的潜在的 HIV 重组毒株，需进一步对其全长或近全长 HIV 基因序列进行重组断点分析，有助于了解 HIV-1 的进化历程和传播途径。可使用 HIV Sequence Database 中的在线 RIP 重组分析软件初步分析重组模式。然后，选择可能发生重组的参考株序列，应用 SimPlot、jpHMM、及 RDP4 等重组分析软件进一步分析基因重组模式并定位重组断点。其中，Simplot 主要通过对待分析序列和参考序列进行相似性作图，通过绘制的点图判断目的序列是否存在重组：（1）当参考序列的点图呈现近似平行线时，说明目的序列与其中某条参考序列高度相似，不存在重组信号；（2）当参考序列的点图呈交叉时，说明可能存在重组信号。通过 HIV Sequence Databases 中的 Recombinant HIV-1 Drawing Tool 标明重组断点，绘制重组镶嵌模式图。

4.3.7 贝叶斯分子进化分析

可使用贝叶斯分子进化分析方法进行贝叶斯合并模型分析，以重建 HIV 基因型或基因亚型的流行史，常用的分析网站如：<https://www.beast2.org>。

4.4 基于二代测序技术和三代测序技术的基因序列分析

二代测序技术和三代测序技术可产生大量的序列信息数据，需要通过专业生物信息学软件和分析方法进行处理和分析，可根据不同测序平台选择与其相适应的专业生物信息学分析软件。在进行序列分析时，需要特别注意数据的质量控制和分析方法的选择，以确保结果的准确性和可靠性。

5. 结果解释和报告

HIV-1 M 组病毒的基因亚型应报告为亚型（A、B、C、D、F、G、H、J、K、L），流行重组型（例如，CRF110_BC），或独特重组型（例如，URF_BC）；对于无法鉴定亚型的毒株，可报告为“U”，意思是未分型（Unclassified）。

参考文献

- [1] 蔡卫平, 李凌华. 艾滋病学[M]. 北京, 人民卫生出版社, 2025.
- [2] TOPCU C, GEORGIU V, RODOSTHENOUS JH, et al. Comparative HIV-1 Phylogenies Characterized by PR/RT, Pol and Near-Full-Length Genome Sequences[J]. Viruses, 2022, 14(10): 2286.

- [3] PINEDA-PENA AC, FARIA NR, IMBRECHTS S, et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 19: 337-348.
- [4] FABENI L, BERNO G, FOKAM J, et al. Comparative Evaluation of Subtyping Tools for Surveillance of Newly Emerging HIV-1 Strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(9): 2827-2837.
- [5] SUN X, ZHANG H, KONG X, et al. Low-level viremia episodes appear to affect the provirus composition of the circulating cellular HIV reservoir during antiretroviral therapy[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1376144.
- [6] LI Q, YU F, SONG C, et al. A Concentration Method for HIV Drug Resistance Testing in Low-Level Viremia Samples[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 2100254.
- [7] CICCOCCHI M, LAI A, ZEHENDER G, et al. The phylogenetic approach for viral infectious disease evolution and epidemiology: An updating review[J]. *J Med Virol*, 2019, 91(10): 1707-1724.
- [8] KIJAK GH, SANDERS-BUELL E, PHAM P, et al. Next-generation sequencing of HIV-1 single genome amplicons[J]. *Biomol Detect Quantif*, 2019, 17: 100080.
- [9] UMVILIGIHOZO G, MUOK E, NYIRIMIHIGO GE, et al. Increased Frequency of Inter-Subtype HIV-1 Recombinants Identified by Near Full-Length Virus Sequencing in Rwandan Acute Transmission Cohorts[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 734929.
- [10] KONO N, ARAKAWA K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics[J]. *Dev Growth Differ*, 2019, 61(5): 316-326.
- [11] WRIGHT IA, DELANEY KE, KATUSIIME M, et al. NanoHIV: A Bioinformatics Pipeline for Producing Accurate, Near Full-Length HIV Proviral Genomes Sequenced Using the Oxford Nanopore Technology[J]. *Cells*, 2021, 10(10).
- [12] MORI M, ODE H, KUBOTA M, et al. Nanopore Sequencing for Characterization of HIV-1 Recombinant Forms[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(4): e150722.
- [13] STRUCK D, LAWYER G, TERNES AM, et al. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(18): e144.

