

全国艾滋病检测实验室质量控制指南



中国疾病预防控制中心

二〇二四年十月

前 言

艾滋病检测工作是艾滋病各项防控工作的基石，在感染者的早期发现、准确诊断、治疗效果评估、分子流行病学研究以及疫情流行监测工作中均发挥着重要的技术支撑作用。随着我国艾滋病检测工作的持续发展和艾滋病检测服务可及性的不断扩大，艾滋病检测实验室数目逐年增长，检测能力不断下沉。承担艾滋病检测工作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、出入境检验检疫、军队等各个系统。

检测实验室的全面质量控制对获得客观、公正、科学的检测结果非常重要，检测质量水平的高低，反映了实验室的综合实力。为进一步规范和提升我国艾滋病检测实验室的工作质量，保证艾滋病检测结果的准确性和可靠性，中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心组织专家编写了《全国艾滋病检测实验室质量控制指南》（以下简称《指南》），从实验室质量管理和生物安全管理、室内质量控制和室间质量评价三个层面，为艾滋病检测实验室所开展检测项目的质量控制策略和质量控制措施进行了系统全面的技术指导。

本《指南》的编写依据我国病原微生物检测实验室和艾滋病检测工作管理的相关法律和法规，遵照检测和校准实验室能力的通用要求和在相关领域的应用说明，参考世界卫生组织和发达国家关于艾滋病检测质量控制的最新指南以及技术指导文件，充分考虑了我国艾滋病检测工作特点和实验室能力，并广泛征集了艾滋病检测和防治领域专家的意见。将为各级艾滋病检测实验室做好质量管理和质量控制工作、持续提升检测能力，提供切实的技术指导文件。

本《指南》由中国疾病预防控制中心批准，下发至全国各级艾滋病检测实验室及有关单位。本《指南》的发布将为提升我国艾滋病检测实验室的质量管理水平和质量控制能力提供有力的技术支撑，为全面推动开展各项艾滋病检测和防控工作提供坚实助力。

本《指南》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《指南》参加编写和审核单位：中国疾病预防控制中心、国家卫生健康委临床检验中心、中国食品药品检定研究院、中国检验检疫科学研究院卫生检验与检疫研究所、军事科学院军事医学研究院、北京协和医院、首都医科大学附属北京地坛医院、中国医学科学院肿瘤医院、中国医科大学附属第一医院、中国科学

技术大学附属第一医院、解放军总医院第三医学中心、北京市红十字血液中心、北京海关、云南省疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、陕西省疾病预防控制中心、湖南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、重庆市疾病预防控制中心、天津市疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心。

本《指南》技术顾问：尚红、蒋岩

本《指南》编写组人员：金聪、邢文革、邱茂锋、王露楠、许四宏、李敬云、韩扬、王雅杰、邢辉、马春涛、潘品良、姚均、廖玲洁、李林、杨晓莉、张绍福、马艳玲、钟平、徐晓琴、任强、贺健梅、梁姝、林怡、刘春华、周全华、袁丹、宁铁林、辛若雷、张佳峰、张辉、吕毅

本《指南》审核专家：刘中夫、韩孟杰、谭枫、李振军、胡孔新、高勇、王懋杰、姜拥军、耿文清、葛红卫

本《指南》自发布之日起实施。

本《指南》适用于全国各级艾滋病检测实验室。

本《指南》解释权属于中国疾病预防控制中心。

目 录

第一篇 艾滋病检测实验室的质量管理和生物安全管理	1
第一章 艾滋病检测实验室的质量管理	1
第一节 实验室质量管理要素	1
第二节 人员培训和能力评估	3
第三节 实验室环境分区和设施	5
第四节 设备的使用和管理	6
第五节 检测方法的选择和验证	10
第六节 试剂的验收和保存要求	14
第七节 样本的采集、运送、接收和保存	18
第八节 实验室信息管理	21
第九节 文件和记录	23
第二章 艾滋病检测实验室的生物安全管理	27
第一节 实验室生物安全管理要素	27
第二节 艾滋病检测实验室生物安全风险评估和控制措施	29
第三节 艾滋病检测实验室的个人防护	32
第四节 艾滋病检测实验室的消毒和废弃物处理	34
第五节 意外事故发生的处理和职业暴露的处置	36
第二篇 艾滋病检测的室内质量控制	42
第一章 总论	42
第一节 室内质量控制要素	42
第二节 室内质控品选择	44
第三节 室内质控规则和质控图	46
第四节 室内质控失控分析与处理	50
第五节 室内质控数据的管理	51
第二章 抗体和抗原检测的室内质量控制	54
第一节 筛查检测	54
第二节 抗体确证检测	58
第三节 新近感染检测	60

第三章 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的室内质量控制	62
第一节 基于流式细胞术的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测	62
第二节 CD4+ T 淋巴细胞计数即时检测	66
第四章 核酸检测的室内质量控制	70
第一节 HIV-1 RNA 检测	70
第二节 HIV-1 DNA 检测	71
第三节 HIV-1 核酸即时检测	73
第五章 基因型耐药检测的室内质量控制	77
第一节 获得耐药基因片段	77
第二节 基因序列测定和质量评价	79
第三节 序列比对和耐药位点判读	82
第三篇 艾滋病检测的室间质量评价	90
第一章 总论	90
第一节 室间质量评价要素	90
第二节 室间质量评价质控品的选择	91
第三节 室间质量评价质控品的制备和评价	92
第四节 室间质量评价的组织	94
第五节 结果统计分析和评价	96
第六节 室间质量评价结果的应用	97
第二章 抗体和抗原检测的室间质量评价	101
第一节 筛查检测	101
第二节 抗体确证检测	101
第三节 新近感染检测	102
第三章 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的室间质量评价	106
第四章 核酸检测的室间质量评价	108
第五章 基因型耐药检测的室间质量评价	110

第一篇 艾滋病检测实验室的质量管理和生物安全管理

为推动艾滋病检测工作的高质量发展，实验室质量管理和生物安全管理密不可分、缺一不可。根据我国对病原微生物检测实验室质量管理和生物安全管理的相关法律、法规、规章、技术标准、指南、规范等文件，结合艾滋病检测工作实践，本篇对开展艾滋病病毒、艾滋病抗体及相关免疫指标检测的艾滋病检测实验室的质量管理和生物安全管理进行介绍。

第一章 艾滋病检测实验室的质量管理

检测实验室的全面质量管理对获得客观、公正、科学的检测结果非常重要，检测质量水平的高低，反映了一个实验室的综合实力。为保证实验室的有效运作和检测质量，本章首先介绍了实验室质量管理要素，随后重点从人员、环境和设施、设备、检测方法、试剂、样本、信息管理、记录文件和结果报告等关键环节对艾滋病检测实验室的质量管理要求进行介绍。

第一节 实验室质量管理要素

质量管理是实验室在检测质量方面主导和组织的一系列活动的统称，包括确定质量方针、目标和职责，以及在质量体系中通过质量策划、质量控制、质量保证和质量改进等管理职能的所有活动。质量管理需要实验室的所有部门和人员以质量为核心，把专业技术和管理技术集合在一起，建立起一套科学、严密、高效的质量保证体系。因此质量管理是全过程和全员参与的管理，需要在检测的各个环节和阶段做到高质量的管理。

1. 人员

质量管理要求把质量控制工作落实到每一名实验室人员。人员的因素在质量形成过程中起着十分重要的作用，其中实验室负责人是关键，要依靠实验室负责人做好计划、组织、控制和协调等工作，形成强大合力推动检测工作的质量不断提高。另外，实验室应设置技术负责人，负责对所开展检测项目进行检测偏差的识别；应设置独立于检测活动的质量保证人员，负责日常检测活动的质量管理和监督。实验室还应配置与检测工作

岗位和工作量相适应的技术人员，并保证技术人员得到相关培训。

2. 环境设施

实验室需要针对开展的检测项目，设置与其相匹配的环境设施，环境设施不只是保证安全的要素，对于保证检测质量也相当重要。比如，核酸检测实验室的合理分区以及人员、物品的单一流向设计对防止检测中因核酸污染导致错误结果发生至关重要。

3. 设备

实验室得到可靠检测结果的前提是所使用检测设备的稳定性。应重点关注设备的使用环境、使用期限、使用频率和运行状况、设备是否在校准周期内、设备历次校准的结果及变化趋势、以及设备的日常维护保养及期间核查等情况。

4. 试剂与耗材

为保证检测结果的可靠性，实验室应建立试剂与耗材的评估、选购、确认、保存、使用、监控以及库存管理程序，以保证试剂与耗材的质量。对于关键检测试剂，每一批次试剂应在进行技术性验收后，再开展检测工作。

5. 检测方法

检测方法的选择和验证是检测质量控制的重要基础。实验室应确保开展的检测项目以及所使用检测方法的分析性能满足检测需求、保证检测结果准确。实验室在开展检测项目之前，应对所选用的检测方法进行系统的性能评价或对其技术性能进行验证，以明确实验室是否能够正确运用该方法以及确保该方法满足检测需求。

6. 质量保证

实验室质量负责人要设计建立室内质量控制体系，需注意覆盖所有检测项目和参与检测的人员，并且应根据实验室开展项目的检测量设计相适应的质控频次。室内质量控制可以采用人员比对、设备比对、留样再测、盲样测试、质控图等不同方式开展。每次实验除加入试剂盒自带的质控品（通常称内部对照质控品）之外，应加入实验室的外部对照质控品，外部对照质控品可购买商业质控品，也可按照检测项目的相关要求自制。质量监督应覆盖全部检测过程，包括从样本接收到发出检测报告的全过程，是对检测全过程参与人员工作符合情况的监督。实验室应设立质量监督员，制定定期的质量监督计划开展监督工作，对发现的不符合情况及时纠正，防止对检测结果产生影响。

艾滋病检测实验室每年应至少参加一次由权威机构组织的能力验证或上级实验室组织的室间质量评价活动。参加外部质控活动对实验室保持稳定的检测能力水平，特别

是避免产生系统性偏差非常重要。

7. 信息系统

实验室信息系统是对检测标本采集和接收、检测过程、结果记录、质量控制等各个方面的相关数据进行综合管理的信息系统，可在整体上提高实验室的检测效率和工作质量。随着实验室信息系统的应用和普及，实验室需要建立规范的实验室信息管理体系，以保证良好的运行和维护，保证数据信息的安全可靠。

8. 文件控制

实验室应组织全体人员共同完成质量管理相关程序或文件的制定，尤其要注意的是管理文件应包括生物安全规章制度，确保实验室生物安全（详见本篇第二章）。制定的程序或文件应通过正式审批，并应组织全体人员学习和遵照执行。实验室制定的程序或文件还应定期审查，保证其与所承担检测工作的适应性，同时应保证所有人员都使用最新有效的版本。

第二节 人员培训和能力评估

实验室负责人应根据检测工作的复杂程度，对从事艾滋病检测工作的人员进行人员资质筛选，符合要求的人员经过专业培训并考核合格后，可以进行授权并颁发上岗证。只有获得上岗资格的人员才能开展工作，同时还需要对检测人员的检测技术能力进行持续评估。

1. 人员资质

实验室应制定程序文件对人员进行管理，并保留人员相关教育和专业资质、培训、经历和能力评估等记录以证明满足相关要求。这些记录应随时可供相关人员利用，并应包括（但不限于）以下内容：（1）教育和专业资质；（2）证书或执照的复件（适用时）；（3）以前的工作经历；（4）岗位描述；（5）新员工入岗前介绍；（6）当前岗位的培训记录；（7）能力评估记录；（8）继续教育记录；（9）员工表现评估记录；（10）事故报告和职业危险暴露记录；（11）免疫接种情况（与指派的工作相关时）。实验室应对所有人员的岗位进行描述，包括职责、权限和任务。

从事艾滋病检测的技术人员在上岗前，应参照《全国艾滋病检测工作管理办法》中的相关要求获得上岗资格，具体如下：

1.1 从事艾滋病抗体筛查检测的人员，应接受过县级及以上的检测技术、实验室质

量控制及生物安全培训并进行考核，经考核合格后方可从事检测工作。

1.2 从事艾滋病抗体补充检测和 CD4+ T 淋巴细胞检测的人员，应接受过市级及以上的检测技术、实验室质量控制及生物安全培训并进行考核，考核合格后方可从事检测工作。

1.3 从事艾滋病感染性样本核酸检测和基因型耐药检测的人员，应当经省级及以上卫生健康部门指定机构进行检测技术、实验室质量控制及生物安全培训并进行考核，考核合格后方可从事检测工作。

2. 人员的持续培训

检测人员上岗工作后，应定期参加常规专业技术或其他相关检测专业的培训及相关活动。实验室除对检测人员提供持续性技术培训外，还应为所有人员提供持续性质量培训，可包括但不限于以下内容：（1）质量管理体系；（2）所承担检测工作的过程和程序；（3）适用的实验室信息系统；（4）人员健康与安全；（5）伦理；（6）患者信息的保密。

实验室应对从事管理和技术工作的人员制定继续教育的培训计划，包括实验室外部和内部培训，检测人员均应参加继续教育培训，实验室负责人应定期评估继续教育计划的有效性。

3. 能力评估

实验室应制定人员检测能力评估的内容、方法、频次和评估标准，评估其胜任所分配的管理或技术工作的能力。能力评估应覆盖工作人员承担的所有检测项目，可以利用人员比对、设备比对、标准品、留样再测、盲样测试、现场演示、现场提问等日常室内质量控制的结果，也可以综合利用参加外部能力验证或室间质量评价的结果进行检测人员能力评估。

评估工作间隔以不超过 1 年为宜。对新进员工，尤其是从事艾滋病抗体确证检测、核酸检测和耐药检测等复杂操作试验的人员，在最初 6 个月内应至少进行 2 次能力评估。当岗位变更，或离岗 6 个月以上再上岗，或检测标准、程序、技术有变更时，都应对员工进行再培训和再评估，评估合格后方可继续上岗，并保存相关记录。根据定期评估结果，必要时应进行再培训。评估标准应根据不同检测工作的复杂程度制定，比如耐药检测工作，以对混合碱基的判读等关键环节进行考核评估。

第三节 实验室环境分区和设施

实验室应具备相应的建筑区域以开展检测活动。《人间传染的病原微生物目录》中明确人免疫缺陷病毒（HIV）危害程度属于二类，开展 HIV 的分离培养与扩增、浓缩与纯化、中和试验等活动，需在符合生物安全防护水平三级（BSL-3）的实验室中进行；开展艾滋病血清学检测、免疫学检测、核酸检测、基因型耐药检测等实验活动，需在符合生物安全防护水平二级（BSL-2）的实验室中进行；对采样量不超过 100 微升的血液样本进行即时检测（仅需将样本和缓冲液加入试剂卡，无需额外实验操作即获得结果），应遵从国家卫生健康委有关规定。

艾滋病检测实验室所在机构应设置足够空间以满足样本保存和实验用试剂耗材的储存，如有条件可单独设置血清库、冷库、消毒间等辅助建筑区域。各区域的划分一般遵循从清洁区到污染区的单一流向原则。

1. 血清学和免疫学检测实验室的环境和设施

1.1 血清学、免疫学检测实验室的环境和设施应符合 BSL-2 实验室有关规定。如有条件可设置艾滋病检测专用的血清学、免疫学实验室，也可与其它非高致病性病原的检测共用实验室。血清学、免疫学检测实验室空间设置的一般性原则包括：（1）实验室应有样本接收区、样本存放区、样本处理区、样本检测区、结果分析和发布区、资料存放区（实验室档案）等区域；（2）实验室空间规划应参考仪器制造商提供的主机及其附属设备的尺寸；（3）样本检测和数据分析可以在同一实验室或不同实验室进行。

1.2 对于不具备 BSL-2 检测实验室条件，仅对采血量小于 100 微升的血液样本或无感染性的尿液和口腔黏膜渗出液样本开展快速抗体检测的艾滋病检测点，环境和设施应满足以下要求：（1）检测点所在房间应设有表面平整、易操作快速抗体检测的工作台，房间应具有充足的采光和照明；（2）检测点所在房间温度可控，开展快速抗体检测时，保证室内温度可达到快速检测试剂盒说明书要求；（3）需配备快速抗体检测所需物品，至少包括安全防护用品、一次性消耗品、消毒与污物处理设备。

2. 核酸检测和病毒基因测序实验室的环境和设施

根据检测项目和检测设备的特点，艾滋病核酸检测和病毒基因测序实验室可分为集中布置形式和分散布置形式，总体布局需因地制宜、方便工作。

2.1 原则上，艾滋病核酸检测和病毒基因测序基因扩增检验实验室应设置以下区域：试剂储存和准备区、样本制备区、核酸扩增区、扩增产物分析区。这四个区域在物理空

间上应相互独立，无论是在空间上还是在使用中，应始终处于分隔状态，不能有空气直接相通。如具备条件，各区域内可分别设置缓冲间，以保证不同区域之间完全分隔。

四个区域的功能和环境设施要求如下：

2.1.1 试剂储存和准备区：用于试剂的贮存、配制、分装和保存，以及准备扩增反应混合液。试剂储存和准备区应保持相对正压，使空气流向始终由室内向外，以避免扩增污染物进入此区域。

2.1.2 样本制备区：用于样本登记、处理、分装、核酸（RNA、DNA）提取、贮存及其加入至扩增反应管。样本制备区的压力应相对于邻近区域为负压，以防止潜在的病原微生物或核酸气溶胶泄漏到外部环境。

2.1.3 核酸扩增区：用于 cDNA 合成、DNA 扩增及检测。核酸扩增区应相对于邻近区域为负压，使空气流向始终由室外向内，以防止扩增产物造成其他区域的交叉污染。

2.1.4 扩增产物分析区：用于对扩增核酸片段的进一步分析和测定，可以设在远离其他各区的地点。扩增产物分析区应相对于邻近区域为负压，使空气流向始终由室外向内，以防止扩增产物造成其他区域的交叉污染。

为避免在某一区域产生的核酸污染扩散到其他区域，应注意：（1）设置为负压的工作区，气压应由走廊向缓冲间、核心工作间方向递减，形成定向气流趋势。（2）严格要求各区的人员流向和物流，工作时须遵循试剂储存和准备区→样本制备区→核酸扩增区→扩增产物分析区的单一工作流向进行。（3）各区的仪器设备以及各种物品必须专用于所在区域，不能拿到其他区域交叉使用。

2.2 根据检测项目和检测设备的类型和特点不同，四个区域可适当合并。例如使用实时荧光 PCR 仪时，扩增区和扩增产物分析区可合并，共设置三个工作区，即试剂准备区、样本制备区和核酸扩增分析区。当采用样本处理、核酸提取及扩增检测集成一体化的全自动核酸检测分析设备时，标本制备区、扩增区和扩增产物分析区可合并，共设置二个工作区，即试剂准备区和自动检测区。

第四节 设备的使用和管理

设备管理是实验室质量管理体系的一项重要内容，良好的实验室设备管理是确保实验室检测结果准确的关键环节。艾滋病检测实验室应建立设备管理程序，对设备的选择、采购、安装、校准和性能评价、维护、故障处理、维修以及报废处置等流程予以明确。