- [14]PATINO-GALINDO JA, GONZALEZ-CANDELAS F. Molecular evolution methods to study HIV-1 epidemics[J]. Future Virol, 2018, 13(6): 399-404.
- [15]XIAO P, ZHOU Y, LU J, et al. HIV-1 genotype diversity and distribution characteristics among heterosexually transmitted population in Jiangsu province, China[J]. Virol J, 2019, 16(1): 51.

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 ☐ 尿液 ☐ 口腔黏膜渗出液 ☐ 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 ☐ 化学发光 ☐ 免疫荧光 ☐ RT ☐ 其它试验：_____		ELISA ☐ 化学发光 ☐ 免疫荧光 ☐ RT ☐ 其它试验：_____		ELISA ☐ 化学发光 ☐ 免疫荧光 ☐ RT ☐ 其它试验：_____		
检测指标	HIV 抗体 ☐ HIV 抗原 ☐ HIV 抗原抗体（不区分） ☐ HIV 抗原抗体（区分） ☐		HIV 抗体 ☐ HIV 抗原 ☐ HIV 抗原抗体（不区分） ☐ HIV 抗原抗体（区分） ☐		HIV 抗体 ☐ HIV 抗原 ☐ HIV 抗原抗体（不区分） ☐ HIV 抗原抗体（区分） ☐		
检测日期	年 月 日		年 月 日		年 月 日		
检测结果							
筛查结论	HIV 抗体待确定 ☐ HIV 抗原待确定 ☐ HIV 抗体阴性 ☐ HIV 抗原阴性 ☐						
报告日期	年 月 日						
检测者		复核者		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			
样本类型		血浆 ☐ 血清 ☐ 其它：		样本编号			
采样日期				送检人群			
姓名		性别		年龄 (岁)		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(路)____(门牌号)						
户籍地址	____省____市____县____乡(镇、街道)____村(路)____(门牌号)						
检测方法	WB ☐ RIBA/LIA ☐ 其他：_____						
检测结果 (带型)							
结论	HIV-1 抗体确证阳性 ☐ HIV-1 抗体确证阴性 ☐ HIV-1 抗体确证不确定 ☐ HIV-2 抗体确证阳性 ☐ HIV-2 抗体确证阴性 ☐ HIV-2 抗体确证不确定 ☐						
检测者		复核者		签发者		报告日期	
检测单位(公章)				备注:			

附表 3

HIV 抗体确证检测报告（替代策略）

编号：

送检单位				送检日期		采样日期	
样本类型	血浆 ☐ 血清 ☐ 其它：			样本编号		送检人群	
姓名		性别		年龄（岁）		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（路）____（门牌号）						
户籍地址	____省____市____县____乡（镇、街道）____村（路）____（门牌号）						
检测方法、试剂		日期		检测结果			
试剂 1（名称、方法）							
试剂 2（名称、方法）							
试剂 3（名称、方法）							
试剂 4（名称、方法）							
结论		HIV 抗体阳性 ☐ HIV 抗体阴性 ☐ HIV 感染待确定 ☐					
检测者		复核者		签发者		报告日期	
检测单位（公章）				备注			