1. 设备的验收

设备验收是证明设备在实验室环境下能够按照操作说明书所描述的功能正常运行，运行技术指标符合设计要求，是设备验证的环节之一，通常在设备完成采购、安装后实施。设备验收分为形式验收和性能/技术验收，形式验收主要对采购设备的数量、外观、配件配置等进行核查。性能/技术验收内容包括对设备进行功能测试、固定参数测试、数据存储/备份/存档的安全性核查。艾滋病检测实验室在开展设备功能测试或验证时，可使用厂商提供的测试样本、实验室已知定值的测试样本，将结果与预期值或认证值进行比较。如果设备受温度控制，例如 PCR 仪，需确定温度的稳定性和一致性。

设备验收完成后，在投入正式使用前，实验室应根据制造商提供的相关设备资料结合实验室具体工作要求，制定设备的操作维护规程，并对人员进行培训。

2. 设备的检定、校准和维护

如果设备属于国家规定应接受强制检定的计量器具，应按相关文件要求进行检定。实验室应评估每台设备对结果有效性和计量溯源性的影响，合理地确定是否需要校准。对不需要检定和校准的设备，实验室应定期核查其状态是否满足使用要求。对校准服务不可及的设备，应定期请厂家或供应部门进行维护。实验室所涉及的计量器具和测试仪器均应建立管理与登记制度。

艾滋病检测实验室常用检测设备的维护和校准要求见表 1-1-1。

表 1-1-1 艾滋病检测实验室常用设备的维护、校准要求

设备名称	维护要求和频次	校准要求和频次
1. 通用设备		
生物安全柜	<p>使用前后的维护：用 75%的乙醇溶液彻底对安全柜内部工作区域表面、侧壁进行表面净化。不要使用含氯消毒剂。检查警报并检测基本气流。</p> <p>定期维护：根据使用频次，定期用 75%的乙醇溶液彻底对排水槽进行清洗。用湿布对安全柜外部表面进行擦拭，尤其是安全柜的前面和上部。检查所有维护配件的合理使用情况。每年由具备资格的认证技术人员对安全柜进行维护，并检测紫外灯的照度。</p>	<p>检测频次：</p> <ol style="list-style-type: none">1) 一年 1 次；2) 安装后，投入使用前（包括生物安全柜被移动位置后）；3) 更换高效空气过滤器或内部部件维修后。 <p>检测项目：</p> <p>至少应包括垂直气流平均速度、气流模式、工作窗口气流平均速度、送风高效过滤器检漏、排风高效过滤器检漏、工作区洁净度。</p>

高压灭菌器	<p>使用前后的维护:由经过培训合格的人员操作,整个灭菌过程应由专人看管。等待蒸汽排出,将排气阀打下后离开。高压前应检查进汽口是否堵塞,灭菌桶内水位是否正常。</p> <p>日常维护:灭菌器的外表及灭菌室内要定期清洗以保持清洁干燥。探头、水位计要定期清洗。</p>	<p>检测频次:</p> <p>1) 一年 1 次; 2) 安装后,投入使用前; 3) 内部部件维修后。</p> <p>检测项目:</p> <p>灭菌效果检测(化学指示卡,每次运行时)、生物效果检测(生物指示剂,至少每 3 个月 1 次)、B-D 检测(至少每 3 个月 1 次,带预真空自动程序和自检通过后才进入灭菌程序的除外)。压力表检定(半年 1 次)和安全阀检定(一年 1 次)</p>
移液器	<p>使用前后的维护:使用时应检查是否有漏液现象。使用正确的方法安装吸头,切记不能用力过猛。当移液器吸嘴内有液体时,严禁将移液器水平或倒置放置,以防液体流入活塞室腐蚀移液器活塞。如果长时间不使用,要把移液器的量程调至最大刻度,让弹簧处于松弛状态,以保护弹簧。</p> <p>日常维护:定期对移液器进行外部清洁与去污染,查看有无出现任何损坏</p>	<p>检测频次:</p> <p>每年至少 1 次。</p> <p>检测项目:</p> <p>吸取液体体积的准确度和精确度</p>
离心机	<p>使用前后的维护:使用前完成设备自检;使用后注意将离心机盖打开,使离心中产生的热量和水气自然蒸发。</p> <p>日常维护:仪器较长时间不使用应将主电源插头取下。维护项目包括:对电机主轴涂少许中性润滑油脂保护;清洁润滑转头腔体垫圈;检查散热器是否受阻等。</p>	<p>检测频次:</p> <p>每年 1 次。</p> <p>检测项目:</p> <p>离心机转速值。冷冻离心机的校准还应包括温度参数。</p>
冰箱	<p>日常维护:每日记录冰箱温度,可使用冷链监控设备监测记录温度。保持冰箱四周区域清洁干净。定期清理散热过滤网(建议每季度一次,环境多尘时每两月一次)。</p>	<p>检测频次:</p> <p>冰箱温度记录设备(温度计、监测仪等)每年 1 次。</p>
2. 血清学检测设备		
酶标仪	<p>日常维护:每个工作日核对滤光片波长;定期(每年至少 1 次)检查、清洗滤光片,如果出现破裂或霉点须更换。</p>	<p>检测频次:</p> <p>至少每年 1 次。</p>
洗板机	<p>日常维护:每个工作日检查洗板机管道是否通畅,是否有漏液现象;定期(至少每月 1 次)检查洗板机洗涤时各孔是否与相应的冲洗头对位良好;负压是否符合规定要求。</p>	<p>检测频次:</p> <p>至少每年 1 次。</p>

化学发光仪	日常维护： 根据仪器设备或检测试剂的要求，定期对仪器设备进行定标校准。完成日保养、周保养、月保养等维保项目。	检测频次： 至少每年 1 次，可请厂家进行校准。
全自动酶免仪	日常维护： 每次使用前完成设备自检，检查洗板机管道是否通畅。	检测频次： 根据酶标仪、洗板机的要求进行检定
全自动免疫分析仪	日常维护： 定期（每周至少 1 次）检查样本及试剂加样管道是否通畅，是否与 WB 反应槽对位良好。	检测频次： 至少每年 1 次。
3. CD4+ T 淋巴细胞检测设备		
流式细胞仪	日常维护： 每次开机时，首先采用荧光微球光路质控品设置和调整仪器光学检测通道的电压和增益，确保其处于厂家或实验室根据特定的实验状态所设定的可接受范围内，并且保持每次开机时仪器性能稳定。开机前应添加鞘液和清洗液，及时清空废液；关机前应清洗管路和上样装置；及时排除流动室气泡。当仪器长时间停机后第一次开机、仪器稳定性验证不通过、数据获取时散点图中的碎片或计数明显增加而无法去除时也应执行日常清洗程序。	检测频次： 仪器整体保养半年 1 次。光电倍增管（PMT）每月检测 1 次。
即时 CD4 检测设备	日常维护： 每次开机时，应使用仪器自带内质控检测，符合要求方可对样本进行检测；每次使用后应按设备使用说明书清洁仪器。	检测频次： 仪器整体保养至少每年 1 次。
4. 核酸检测和基因序列测定设备		
核酸提取仪	日常维护： 每次开机后应使用仪器自带的维护程序进行检测，维护程序完成后对样本进行提取；实验结束后，使用 75%乙醇清洁实验舱，并开启紫外灯照射 30 分钟以上进行消毒；定期清洁仪器表面及实验舱，避免使用强碱、浓酒精和有机溶剂；不要在电压不稳、过高或过低时使用仪器；保持实验舱内环境较为干燥，无水渍等。	检测频次： 检测间隔不应超过 1 年。 检测项目： 温度示值误差、温度均匀性、温度稳定性、振动频率示值误差、振动频率稳定性、取液量示值误差、取液量重复性、取液量一致性、核酸提取回收率一致性、核酸提取回收率重复性、核酸提取回收率。
PCR 扩增仪	日常维护： 使用洁净抹布清洁仪器外观，避免灰尘落入反应装置；根据制冷方式，至少半年 1 次定期维护检测	检测频次： 每年 1 次； 检测项目： 检测孔温度的准确度，孔间温度差，。

荧光 PCR 仪	日常维护: 使用洁净抹布清洁仪器外观, 避免灰尘落入反应装置。样本孔 3 个月清洁 1 次; 由专业工程师每半年或一年 1 次对热循环组件和光路系统, 进行维护保养。	检测频次: 每年 1 次; 检测项目: 检测孔温度的准确度, 孔间温度差, 不同激光的荧光强度。
测序设备	日常维护: 每周至少一次, 对设备表面进行清洁, 检查设备各部件是否正常工作。定期对软件进行更新, 确保正常使用。	检测频次: 复检间隔不应超过 1 年。 检测项目: 高通量测序仪的读长总数重复性、GC 含量占比偏差、序列覆盖率、序列准确率、序列相对丰度偏差等。

第五节 检测方法的选择和验证

实验室需根据检测目的和检测方法特性, 选择适宜的检测方法, 并经过验证后方可常规使用。本章将对检测方法的特点、验证时机及验证方法进行阐述。

1. 艾滋病检测方法的特点和选择

艾滋病实验室检测主要包括 HIV 抗体检测或 HIV 抗体抗原联合检测、HIV-1 核酸检测 (分为定性和定量检测)、HIV-1 基因型耐药检测及 CD4+ T 淋巴细胞计数检测等。其中 HIV 抗体检测、HIV 抗体抗原联合检测、HIV-1 核酸检测和 CD4+ T 淋巴细胞计数检测试剂必须是经国家药品监督管理局注册、在有效期内的试剂。目前我国 HIV-1 基因型耐药检测可采用商品化试剂盒和实验室自建 (In-house) 两种方法。

1.1 血清学检测方法的特点

表 1-1-2 血清学检测方法的特点

血清学检测方法		特点
筛查试验方法	酶联免疫吸附试验	应用范围广、无放射性核素污染 干扰物质和影响因素较多; 试剂需特定条件存放; 手工操作的精密度相对较低
	化学发光或免疫荧光试验	检测时间短、检测范围宽、单份检测灵活、自动化程度高的同时仪器依赖性大, 检测成本较高; 试剂需特定条件存放
	快速检测试验	检测成本低、操作简便、检测时间短、单份样本检测灵活、结果判读偏主观性且不易保存
补充试验方法	免疫印迹试验 条带/线性免疫试验	分析容量大、特异性强、检测成本较高、结果判读偏主观性且不易保存