附表 4

HIV-1 核酸检测报告

编号：

送检单位				送检日期		采样日期	
样本类型	血浆 ☐ 血清 ☐ 其它：			样本编号		送检人群	
姓名		性别		年龄 (岁)		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	
DNA	定性	HIV-1 DNA 阳性 ☐ HIV-1 DNA 阴性 ☐					
	定量 拷贝/10 ⁶ PBMC						
RNA	定性	HIV-1 RNA 阳性 ☐ HIV-1 RNA 阴性 ☐					
	定量 拷贝/mL (IU/mL)						
结论							
检测者		复核者		签发者		报告日期	
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	
姓名		性别		年龄	
检测日期				报告日期	
仪器及试剂情况					
仪器型号				试剂名称	
试剂批号				试剂有效期	
检测结果					
	CD4 ⁺ CD3 ⁺ / CD3 ⁺	CD8 ⁺ CD3 ⁺ / CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD45 ⁺	CD4 ⁺ CD3 ⁺ / CD45 ⁺	CD8 ⁺ CD3 ⁺ / CD45 ⁺
检测值					
参考范围					
	CD3 绝对数 (个/μL)	CD4 绝对数 (个/μL)	CD8 绝对数 (个/μL)	CD4/CD8 (Th/Ts)	
检测值					
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			
样本类型				送检人群			
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							
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		多拉韦林 (DOR)				
			依非韦仑 (EFV)				
			Etravirine (ETR)				
			奈韦拉平 (NVP)				
			Rilpivirine(RPV)				
整合酶区 (IN)	整合酶抑制剂 (INSTI) 相关		Bictegravir(BIC)				
			卡博特韦(CAB)				
			多替拉韦(DTG)				
			艾维雷韦(EVG)				
			拉替拉韦(RAL)				
其他突变							
临床建议							
检测者		复核者		签发者		报告日期	
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			
检测结果			
检测者		复核者	
		签发者	
实验室负责人（签字或盖章）：		备注：	

附件 1

HIV-1 集合核酸检测及流程

1. 范围

本附件规定了 HIV-1 集合核酸检测（HIV-1 Pooled NAT）的意义、实验室要求、检测方法及流程和注意事项。适用于血液筛查和 HIV 感染高风险人群筛查检测。

2. 检测的意义

HIV 集合核酸检测是将多份 HIV 筛查阴性样本集合于 1 支样品管后，进行核酸定性检测的方法。若集合样本检测结果为阳性，则需将集合样本拆分后进一步检测以确定核酸阳性样本；若集合样本检测结果为阴性，则判定集合中的所有样本均为核酸阴性。此模式利用核酸检测技术高度敏感性的优势，对 HIV 筛查阴性的高危人群样本进行集合核酸检测，可及时发现窗口期 HIV 感染者。与单份样本逐一检测相比，集合检测能够提高核酸筛查效率，节约检测成本，适用于血液筛查和 HIV 感染高风险人群筛查检测。

3. 实验室要求

同 HIV 核酸检测

4. 检测方法及流程

核酸检测方法的检测限、集合的样本数量以及集合策略是影响检测性能的主要因素。常用的集合策略包括：一步集合、两步集合和矩阵集合（见图 1），其中一步集合策略广泛用于献血员血液筛查，两步集合和矩阵集合策略则在高危人群 HIV-1 急性期感染筛查中具有更高的检测效率和阳性预测值。在大多数情况下，采用矩阵集合策略可以更加快速地对集合中发现的阳性样本实现初步定位。

4.1 样本集合程序

4.1.1 以两步集合策略为例，根据需检测的样本量，计算预形成的总集合和二级集合数量，总集合的样本数量以不超过 50 份为宜。在登记表格上记录总集合和二级集合及对应的原始样本编号。样本集合前，应预先估算在需要拆分情况下每份样本的取样

量，以满足拆分后再次核酸检测所需。

4.1.2 吸取 130 μL 样本，移入标记二级集合的离心管中；10 份样本形成一个 1300 μL 的二级集合样本，充分涡旋震荡混匀。

4.1.3 从 5 个二级集合管中分别吸取 210 μL 样本，移入标记有总集合的离心管中，形成由 50 份样本组成的体积为 1050 μL 的总集合样本，充分涡旋震荡混匀。

4.1.4 从每个总集合管中吸取 1000 μL 集合样本，分装至另一相应标记的待检测样本管中，用 HIV-1 核酸检测试剂进行检测。

4.2 集合样本的检测和拆分路线

使用商品化 HIV-1 核酸定性/定量检测试剂，应严格按照试剂盒说明书操作，做好室内质量控制。

4.2.1 总集合检测：对总集合样本进行 HIV-1 核酸检测。若结果为阳性，则进入下一步检测；若为阴性，则无需拆分，该总集合内所有样本视为阴性。

4.2.2 二级集合检测：采用 HIV-1 病毒载量方法检测构成该阳性总集合的所有二级集合样本。结果为阳性的二级集合样本进入最终检测步骤。

4.2.3 单个样本检测：采用 HIV-1 病毒载量方法检测构成阳性二级集合的所有单个样本，从而确定 HIV-1 核酸阳性的具体样本。

4.3 集合样本的检测和拆分路线

使用商品化 HIV-1 核酸检测试剂时，应严格按照试剂盒说明书操作，并做好室内质量控制。以 HIV-1 病毒载量检测为例，其集合检测流程如下：

4.3.1 对总集合样本进行病毒载量检测。

4.3.2 二级集合检测：采用 HIV-1 病毒载量方法检测构成该阳性总集合的所有二级集合样本。结果为阳性的二级集合样本进入最终检测步骤。

4.3.3 单个样本检测：采用 HIV-1 病毒载量方法检测构成阳性二级集合的所有单个样本，从而确定 HIV-1 核酸阳性的具体样本。

5. 注意事项

检测中需要注意：用于 HIV-1 集合核酸检测的样本通常是抗体筛查阴性的样本。每次样本集合后必须充分震荡混匀，建议在有条件的情况下，样本集合过程尽量采用自动化仪器进行操作，以减少手工混匀可能带来的误差。每批检测需保证足够的样本数量，样本的采集、分离及保存均应满足核酸检测的规范要求。

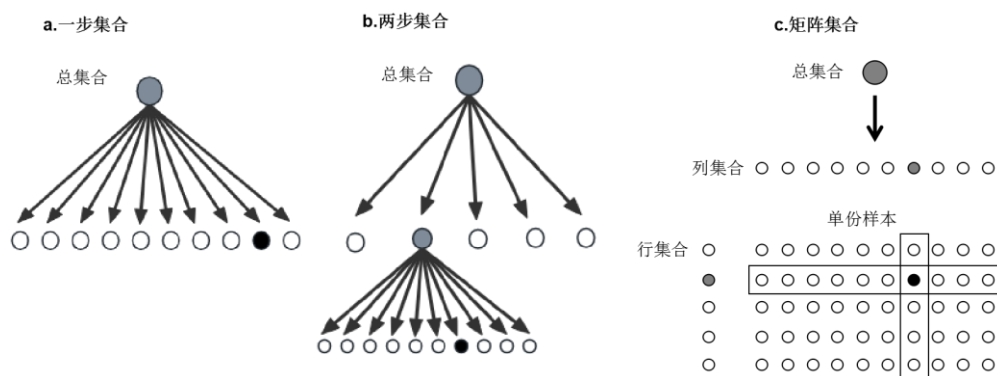


图 1 三种集合策略示意图

(a) 一步集合； (b) 二步集合； (c) 矩阵集合

集合阳性为灰色；样本阳性为黑色。在 (a) 中，若总集合为阳性，将组成总集合的每份样本单独检测，以确定阳性样本。在 (b) 中，若总集合为阳性，对组成总集合的 5 个二级集合分别检测后，将阳性的二级集合再拆分成单个样本检测，以确定阳性样本。在 (c) 中，若总集合为阳性，则检测每行和每列集合，最后将阳性行和列集合交叉处的样本进行单独检测，以确定阳性样本。

参考文献

- [1] PREISER W, van ZYL G U. Pooled testing: A tool to increase efficiency of infant HIV diagnosis and virological monitoring[J]. Afr J Lab Med, 2020, 9(2): 1035.
- [2] WESTREICH DJ, HUDGENS MG, FISCUS SA, et al. Optimizing screening for acute human immunodeficiency virus infection with pooled nucleic acid amplification tests[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(5): 1785-1792.
- [3] 宁铁林, 郑敏娜, 李龙, 等. 天津市男男性行为人群 HIV-1 急性期感染研究[J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(11): 1472-1476.