1.2 CD4+ T 淋巴细胞检测方法的特点

目前，CD4+ T 淋巴细胞计数的方法分为两大类，一类是流式细胞仪测定法，另一类是非流式细胞仪测定法。流式细胞仪测定法又可分为双平台法和单平台法。双平台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。该方法需要两种仪器，因而结果的重复性和准确性影响因素较多，不同实验室差异较大；操作步骤复杂、操作人员多、且费时。单平台法即为应用三色、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。单平台法可最大程度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。

1.3 核酸检测方法的特点

目前经国家药品监督管理局注册的 HIV-1 核酸定性和定量试剂基本采用实时荧光定量 PCR 方法，灵敏度和特异性高，检测平台通用性较好。

用于 HIV-1 基因型耐药检测的方法已有商品化基因型耐药自动检测方法，以及各实验室根据检测工作需求自建的方法。与商品化试剂盒相比，自建方法的检测结果准确性无显著性差异且检测成本更低，因此被广泛选择应用。

2. 检测方法的验证

2.1 验证时机

2.1.1 在实验室引入新的检测方法进行常规应用前，应进行检测方法的验证。

2.1.2 现用检测方法的任一要素发生变更后，如试剂升级、仪器更新、校准品溯源性改变等，也应按照新引入检测方法的情况进行检测方法的验证。

2.1.3 任何严重影响检测方法分析性能的情况发生后，应在检测方法重新启用前对受影响的分析性能进行验证。影响检测方法分析性能的情况包括但不限于：仪器主要部件故障、仪器搬迁、设施和环境的严重失控等。

2.2 定性检测的验证方法

2.2.1 验证参数及要求

定性检测方法的验证参数应至少包括方法学符合率。方法学符合率的验证应通过与参比方法进行比较。参比方法包括但不限于：金标准方法、经验证性能符合设定标准且日常室内质控和室间质评/能力验证合格的在用检测方法等。

此外，实验室应根据不同检验项目的预期用途，选择对检验结果质量有重要影响的参数进行验证，如检出限、精密度、临界值、抗干扰能力等。不同技术平台、样本类型以及预期用途不同时，所需验证的性能指标宜有所侧重。

2.2.2 验证方案

(1) 样本

免疫学定性检测方法：宜选取阴性样本 10 份（包含至少 5 份其他标志物阳性的样本）、阳性样本 10 份（包含至少 5 份浓度在 cut-off 值和 2~4 倍 cut-off 值之间的弱阳性样本，1 份极高值阳性），共 20 份样本，随机选取每 4 份样本分成一组。

分子生物学定性检测方法：宜选取阴性样本至少 5 例，阳性样本不少于 10 例（宜包含弱阳性/低扩增的样本）。

(2) 方法

采用参比方法和候选方法平行检测。将所有检测结果按下表汇总填表，计算符合率。

表 1-1-3 方法符合率验证

		参比方法		总数
		阳性	阴性	
候选方法	阳性	a	b	a+b
	阴性	c	d	c+d
总数		a+c	b+d	a+b+c+d

$$\text{阳性符合率} = a / (a+c) \times 100\%$$

$$\text{阴性符合率} = d / (b+d) \times 100\%$$

$$\text{总符合率} = (a+d) / (a+b+c+d) \times 100\%$$

(3) 可接受标准

可接受标准为所用厂商检验方法（候选方法）的标准。若无可用的厂商标准时，可根据实验室检测方法的预期用途制定实验室方法验证的可接受标准。

2.3 定量检测的验证方法

2.3.1 验证参数及要求

定量检测方法的验证参数应至少包括正确度和精密度。此外实验室应根据不同检验项目的预期用途，选择对检验结果质量有重要影响的参数进行验证，如方法符合率、检

出限、线性区间、抗干扰能力等。不同技术平台、样本类型以及预期用途不同时，所需验证的性能指标宜有所侧重。

2.3.2 验证方案

2.3.2.1 正确度

实验室可采用偏移评估等方式进行验证。

(1) 样本

按照如下优先顺序选用具有互换性的标准物质，或基质与待测样本相类似的标准物质：

1) 有证标准物质，包括国家标准物质、国际标准物质、CNAS 认可的标准物质生产者提供的有证标准物质、与我国签署互认协议的其他国家计量机构，如 NIST、JSCC，提供的有证标准物质等；

2) 标准物质，如厂商提供的工作标准品；

3) 正确度控制品；

4) 正确度验证室间质评样本，如 CNAS 认可的能力验证提供者所提供的正确度验证样本。宜根据测量区间选用至少 2 个浓度水平的标准物质样本。

(2) 方法

每个浓度水平的标准物质样本至少每天重复测定 2 次，连续测定 5 天，记录检测结果。计算全部检测结果的均值和偏倚，偏倚=结果均值-参考值。

(3) 可接受标准

可接受标准为所用标准物质的使用标准。若无可用的使用标准时，可根据实验室检测方法的预期用途制定实验室方法验证的可接受标准。

2.3.2.2 精密度

精密度指在规定的测定条件下，同一份样本，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。精密度包括重复性和中间精密度。在相同条件下，由同一个分析人员测定所得结果的精密度称为重复性。在同一个实验室，不同时间由不同分析人员用不同设备测定结果之间的精密度，称为中间精密度。

(1) 样本

可采用新鲜或冻存的样本。当样本中待测物不稳定或样本不易得到时，也可考虑使用基质与实际待检样本相似的样本，如质控品。应至少评估 2 个水平样本的不精密度。

当 2 个水平样本的不精密度有显著差异时，建议增加为 3 个水平。所选样本的被测物水平应在测量区间内，适宜时，至少有 1 个样本的被测物水平在检测方法的检测限水平左右。

(2) 方法

① 重复性

应使用同一批号的试剂和校准品，如适用，只进行一次校准。对样本进行至少 10 次重复测定，计算均值、SD 和 CV。实验过程中应至少检测一个质控品。

② 同时验证重复性和中间精密度

每天检测 1 个分析批，每批检测 2 个水平的样本，每个样本重复检测 3~5 次，连续检测 5 天。在每一批次测量中，应同时测量质控品，收集检测结果根据以下公式进行计算。

$$\text{批内标准差 } S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

$$\text{批间方差 } S_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{x})^2}{D-1}$$

$$\text{实验室内标准差 } S_1 = \sqrt{\frac{n-1}{n} * S_r^2 + S_b^2}$$

式中：

D—实验天数

n—每天重复次数

x_{di} —第 d 天第 i 次重复结果

\bar{x}_d —d 天所有结果的均值

\bar{x} —所有结果的均值

(3) 可接受标准

实验室应根据实验室检测需求制定适宜的可接受标准。制定标准时宜考虑相关制造商或研发者声明的标准、国家标准、行业标准、地方标准、团体标准、公开发表的临床应用指南和专家共识等。

第六节 试剂的验收和保存要求

在通过实验室检测方法的验证后，检测试剂在日常使用中需要进行科学合理的验收和妥善的保存，以保障试剂的持续有效，得到准确的实验检测结果。需要进行检测试剂

验收的情况包括但不限于：同一试剂更换使用不同批号产品时；同一类试剂更换使用不同厂家产品时。

1. 一般性验收

试剂的一般性验收需对试剂的物理性状进行检查，如出现以下问题，提示存在质量隐患，应引起重视：运输或保存条件不符合试剂声称要求；运输包装、内盒或试剂盒存在物理损伤；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；保护包装纸破损或污染等。耗材的一般性验收同试剂的一般性验收基本一致，主要对耗材的外包装、标签信息、外观等进行验收。

2. 技术验收

关键检测试剂在通过一般性验收后还需要进行技术验收以确认试剂的检测性能，通过技术验收后方可正式投入实验室检测工作。

2.1 人免疫缺陷病毒抗体（HIV1/2）或抗原抗体联合检测试剂盒（快速检测）

2.1.1 推荐方案一

待验收试剂与之前使用的试剂，可进行平行检测，验证检测结果的一致性。平行比对方案应至少选取 2 支阳性、1 支阴性的质控品或样本。平行检测结果完全一致，判定技术验收通过；出现不一致结果时，判定技术验收不通过。

2.1.2 推荐方案二

选取 5 支质控品或样本（3 支阳性、2 支阴性）对待验收试剂进行检测。检测结果与预期结果完全一致，判定技术验收通过；否则，判定技术验收不通过。

2.2 人免疫缺陷病毒抗体（HIV-1/2）或抗原抗体检测试剂盒（酶联免疫法、化学发光法、微粒子化学发光法、时间分辨免疫荧光法等）

2.2.1 推荐方案一

待验收试剂与之前使用的试剂，可进行平行检测，验证检测结果的一致性。平行比对方案应至少选取阴性及阳性的质控品或样本各 10 份。平行检测结果完全一致，判定技术验收通过；出现不一致结果时，判定技术验收不通过。

2.2.2 推荐方案二

选取 5 支质控品或样本（3 支阳性、2 支阴性）对待验收试剂进行检测。检测结果与预期结果完全一致，判定技术验收通过；否则，判定技术验收不通过。

2.2.3 推荐方案三

如使用商品化质控品，应对同一份质控品进行 5 次平行检测，5 次检测值均落入质控品标明的预期范围内（S/CO 比值范围），判定技术验收通过；如出现一次以上超预期范围结果时，应进行复测，平行检测 5 次。仍出现超预期范围结果时，判定技术验收不通过。

2.3 人免疫缺陷病毒 1+2 型抗体检测试剂盒（免疫印迹法、重组免疫印迹法、线性免疫印迹法）

2.3.1 推荐方案一

待验收试剂与之前使用的试剂，可进行平行检测，验证检测结果的一致性。平行比对方案应至少选取 1 份已知全条带阳性样本、1 份条带不全的阳性样本和 1 份已知阴性的样本。平行检测的阳性和阴性结果完全一致，判定技术验收通过；否则，判定技术验收不通过。

2.3.2 推荐方案二

应用 5 支质控品或样本（3 支阳性、2 支阴性）对待验收试剂进行检测。检测结果与预期结果完全一致，判定技术验收通过；否则，判定技术验收不通过。

2.4 人免疫缺陷病毒（HIV-1）核酸（RNA）定量检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

2.4.1 推荐方案一

待验收试剂与之前使用的试剂，可进行平行检测，验证检测结果的一致性。平行比对方案应至少选取 3 份原有试剂检测过的保存样本或者确定靶值的质控品，包括千级拷贝/mL 或 IU/mL、万级拷贝/mL 或 IU/mL 和阴性的样本或质控品各 1 份。对阳性样本检测，待验收试剂与之前使用的试剂检测结果 Lg 值之差均小于 0.3，对阴性样本检测无假阳性结果，判定技术验收通过；否则，判定技术验收不通过。

2.4.2 推荐方案二

如使用商业质控品，应对同一份质控品进行 5 次平行检测，5 次检测值均落入质控品标明的预期范围内，判定技术验收通过。如出现 1 次以上超预期范围结果时，应进行复测，平行检测 5 次。仍出现超预期范围结果时，判定技术验收不通过。

2.5 人免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）核酸（DNA 或 RNA）定性检测试剂盒（荧光 PCR 法）

2.5.1 推荐方案一

待验收试剂与之前使用的试剂，可进行平行检测，验证检测结果的一致性。平行比对方案应至少选取 1 份已知阳性样本、1 份已知阴性样本。平行检测的阳性和阴性结果完全一致，判定技术验收通过；否则，判定技术验收不通过。

2.5.2 推荐方案二

如使用商业质控品，应对同一份质控品进行 5 次平行检测，5 次检测值均与预期结果一致，判定技术验收通过。如出现一次以上与预期结果不一致时，应进行复测，平行检测 5 次。仍与预期结果不一致时，判定技术验收不通过。

2.6 人免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）耐药基因型检测试剂盒（PCR-测序法、核酸扩增荧光定量及测序法）

2.6.1 推荐方案一

待验收试剂与之前使用的试剂，可进行平行检测，验证检测结果的一致性。平行比对方案应至少选取 1 份已知高度耐药样本、1 份已知低度耐药样本。每份样本的蛋白酶区和反转录酶区耐药位点的氨基酸与已知样本的氨基酸完全一致，判定技术验收通过。否则，判定技术验收不通过。

2.6.2 推荐方案二

如使用商业质控品，应对同一份质控品进行 5 次平行检测，5 次检测值均与预期结果一致，判定技术验收通过。如出现 1 次以上与预期结果不一致时，应进行复测，平行检测 5 次。仍与预期结果不一致时，判定技术验收不通过。

2.7 CD4/CD8 细胞计数检测试剂（流式细胞法）

2.7.1 推荐方案一

使用新鲜全血进行验收，采集 1 份新鲜抗凝全血样本，使用原有试剂与待验收试剂分别进行 5 次平行检测。计算原有试剂检测结果的均值、标准差（SD），作为预期结果。待验收试剂的 5 次检测值均落在原有试剂检测结果的均值 \pm 2SD 范围之内，判定验收通过。如果有 1 个检测值落在均值 \pm 2SD 范围之外，重复检测 5 次。仍出现超预期范围结果时，判定技术验收不通过。

2.7.2 推荐方案二

使用商业全血质控品进行技术验收时，应使用待验收试剂对同一份质控品进行 5 次平行检测，5 次检测值均落入质控品标明的预期范围之内，判定技术验收通过。如出现

1 次以上超预期范围结果时，应进行复测，平行检测 5 次。仍出现超预期范围结果时，判定技术验收不通过。

3. 保存要求

试剂和耗材在完成一般性验收后，如无问题，必须按照说明书声称或外包装标签标示的保存条件进行保存，以保证试剂和耗材的有效性及实验结果可靠性。

艾滋病检测常用试剂的保存特点和注意事项如下：

3.1 HIV 抗体快速检测试剂：一般存放温度为室温。HIV 抗体快速检测试剂的主要载体为硝酸纤维素膜或明胶颗粒，受环境温湿度影响较大，因此此类试剂存放房间需温湿度可控，保证室内温湿度满足试剂盒说明书的要求。

3.2 HIV 抗原和（或）抗体实验室检测试剂（酶联免疫法及发光类检测试剂）：酶联免疫法检测试剂一般为整盒试剂，保存条件为冷藏（2~8℃）。发光类检测试剂因所使用的检测平台多样化，实验所需辅助试剂、质控品、定标品的种类不同，需根据试剂盒说明书要求分别进行保存，比如试剂盒的部分主试剂及辅助试剂保存条件为 2~8℃，而部分冻干状态的试剂、质控品、定标品可存放于室温或 2~8℃，此类情况需要根据试剂盒说明书要求进行分开保存。除温度要求外，部分试剂还要求避光保存。

3.3 HIV-1 核酸检测及基因型耐药检测试剂：一般情况下，核酸提取试剂多在 2~8℃ 保存，扩增试剂因含有活性酶成分多在 -20℃ 或以下保存。现有一些冻干型的一体化检测试剂也可保存于室温。HIV-1 基因型耐药检测试剂中含有精细组分，尤其需要保存妥当，避免因外力挤压等因素导致精细组分受损，从而影响实验结果可靠性。

3.4 CD4+T 淋巴细胞计数检测试剂：此类试剂为荧光素标记的单克隆抗体，一般情况下需要在 2~8℃ 避光保存。

第七节 样本的采集、运送、接收和保存

艾滋病检测最常用的样本类型为血液样本，包括全血、血清、血浆、淋巴细胞富集液、外周血单个核细胞、干血斑等。此外，在艾滋病抗体检测中还会用到的样本类型有口腔黏膜渗出液和尿液等。良好的样本质量对于获得准确、可靠的检测结果非常重要，样本质量的管理应贯穿于样本采集、处理、运送、接收、检测、保存、销毁的全流程。实验室应制定样本的质量管理程序文件。

在《全国艾滋病检测技术规范》中介绍了样本种类及相应用途，描述了样本采样、处理、保存、运送、接收等流程的通用要求。为保证良好的样本质量，在检测流程中还应注意以下要点：

1. 样本的种类

样本种类的选择取决于检测目的和所用试剂，不同检测标志物、不同检测方法甚至同一检测方法的不同试剂产品对样本的种类要求可能不同。除《全国艾滋病检测技术规范》中的通用要求外，实际工作中还要注意遵循试剂说明书的要求使用适宜的样本。

2. 样本的采集

口腔黏膜渗出液和尿液样本的采集方法参见试剂说明书。血液样本的采集要求如下：

2.1 应由具有采血资质并且经培训合格的人员执行。

2.2 采样前应核对受检者的身份信息，确认样本编码无误。

2.3 外周血采集应根据所需样本类型选择合适的采血管（表 1-1-4）。注意含有添加剂的采血管应按规定的采样量进行样本采集，血液样本采集后应按照采血管说明书的要求，立即将试管中的血液样本缓慢地翻转并按需要的翻转次数彻底混匀。

表 1-1-4 常用真空采血管的使用要求

管盖颜色	管盖颜色文字描述	可制备的标本类型	添加剂	要求
	红色	血清/血凝块	无	抽血后不需要摇动
	紫色	全血/PBMC	EDTA、Na ₂ EDTA 或 K ₂ EDTA	抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次
	黑色	全血/血细胞	109 mmol/L 枸橼酸钠	抗凝剂与血液为 1:4 混合，抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次
	浅蓝色	全血/血浆	109 mmol/L 枸橼酸钠	抗凝剂与血液为 1:9 混合，抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次
	金黄色	血清/血细胞	促凝剂和分离胶	抽血后轻轻颠倒混匀 5 次~8 次，有助于促凝剂发挥作用
	绿色	血浆/全血	肝素锂、肝素钠	抽血后立即颠倒混匀 5 次~8 次
	灰色	血浆/全血	血糖降解抑制剂	抽血后立即轻轻颠倒混匀 5 次~8 次
各种真空采血管头盖的颜色均为国际通用标准，试管上的标签有刻度线、取血量、有效期、内含添加剂物等说明。				

2.4 末梢血采集应注意选择合适的穿刺部位，在采血之前擦去第一滴血。

2.5 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 淋巴细胞计数测定样本的抗凝剂可选用 EDTA 钾盐或钠盐、枸橼酸钠、肝素钠；HIV 病毒分离、核酸定性/定量检测样本的抗凝剂可选用 EDTA 钾盐或钠盐、枸橼酸钠。特别注意，肝素钠抗凝的血液样本不能用于核酸检测。

2.6 感染预防和控制：样本采集应使用一次性无菌耗材，所需设备和耗材应清洁并维护良好；样本采集人员应配备个人防护装备、进行手卫生；样本采集过程中产生的医疗废物应按照国家相关法规处理。

3. 样本的处理

3.1 对采集血液样本后需要进一步处理制备的样本（血清、血浆、淋巴细胞富集液、外周血单个核细胞、干血斑），应依据采血管说明书的时限要求或经实验室验证的时间完成样本的处理制备。