附件 2

对低病毒载量样本进行 HIV-1 基因型耐药检测的样本处理流程

1. 范围

本附件规定了低病毒载量样本用于 HIV-1 基因型耐药检测的样本处理流程，适用于低病毒载量 HIV 样本的基因型耐药检测。

2. 意义

进一步提高低病毒载量样本的耐药检测成功率，对评估患者抗病毒治疗效果具有重要意义，能够指导临床医生调整治疗方案，提升患者的治疗效果，防止耐药病毒的传播。

3. 样本要求

3.1 样本类型：静脉血样本（EDTA 抗凝管）。

3.2 样本体积：至少 5 mL。

3.3 采集时间：采集后应尽快处理，最长不超过 24 小时。

3.4 保存条件：在 4℃下短期存放，长期保存应在-80℃以下，以保持病毒 RNA 的稳定性。

4. 处理流程

4.1 超速离心法：利用高速离心力将血浆中的病毒颗粒沉淀。

提前将高速离心机温度调至 4℃备用。将大体积血浆（不得低于 500 μL，建议使用 1000 μL）加入到螺口离心管中。将加入样本的离心管在 4℃下高转速（20,000 g 以上）离心 1~2 小时。在上述过程中，病毒颗粒沉积在离心管底部，形成浓缩的病毒沉淀物。离心后弃去大部分上清，保留 150~200 μL，注意不要吸到底部沉淀。随后将沉淀物涡旋混匀震荡 10 秒或使用移液器吹打 20 次以上。瞬时离心后进行病毒 RNA 提取，之后进行基因型耐药检测。

4.2 病毒浓缩法：通过加入病毒浓缩液，使病毒沉淀。

按照商品化病毒浓缩液的使用说明书操作。通常将 1 体积的病毒浓缩液加入到 3 体积的血浆样本中（例如：将 500 μL 病毒浓缩液加入 1500 μL 血浆中）。充分混

合，在 4℃下孵育至少 4 小时或过夜。提前将高速离心机温度调至 4℃备用。在 4℃离心机中以 3000 rpm 的速度离心样品 30 分钟。小心吸出上清液，注意不要吸到底部沉淀。瞬时离心后去除残留的上清液。随后将病毒沉淀置于冰盒上，用 200 μL 缓冲液重新悬浮病毒颗粒。在 4℃以 8000 rpm 的速度离心 2 分钟，使用常规 RNA 提取方法进行病毒 RNA 提取，之后进行基因型耐药检测。

参考文献

- [1] World Health Organization. Consolidated Guidelines on HIV Prevention, Testing, Treatment, Service Delivery and Monitoring: Recommendations for a Public Health Approach[M]. Geneva: WHO, 2021.
- [2] LI Q, YU F, SONG C, et al. A Concentration Method for HIV Drug Resistance Testing in Low-Level Viremia Samples[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 2100254.
- [3] LI Q, YU F, SONG C, et al. HIV-1 Genotypic Resistance Testing Using Sanger and Next-Generation Sequencing in Adults with Low-Level Viremia in China[J]. Infect Drug Resist, 2022, 15: 6711-6722.
- [4] GUPTA S, TAYLOR T, PATTERSON A, et al. A Robust PCR Protocol for HIV Drug Resistance Testing on Low-Level Viremia Samples[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 4979252.