3.2 对采样后需要立即检测的样本，例如用于 HIV 抗体快速检测的全血、口腔黏膜渗出液和尿液样本，可采集后即开展检测。

4. 样本的运送

4.1 根据检测目的和样本种类，样本运送过程中的温度和时间应控制在适宜范围内。

4.2 样本在单位内部运送，应严格遵循生物安全要求、确保样本质量。

4.3 HIV 阳性或疑似阳性血液样本（干血斑除外）及 HIV 培养物样本在单位间运输，应根据《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），获得《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本准运证书》才能进行。

5. 样本的接收

5.1 对具有潜在感染性的血液样本（干血斑除外）和 HIV 分离物样本包装，应在 BSL-2 实验室内的生物安全柜中打开，用后的包裹应及时进行消毒。无感染性的样本（干血斑、口腔黏膜渗出液和尿液）不需要在生物安全柜中打开。

5.2 核对和检查：核对样本与送检单，检查账物是否相符；检查样本管有无破损和溢漏，如有问题及时进行应急处置；检查样本的状况是否满足检测需求，如有问题及时通知送样人。

5.3 填写样本接收单。

6. 样本的保存

6.1 检测前样本的保存：样本的保存条件和时限应根据检测目的和样本种类而定。分离后的血浆或血清如在 3 天内使用可在 2~8℃ 暂时保存，3 个月内使用应冻存于-20℃ 以下，3 个月以上应置于-70℃ 以下冻存。

6.2 检测后样本的保存：需长期保藏的样本应置于-70℃ 以下保存。筛查结果为阴性的样本，可根据具体需要决定保存时间，建议至少保存 1 个月。艾滋病检测确证实验室收到的筛查阳性样本，无论补充试验结果如何，均应保存剩余样本，保存时间根据需要确定，建议至少保存 3 年，特殊用途或专项项目的样本根据具体要求确定保存时间。补充试验结果为阳性的样本按照国家生物样本管理的有关规定执行。

6.3 冻存样本应避免反复冻融，用于核酸检测的样本冻融不应超过 3 次。

6.4 HIV 阳性样本的保存应遵守高致病性病原微生物样本的生物安全管理要求，严格实行双人双锁，防止被盗、被抢、被恶意使用或丢失。

7. 样本的销毁

对不再需要保存的样本，应经实验室负责人批准后进行高压蒸汽灭活，然后按医疗废物处理。应保留样本销毁记录。

第八节 实验室信息管理

实验室信息管理是指通过信息化手段将艾滋病检测过程数字化，包括对艾滋病检测的策划、信息收集、检测过程控制、数据整理和分析等关键环节，实现实验室检测从申请-执行-采集-传输-核收-分析-审核-报告应用的全过程信息化管理，是实验室有效运行的重要保证。实验室信息管理由实验室信息系统、信息化设备和专业技术人员组成。实验室信息管理的具体内容包括：体系文件、检验过程性文件、人员资料和资质、实验室设备、试剂和耗材、样本采集与转运程序、检验工作流程程序、检验报告及发布等全要素。

实验室信息系统（Laboratory Information System，缩写 LIS）是用来处理实验室检测过程信息管理的软件，可以独立运行，并且能与实验室所在单位的其他信息系统连接，实现信息交互。LIS 系统一般由样本采集模块、检验流程管理模块、人员管理模块、设备和试剂耗材管理模块、文档管理模块、质控模块等多个模块构成，也可以依据实际情况选择和配置其他功能模块。

1. 标本采集模块和检验流程管理模块的技术要求

可实现手工或通过接口从 LIS 或其他系统获取检验申请信息，电子标签生成可兼容多种方式，标本流转时间的实时采集。可支持自动编号规则、采集样本参数、标本检测完成预警时间设定、多种检验报告模板等全要素功能设置。

2. 人员管理模块的技术要求

可支持人员信息档案、健康档案、技术档案、培训记录及方案的电子化。

3. 设备和试剂耗材管理模块的技术要求

可实现仪器对样本条形码的自动识别；样本条码数据与设备的单向/双向通讯；数据单向/双向控制或传输。可实现上机时间、检验报告完成时间的采集。可实现一台设备向多个检验单元传送数据。可实现质控数据采集、以及网络故障时检验数据本地缓存及无线传输。

4. 文档管理模块的技术要求

具有岗位管理和权限分配功能，可为每个操作者从功能、时间、空间分别设置不同权限。可自动记录文档使用痕迹管理记录（主要操作记录、数据修改、数据浏览、数据引用、打印）、电子签名及电子印章、自动屏幕保护功能、定期密码更新、系统登录二次加密等。

5. 质控模块的技术要求

具有质控种类数据库、质控规则数据库、质控图形的自动绘制功能、常用质控报表模板。可实现质控失控实时记录和失控处理呈现、试剂耗材批号管理、文档管理等功能。可提供多种类型的室内质量控制和室间质量评价数据库及模板供客户选择，且可修改调整。可提供参考相关国家/行业标准建立的质量电子化控制程序、多种质控方案（含即刻法质控、患者标本质控、实验室比对方案等）的质控规则、质控物的类型（定量、半定量、定性、试剂的平行试验）、浓度和检测频度、质控物位置（适用时，如酶联免疫试验用质控物应随机放置且应覆盖检测孔位）、常用质控图形（L-J 图、Z-分数图、优顿图、累积和图、频率分布图、比对图）、常用质控报表及知识库等。

通过质控模块应能自动统计和呈现质控数据和记录，具体如下：

- 5.1 每月室内质量控制数据统计报表；
- 5.2 室内质量控制失控报告单；
- 5.3 每月室内质量控制报表；
- 5.4 每月项目室内质量控制数据汇总表；

- 5.5 每月项目室内质量控制数据控制图；
- 5.6 每月上报室内质量控制图表；
- 5.7 室内质量控制数据周期性评价；
- 5.8 室间质量评价过程记录表；
- 5.9 室间质量评价结果分析表；
- 5.10 质量控制失控分析及处理策略知识库；
- 5.11 质量控制知识库。

6. 实验室信息系统的安全管理

实验室信息系统应能满足临床医生检验医嘱和报告单查询，以及实验室检验前、检验中与检验后的信息化、质量监测指标分析等需求。由于艾滋病检测实验室工作人员不得泄露艾滋病病人或感染者的姓名、住址、检测结果等有关情况。实验室应确保规定信息系统管理的权限和责任、建立信息系统的安全机制，保证艾滋病检测数据和信息安全。

- 6.1 实验室信息管理系统应设置防火墙等防护措施，防止被恶意攻击的风险；
- 6.2 保存有艾滋病检测信息的计算机应设置密码，仅供工作人员使用；
- 6.3 加强艾滋病检测实验室科研数据保密意识及科研诚信；
- 6.4 应建立艾滋病检测样本库并实施血液样本相关数据的传输和接收程序，数据传输应确保其完整性并防止侵犯数据隐私；
- 6.5 信息安全防护和执行信息系统应急预案的能力应每年进行 1 次评估；
- 6.6 与艾滋病检测相关的所有资料均应严格保密，包括送检单、检测记录、样本登记、报告单及工作人员年度检测结果等，不得向无关人员透露艾滋病检测结果和 HIV 感染者的姓名、住址等信息；
- 6.7 艾滋病检测确证实验室出具的艾滋病病毒抗体确证报告应以保密方式发送；
- 6.8 艾滋病病毒抗体确证试验结果应当由临床医生告知本人；本人为无行为能力人或者限制行为能力人的，应当告知其监护人。

第九节 实验室记录文件

艾滋病检测实验室开展 HIV 抗原、抗体、核酸、基因型耐药及淋巴细胞亚群等多种检测项目，不同检测项目的检测过程和检测内容各不相同，通过在实验室检测过程中记录下一系列相关信息，可以溯源试验条件和试验过程。实验室记录文件种类较多，对保

存时间的要求也各不相同。

1. 实验室记录文件的种类

实验室记录包括：原始实验记录、仪器记录、试剂/质控品记录、辅助设备记录、环境记录等。

1.1 原始实验记录：实验过程记录，检验前、检验中、检验后记录。

1.2 仪器记录：检测样本所需仪器的运行和维护记录。

1.3 试剂/质控品记录：试剂/质控品的来源、批号、效期及使用时间。

1.4 辅助设备记录：冰箱、水浴箱、洗板机、离心机、振荡器等辅助设备的记录。

1.5 环境记录：实验室环境的温度、湿度、消毒情况等记录。

2. 实验室记录文件的保存时间

2.1 仪器记录、试剂/质控品记录、辅助设备记录、环境记录等记录文件一般保存 1-3 年，视实验室的具体情况而定。

2.2 实验室应保留所有的实验原始记录，并有检测人以及复核人的签字。艾滋病确证阳性试验记录保存时间不少于 10 年。

2.3 使用仪器检测的原始数据结果，应定期存档备案，保存时间至少 10 年。

2.4 国家法律、法规另有规定的，依照有关规定执行。

参考文献

1. 中华人民共和国国务院. 病原微生物实验室生物安全管理条例(2018 修订版)[Z]. 2018.
2. 中华人民共和国卫生部. 全国艾滋病检测工作管理办法[Z]. 2006.
3. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定室内质量控制: WS/T 641-2018[S]. 2018.
4. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验室间质量评价: WS/T 644- 2018[S]. 2018.
5. 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]. 2020.
6. 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]. 2006.

7. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南: WS/T 360-2024[S]. 2024.
8. 国家市场监督管理总局. 检测和校准实验室能力的通用要求: GB/T 27025-2019[S]. 2019.
9. 国家标准化管理委员会. 人类血液样本采集与处理: GB/T 38576-2020[S]. 2020.
10. 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020年修订版)[Z]. 2020.
11. 中国疾病预防控制中心. 艾滋病病毒抗体快速检测技术手册[Z]. 2011.
12. 中国疾病预防控制中心. 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[Z]. 2013.
13. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南[Z]. 2013.
14. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南[Z]. 2013.
15. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在实验室信息系统的应用说明: CNAS-CL02-A010[S]. 2018.
16. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则: CNAS-CL02[S]. 2023.
17. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明: CNAS-CL02-A004[S]. 2018.
18. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明: CNAS-CL02-A009[S]. 2018.
19. 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南: CNAS-GL039[S]. 2019.
20. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室核酸检测质量和安全指南: CNAS-TRL-018[S]. 2022.
21. 国家市场监督管理总局. 人类免疫缺陷病毒抗原抗体联合检测试剂盒(发光类): YY/T 1526-2017[S]. 2017.
22. 国家市场监督管理总局. 人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒(免疫层析法): YY/T 1611-2018[S]. 2018.
23. 国家市场监督管理总局. 口腔黏膜渗出液人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒(胶体金免疫层析法): YY/T 1727-2020[S]. 2020.

24. 国家食品药品监督管理总局. 人类免疫缺陷病毒(I 型)核酸定量检测试剂(盒): YY/T 1515-2017[S]. 2017.
25. International Organization for Standardization. Medical laboratories--requirements for quality and competence[M]. Switzerland: ISO 15189, 2022.

第二章 艾滋病检测实验室的生物安全管理

艾滋病检测实验室的生物安全管理是确保实验室工作人员安全和环境安全的关键措施，实验室工作人员应严格遵守个人防护措施，正确使用和处置生物危险物质，避免交叉感染和事故的发生。此外，生物安全管理还包括定期进行风险评估和应急演练，以应对潜在的安全威胁和紧急情况。通过有效的生物安全管理，艾滋病检测实验室能够最大限度地减少感染风险，保护工作人员的健康和安全，同时也确保实验室的正常运行和结果的准确性。

第一节 实验室生物安全管理要素

实验室生物安全管理体系由组织结构、程序、过程以及资源等组成，其作用是维护实验室的活动符合生物安全的规定，以发现、纠正问题，改进、提高实验室生物安全，实现组织机构实验室生物安全发展的方针和管理目标，以持续满足实验室生物安全管理的需求。

1. 实验室生物安全的介绍

实验室生物安全是指为避免生物因子造成实验室人员暴露，向实验室外扩散并导致危害而采取的综合措施。即通过制定和实施实验室管理规范、设计并配置实验设施以及使用安全设备，以防止所操作的病原体感染操作人员、实验室其他工作人员、周边动物以及环境的措施。实验室生物安全的目的是在从事病原微生物实验活动的实验室中防止实验人员被感染，避免病原微生物对相关人员的危害，防止实验室内病原微生物泄露影响周围环境和感染实验室外部人员，以及保护实验样本不被污染。

艾滋病检测实验室管理的目标是确保实验活动安全、有序，实验结果准确、有效。实现管理目标需要采取一系列的综合措施，对实验室运行的各个环节和要素进行有效控制。实验室应建立安全管理体系，覆盖管理活动的要素，要素之间相互联系，能有效协调。管理层需要不断强化实验室工作人员的生物安全意识，明确实验室的组织和管理结构，规定所有人员的职责、权力和相互关系，并在风险识别、分析和评价基础上，通过建立规范化、系统性、全面性、适用性和有效性的管理体系，并在实验室运行中对管理体系进行修订完善，适应内外部环境变化和生物安全管理新需求，使管理体系运行处于有效可控状态，实现减少、消除和预防风险的目的。

2. 实验室生物安全管理要点

艾滋病检测实验室的生物安全管理应按照国家对生物安全相关要求执行。

2.1 病原体危害程度

按照《人间传染的病原微生物目录》，人免疫缺陷病毒（HIV）为危害程度二类病毒，属于高致病性病原微生物。无感染性材料以及灭活材料的操作可在 BSL-1 实验室进行，未经培养的感染性材料操作需在 BSL-2 开展，病毒的分离、扩增和利用活病毒培养物的相关实验操作，包括病毒滴定、中和试验、活病毒及其蛋白纯化、核酸提取时裂解剂或灭活剂的加入、利用活病毒培养物或细胞提取物进行的生化分析、血清学及免疫学检测等实验需在 BSL-3 实验室完成。涉及到动物感染实验需在 ABSL-3 实验室完成。对采样量不超过 100 微升的血液样本进行即时检测（仅需将样本和缓冲液加入试剂卡，无需额外实验操作即获得结果），应遵从国家卫生健康委有关规定。

2.2 落实管理责任

按照《中华人民共和国生物安全法》规定要求，实验室的设立单位的法定代表人和实验室负责人对实验室的生物安全负责。实验室应制定管理制度，并定期对实验室设施、设备、材料等进行检查、维护和更新，确保符合国家相关规定。

2.3 生物安全管理要点

2.3.1 艾滋病检测实验室应按照国家有关法律、法规的相关规定，对污染场所、物品以及医疗废弃物进行消毒和无害化处置，遵循“标准防护原则”，防止实验室内外污染。

2.3.2 艾滋病检测工作中涉及到 HIV 毒种（株）和检测样本的采集、保藏、携带、运输，必须符合国家的有关管理规定。

2.3.3 艾滋病检测实验室必须执行《实验室生物安全通用要求》的要求及国家卫生行政主管部门的有关规定。

2.3.4 艾滋病检测实验室人员应有相关专业的教育经历，熟悉生物安全、艾滋病检测及消毒相关知识，具备相应的操作技能，掌握良好安全工作行为。发生职业暴露后，应按照《医务人员艾滋病病毒职业暴露防护工作指导原则（试行）》及其它相关规定及时处理。

2.3.5 实验室负责人应保证所有检测员和管理者接受足够的生物安全培训，并接受年度复训，了解生物安全保障的一般性导则。相关人员要接受实验室安全员和实验室安全负责人的监督。所有实验室事故和意外要根据艾滋病实验室事故和意外处理的原则进行

处理、记录和报告。

2.3.6 实验室安全负责人的责任是保证实验室处于安全状态。所有人员有责任实现自身保护和其他工作人员的安全。所有人员的安全培训均应记录在实验室和人事档案中。具体操作应遵照《职业暴露防护工作导则》、《实验室生物安全通用要求》、《病原微生物实验室生物安全通用准则》、《全国艾滋病检测技术规范》中的相关条文和一般性导则规定。

2.3.7 生物安全突发事件处理预报：遵循国家艾滋病检测实验室有关突发性生物安全事件处理程序和认定原则进行登记上报和应急处理。

第二节 艾滋病检测实验室生物安全风险评估和控制措施

艾滋病检测实验室生物安全风险评估和控制措施是为了保护实验室工作人员和环境的安全而采取的一系列措施。在实验室中，工作人员经常接触可能携带艾滋病病毒的样本，因此必须进行生物安全风险评估，以识别潜在的感染源和风险。根据评估结果，实验室应采取相应的控制措施，如使用个人防护装备、实施安全操作规程、正确处理废弃物等，以减少感染的风险。此外，实验室还应定期进行安全培训和教育，提高工作人员对生物安全的认识和应对能力。通过有效的生物安全风险评估和控制措施，艾滋病检测实验室能够最大限度地减少感染风险。

1. 艾滋病检测活动的生物安全风险评估：病原体危害评估、实验活动风险评估

按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》及相关的法律法规的要求，实验室建设前后需要对从事的病原微生物和研究内容进行风险评估，确定所从事的病原微生物及其实验活动的风险级别，在相应的生物安全防护水平的实验室开展实验活动。生物安全风险评估的目的是通过对各因素的风险识别与分析、提出降低风险的措施、评估采取措施后的残留风险，以便在运行过程中采取适宜的安全防护措施，将工作人员暴露的危险和环境污染降到最低。和风险评估相关的因素有病原微生物的基本特征（生物学特性、感染途径、环境中的稳定性等）、实验活动、实验室设施和设备、实验耗材、实验室火灾、水灾、地震等。

1.1 病原体危害评估

艾滋病病毒，也称为人类免疫缺陷病毒，属于逆转录病毒科。成熟的 HIV 病毒颗粒直径为 100~120nm，球形，电镜下可见一致密的锥形核心，其内有病毒 RNA 分子和逆

转录酶。病毒表面由 72 个刺突状结构组成。包膜糖蛋白以三聚体形式存在。HIV 主要感染人体 CD4+ T 淋巴细胞，在宿主细胞内合成艾滋病病毒进入血液中，再不断侵染其他 CD4+ T 淋巴细胞，同时也会感染其他细胞，如单核巨噬细胞。HIV 感染是一个漫长而复杂的过程，从初始感染到终末期，不同阶段中的临床表现多种多样。参照 2019 年制定的 WS-293-2019《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断》，将艾滋病的全过程分为 HIV 感染早期、HIV 感染中期和 AIDS 期。初次感染 HIV 后，1 个月内会出现发热、咽痛、皮疹、肌肉关节痛、淋巴结肿大、头痛、腹泻、恶心、呕吐等症状；之后，由于病毒不断复制，机体免疫系统损伤，CD4+ T 淋巴细胞计数逐渐下降；在疾病后期，可继发各种机会性感染、恶性肿瘤和中枢神经系统病变。

HIV 主要存在于感染者和患者的血液、精液、阴道分泌物和乳汁中，可通过性接触（包括同性、异性和双性性接触）、血液及血制品（包括共用针具静脉吸毒、介入性医疗操作等）和母婴传播（包括产前、产中和产后）三种途径传播。此外，HIV 职业暴露也是感染 HIV 的途径之一。HIV 职业暴露是指医疗卫生人员及人民警察等在职业活动过程中意外被艾滋病病毒感染者或者艾滋病病人的血液、体液污染了皮肤或者粘膜，或者被含有艾滋病病毒的血液、体液污染了的针头及其他锐器刺破皮肤，有可能被艾滋病病毒感染的情况。该病毒的传播力并不是很强，它一般不会通过我们日常的活动来传播。HIV 在外界环境中的生存能力较弱，对理化因素的抵抗力较低。HIV 对酸敏感，pH 为 2.0 时能完全灭活病毒；但 HIV 耐碱，pH 为 9.0 时病毒效价下降不多。HIV 对热很敏感，对低温耐受性强于高温。56℃处理 30 分钟，可使 HIV 在体外失去对人 CD4+ T 淋巴细胞的感染性，但这个温度和时间不能完全灭活血清中的 HIV。HIV 在室温（23~27℃）液体环境中可存活 15 天以上。