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 HIV 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，或者需要判定是否为 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 感染者的病毒载量水平较低，西非的一项队列研究结果显示，在未接受过抗病毒治疗的 HIV-2 感染者中，未检出 HIV-2 RNA（<10 拷贝/mL）的比例约为 46.5%，病毒载量处于 10~100 拷贝/mL、100~1000 拷贝/mL 和 1000 拷贝/mL 以上的比例分别为 35.8%、11.7%和 6.0%。因此，建议优先选择检测 HIV-2 DNA 或总核酸。未检出 HIV-2 核酸时，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。但由于 HIV-2 感染后病毒载量水平较低，应用价值有限。

3. 实验室要求

同 HIV 核酸检测和 HIV 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、定量及总核酸检测。目前美国食品药品监督管理局已注册上市了商品化的 HIV-1/2 核酸定性检测试剂，但该试剂尚未在我国还药品监督管理局注册上市。后续若有商品化 HIV-2 核酸检测试剂注册上市，按照试剂盒说明书进行 HIV-2 核酸检测。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，实时荧光定量 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-CO5 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。我国主要利用套式 PCR 扩增 HIV-2 *LTR* 和 *gag* 等基因的保守区片段，PCR 产物经测序、序列比对后用于 HIV-2 感染诊断。

4.3.1 实时荧光定量 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 法国国家艾滋病和病毒性肝炎研究所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 <i>LTR</i> 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 <i>LTR</i> 保守区	
正向引物	GCGGAGAGGCTGGCAGAT
反向引物	GAACACCCAGGCTCTACCTGCTA
探针	6-FAM-AGAGAACCTCCCAGG-NFQMGB
法国国家艾滋病和病毒性肝炎研究所，靶标 1 为 <i>LTR</i> 保守区	
正向引物 Fi2	AGCAGGTAGAGCCTGGGTGTT
反向引物 Da2	TCTTTAAGCAAGCAAGCGTGG
探针	FAM-CTTGGCCGGYRCTGGGCAGA-BHQ1
法国国家艾滋病和病毒性肝炎研究所，靶标 2 为 <i>gag</i> 基因区	
正向引物 F3	GCGCGAGAACTCCGTCTTG
反向引物 R1	TTCGCTGCCCACACAATATGTT
探针 S65GAG2	FAM-TAGGTTACGGCCCGGCGGAAAGA-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）。PCR 产物做测序后进行序列比对，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；之后又从 15 份既往 HIV-2 抗体阳性者血清或血浆样本中检出 13 份 HIV-2 核酸阳性。

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
<i>LTR</i> (U3/R)外侧引物		
正向引物 <i>LTR</i> A	CTGAGACTGCAGGGACTTTCCAGAAGGG	9379-9406
反向引物 <i>LTR</i> B	AAGCAGAAAGGGTCCTAACAGACCAGGGT	9739-9767
<i>LTR</i> (U3/R)内侧引物, 产物长度 199bp		
正向引物 <i>LTR</i> C	AGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAGGTTC	9513-9541
反向引物 <i>LTR</i> D	CCAGGCGGCGACTAGGAGAGATGGGAGCAC	9682-9711
<i>gag</i> (p16/p28)基因区外侧引物		
正向引物 <i>gag</i> A	AGGTTACGGCCCGGCGGAAAGAAAA	603-627
反向引物 <i>gag</i> B2	CCTACCCCCTGACAGGCGGTCAGCATCTCTTC	1581-1612
<i>gag</i> (p16/p28)基因区内侧引物, 产物长度 839 bp		
正向引物 <i>gag</i> C2	AGTACAGGCTAAAACATATTGTGTGGGC	628-655
反向引物 <i>gag</i> D2	CCTCAAGCTTTTGTAGAATCTATCTACATA	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, 注明 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 感染罕见, 除非有明确的流行病学证据, 基于实验室自建的实时荧光定量 PCR 方法获得的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。

参考文献

- [1] EKOUEVI D K, AVETTAND-FENOEL 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[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e129886.
- [2] DUNCAN D, DUNCAN J, KRAMER B, et al. An HIV Diagnostic Testing Algorithm Using the cobas HIV-1/HIV-2 Qualitative Assay for HIV Type Differentiation and Confirmation[J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(7): e303020.
- [3] 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]. J Clin Virol, 2013, 58 Suppl 1: e127-e133.
- [4] 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]. J Clin Virol, 2012, 55(2): 128-133.
- [5] CHANG M, WONG A J, 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]. J Clin Virol, 2017, 86: 56-61.
- [6] AVETTAND-FENOEL 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]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 3017-3022.
- [7] BERTINE M, GUEUDIN M, MELARD A, et al. New Highly Sensitive Real-Time PCR Assay for HIV-2 Group A and Group B DNA Quantification[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(9): 2850-2857.
- [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[J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(8): 1077-1081.
- [9] 贺健梅, 彭瑾瑜, 郑军, 等. 湖南省既往 HIV-2 抗体阳性血清 RNA 核酸检测结果分析[J]. 中国预防医学杂志, 2022, 23(10): 756-759.

附件 4

转基因治疗者的 HIV 感染鉴别诊断流程

1. 范围

本附件规定了对接受转基因治疗个体进行 HIV 感染鉴别诊断的意义、实验室要求、鉴别诊断方法和质量控制。

2. 转基因治疗鉴别诊断的意义

嵌合抗原受体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）T 细胞免疫疗法是目前最常用的基因治疗方法之一，治疗过程包括：采集单个核细胞、纯化 T 细胞和重新编程 T 细胞，以识别癌细胞表达的受体，从而靶向并杀死患病细胞，达到治疗疾病的目的。T 细胞通常使用 HIV-1 衍生的慢病毒或 γ 逆转录病毒载体进行重编程，由于慢病毒载体具有更可预测的整合特性，因此更常用于基因治疗。

目前已有相关报道显示接受这种特殊类型基因治疗的个体在进行 HIV-1 核酸检测时可能会出现假阳性结果。针对这一群体制定标准化 HIV-1 鉴别诊断流程将有助于减少 HIV-1 假阳性诊断，减少个体焦虑以及后续不必要的治疗。

3. 实验室要求

同 HIV 核酸检测和 HIV 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. 鉴别诊断方法

接受转基因治疗个体的 HIV-1 核酸检测会出现假阳性结果，主要由于转入个体体内的慢病毒载体包含 HIV-1 的 *LTR* 和 *gag* 基因序列，靶向 *LTR* 区和 *gag* 区的 HIV-1 核酸检测试剂可与这些序列发生特异性结合。但由于慢病毒载体转染的细胞不能转录合成 HIV 抗原以及诱导 HIV 抗体生成，故在接受转基因治疗前后，HIV 抗原和抗体检测结果为阴性。

4.1 目的：判断转基因治疗个体是否感染 HIV。

4.2 试剂：HIV 抗体筛查试剂、HIV 抗体确证检测试剂、非靶向于慢病毒载体序列的 HIV-1 核酸检测试剂。所使用试剂需经过国家药品监督管理局的批准注册。

4.3 样本：血浆、血清样本用于 HIV 血清学检测和 HIV-1 核酸检测。

4.4 检测流程

对于接受转基因治疗的个体，如果进行 HIV 检测，建议首先使用 HIV 抗体检测试剂进行筛查检测。如果抗体筛查检测有反应，进行 HIV 抗体确证试验。如果 HIV 抗体确证试验结果为不确定或阴性，使用非靶向于慢病毒载体序列的 HIV-1 定性或定量核酸检测试剂进行检测。

4.5 检测结果和解读

如果 HIV 抗体筛查检测结果无反应，可排除 HIV 感染。

如果 HIV 抗体筛查检测结果有反应，HIV 抗体确证检测结果为阳性，结合个体的流行病学史和临床症状，可确认 HIV 感染。

如果 HIV 抗体筛查检测结果有反应，HIV 抗体确证检测结果为不确定或阴性，使用非靶向于慢病毒载体序列的 HIV-1 定性或定量核酸检测试剂进行检测。如果核酸检测结果为阴性，可排除 HIV-1 感染；如果核酸检测结果为阳性，综合个体的流行病学史和临床症状，可确认为 HIV-1 急性期感染。

参考文献

- [1] LI G, ZHANG Q, LIANG T, HUANG X. Precise insertions of large DNA fragments for cell and gene therapy[J]. Science Bulletin, 2023, 68(09): 857-859.
- [2] ZHANG C, LIU J, ZHONG J F, et al. Engineering CAR-T cells[J]. Biomark Res, 2017, 5: 22.
- [3] MILONE MC, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors[J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1529-1541.
- [4] HAUSER JR, HONG H, BABADY NE, et al. False-Positive Results for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleic Acid Amplification Testing in Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy[J]. J Clin Microbiol, 2019, 58(1).
- [5] VILLALBA J A, MAUS M V, FRIGAULT M J, et al. False-Positive Human Immunodeficiency Virus Test Results in Patients Receiving Lentivirus-Based Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Case Report, Review of the Literature, and Proposed Recommendations[J]. J Infect Dis, 2022, 225(11): 1933-1936.
- [6] 钟一帆, 牛姬飞, 李越, 等. 重度地中海贫血患者接受基因治疗后出现 HIV-1 核

酸检测结果假阳性 1 例[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(04): 451-454.

附件 5

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，对接受者的检测。

2. 检测的意义

- 2.1 判断接受者是否输入了 HIV 抗体
- 2.2 判断输入性 HIV 抗体在接受者体内的动态
- 2.3 判断接受者是否发生了 HIV 感染

3. 实验室要求

同 HIV 抗原抗体检测和 HIV 核酸检测。

4. 检测方法及程序

4.1 样本：接受者的血清或血浆。应在输入基线（输入后立即采样）、输入后 4~6 周和输入后 3 个月采集样本，使用相同的检测方法和检测试剂，比较不同时间点的检测结果。

4.2 HIV 抗体或 HIV 抗原抗体筛查检测

- 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：采用经国家药品监督管理局批准注册的 HIV 抗原抗体联合检测试剂或 HIV 抗体检测试剂，包括酶联免疫吸附试验、化学发光实验试验、免疫荧光试验。
- 4.2.3 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。
- 4.2.4 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。

4.3 HIV 抗体确证检测：

4.3.1 目的：检测有无 HIV 抗体输入及输入抗体的动态变化。

4.3.2 试剂：采用经国家药品监督管理局批准注册的 HIV 抗体免疫印迹（WB）试剂或者线性免疫印迹（LIA）试剂。

4.3.3 定性检测：按照试剂盒说明书操作，记录检测的带型，判断 HIV 抗体阳性、不确定或阴性。

4.4 HIV 核酸检测：

4.4.1 目的：判断接受者是否被 HIV 感染。

4.4.2 试剂：采用经国家药品监督管理局批准注册的 HIV 定性或定量检测试剂。

4.4.3 定性检测：定性检测 HIV-1 RNA 或 HIV-1 前病毒 DNA，按照说明书操作，结果判断为阳性或阴性。

4.4.4 定量检测：定量检测 HIV-1 RNA，按照说明书操作和进行结果报告。

5. 结果解释和报告

5.1 有无 HIV 抗体输入：对输入后基线的样本，HIV 抗体或 HIV 抗原抗体筛查检测和 HIV 抗体确证检测的结果满足 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：对输入基线、输入后 4~6 周和输入后 3 个月的样本进行检测，通过 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，判断 HIV 抗体发生衰减。

5.3 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 抗体持续阳性并出现滴度升高。

参考文献

- [1] DELANEY K P, HANSON D L, MASCIOTRA S, et al. Time Until Emergence of HIV Test Reactivity Following Infection With HIV-1: Implications for Interpreting Test Results and Retesting After Exposure[J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(1): 53-59.
- [2] HURT CB, NELSON J, HIGHTOW-WEIDMAN LB, et al. Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers[J]. Sex Transm Dis, 2017, 44(12):

739-746.

- [3] Centers for Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for Antiretroviral Postexposure Prophylaxis After Sexual, Injection Drug Use, or Other Nonoccupational Exposure to HIV— United States, 2016[M]. USA: CDC, 2016.