1.2 实验活动风险评估及控制措施

按照《中华人民共和国生物安全法》，我国对开展病原微生物实验活动的实验室实行分等级管理，明确要求低等级病原微生物实验室不得从事国家病原微生物目录规定应当在高等级病原微生物实验室进行的病原微生物实验活动。艾滋病检测实验室的实验活动风险评估及控制措施见表 1-2-1。

表 1-2-1 艾滋病检测实验室的实验活动风险评估及控制措施

潜在风险因素	危害程度	固有风险	控制措施	残留风险
1、样本采集、运输、接收、处理及上样				

(1)	样本采集时利器对皮肤的损伤	高度	高度	避免使用利器（如刀片、针头、剪刀及止血钳等），一旦使用后，及时移出；选用塑料材质的实验材料。当皮肤损伤时，应先脱去手套，挤压伤口以大量流水冲洗，用 75%乙醇消毒。	低风险
(2)	运输,接收过程中因试管塞/盖脱落或破碎	中度	中度	运输前检查包装的完整性；选用塑料材质的实验材料；运输人员具有安全资质，在生物安全柜中进行样本的接收。	低风险
(3)	处理以及上样过程中标本的溅洒	中度	中度	处理前检查包装完整性，在生物安全柜中进行样本处理。当标本溅洒时用 75%乙醇处理，溅洒过多时用含次氯酸钠的纱布覆盖溅洒区域半小时以上，将污染物放入封闭容器内高压灭菌，再进行室内消毒。实验人员佩戴符合生物安全标准的个人防护装备。	低风险
2、实验室废物处理					
(1)	实验废液处理时溅洒或未加消毒试剂。	中度	中度	实验前废液缸内放置 10%次氯酸钠消毒液，实验后及时高压灭菌。	低风险
(2)	固体废物处理时垃圾散落	中度	中度	使用符合生物安全标准的垃圾袋；及时清理垃圾、更换垃圾袋；试验后及时高压灭菌。	低风险

1.3 实验室关键设施设备风险评估及控制措施

在使用实验室关键设施设备使用过程中，可能会出现相关风险，具体的风险评估及控制措施见表 1-2-2。

表 1-2-2 实验室关键设施设备使用过程中可能产生的风险分析

仪器名称	潜在风险因素	危害程度	固有风险	控制措施	残留风险
生物安全柜	在处理样本时，样本溅洒台面。风速不稳。	中度	中度	生物安全柜的工作台面放上一层吸水材料。将生物安全柜通风口处放置的物品移开；使用前打开风机 5~10 分钟，待气流稳定后进行操作。	低风险

离心机	样本未配平。离心管发生破裂，气溶胶释放。	中度	中度	离心管中装量不宜超过离心管体积的 2/3，离心转子一定要配平。操作感染性材料时，离心管及离心桶的安装、密封和开启应在生物安全柜内进行。	低风险
冰箱	搁物架或冰箱内层结构的积冰可能产生划伤。放置和拿取样本时，装有感染性材料的容器破裂，样本溅洒。	中度	中度	做好人员操作和意外情况处理培训，做好个人防护，定期整理冰箱和化霜处理。放置和拿取样本时注意个人防护设备完整。	低风险
移液器和电动助吸器	处理样本时，液体可能滴洒或溅出。吹打混匀时形成气溶胶。	中度	中度	使用移液器时，动作要轻柔勿剧烈，以防液体溅出和气溶胶产生。	低风险
双扉高压灭菌器	实验废弃物和废液高压灭菌时，使用不当；高压温度时间不够	低度	低度	操作人员应经过高压灭菌器操作培训，设备应定期维护和强检。高压液体时，体积不能超过额定容积的 2/3，容器盖子必须保持松动状态。使用专用灭菌篮筐，污物包不能堆放，间隔至少 2 厘米。	低风险

1.4 实验耗材的风险评估及控制措施

风险评估：实验耗材是实验室常用的物品，如使用不当可能会出现风险。实验操作时如手套出现破损或被移液器枪头扎伤，都存在可能被感染的风险。

控制措施：购买时要选用有资质的供应商，选用合格的产品。在使用时要检查是否有破裂破损等，防止意外事故发生。

第三节 艾滋病检测实验室的个人防护

艾滋病检测实验室的个人防护是保障实验室工作人员安全的重要措施。在实验室中，工作人员需要采取一系列个人防护措施，以减少接触和暴露于潜在的感染源的风险。首

先，工作人员应佩戴适当的个人防护装备，如手套、口罩、护目镜和防护服等，以防止直接接触样本或处理试剂时可能发生的感染。其次，应遵循严格的实验室操作规程，包括正确使用和处置生物危险物质、避免交叉污染、正确洗手等。此外，定期接受相关的培训和教育也是非常重要的，以提高工作人员对生物安全风险的认识和应对能力。通过有效的个人防护措施，艾滋病检测实验室可以最大限度地减少工作人员的感染风险，确保他们的健康和安全。

1. 个人防护的重要意义

感染性材料或其它有害因子在实验室操作时难免发生沾染或溢洒，发生身体暴露。任何物理防护设备的保护功能都有一定限度。譬如标准的 II 级生物安全柜也可能有少量气溶胶粒子扩散到室内，所以还要进行个体防护。实验室生物安全防护是一项受制于多环节多因素的系统工程，在长期运转中难免有意外发生，此时个体防护就是保障安全的关键。

2. 人员健康状况

2.1 进入实验室的工作人员应健康状况良好，在上岗之前，应采集和保存本底血清或血浆标本；

2.2 当工作人员妊娠或身体条件不佳，如体温超过 37 °C 或患其它影响实验室工作的疾病以及处于不适合实验室工作的疲劳状态时，应停止实验室工作，不应进入实验室；

2.3 如皮肤有微小伤口、擦伤或皲裂等，应用防水敷料严密覆盖。遇有皮肤有开放性伤口及其他不适于工作的情况，应暂停工作。

3. 个人防护用品

3.1 进入实验室的工作人员应穿戴好个人防护用品（Personal Protective Equipment, PPE），不能穿短裤或短裙进入实验室，不能有大量裸露的皮肤。个人防护用品的防护部位主要包括眼睛、头面部、躯体、手、足及呼吸道。其装备包括护目镜、口罩、面罩、帽子、防护服、手套、实验室专用鞋、鞋套等。

3.2 个人防护用品应符合国家规定的有关技术标准，使用前应仔细检查，不使用标志不清、破损的防护用品。

3.3 在风险评估的基础上，按不同级别的防护要求选择适当的个人防护装备及类型。工作人员要充分了解其实验工作的性质和特点，并正确使用个人防护用品。

3.4 实验操作过程中，如发现防护服被污染应立即更换、如手套破损，应立即丢弃、

洗手并换上新手套。不能用戴手套的手接触暴露的皮肤、口唇、眼睛、耳朵和头发等。

3.5 不应将手套清洗或消毒后再次使用，因为使用表面活性剂清洗可使手套对水的通透性增加，消毒剂可以引起手套的破损。

4. 标准防护要求

不同等级的生物安全实验室，其对个体防护要求不同，具体如下：

一级生物安全实验室（BSL-1）的个体防护：工作服、手套，工作服不穿离实验区，出实验室前洗手。

二级生物安全实验室（BSL-2）的个体防护：工作服、手套、帽子、口罩、必要时使用面部保护装置。

三级生物安全实验室（BSL-3）：内外层防护服、内外层手套、帽子、专业防护口罩、必要时使用防护镜和呼吸保护装置。可再次使用的工作服要先去除污染再清洗。

第四节 艾滋病检测实验室的消毒和废弃物处理

艾滋病检测实验室的消毒和废弃物处理是确保实验室安全和环境保护的重要环节。在实验室中，使用过的仪器、设备和试剂可能携带有感染性物质，因此必须进行严格的消毒处理，以杀灭潜在的病原体，减少交叉感染的风险。消毒过程应遵循相关的标准和指南，确保有效的杀菌效果。同时，废弃物的处理也是必不可少的。废弃物应按照特定的分类要求进行分类，如生物危险废物、化学废物等，并采取相应的包装和标记措施，以防止泄漏和污染环境。废弃物的处理应由专业的处理机构进行，确保符合相关的法律法规和环保要求。通过规范的消毒和废弃物处理措施，艾滋病检测实验室能够最大限度地减少感染风险，保护工作人员的健康和安全。

1. 消毒

1.1 艾滋病检测实验室常用物理消毒方法

1.1.1 压力蒸汽灭菌

分立式和双扉压力蒸汽灭菌器。适用于耐高压，高湿的物品，不适用于油类和粉剂。灭菌时间可以是 121℃ 灭活 30 分钟或 134℃ 灭活 5 分钟

注意事项：（1）所有要高压灭菌的物品都应放在空气能够排出并具有良好热渗透性的容器中；（2）容器应耐高压；（3）装载不能超过容器容积的 3/4；在盛装液体的包装容器中液体体积不得超过额定容积 2/3，容器盖子必须保持松动状态；（4）灭菌器柜腔

装载要松散、有序，不应超过容积的 80%（下排气式）或 90%（预真空），以便蒸汽可以均匀作用于装载物；（5）不应小于柜室容积的 10%和 5%，以防止小装量效应，残留空气影响灭菌效果。

1.1.2 紫外线

属于电磁辐射中的一种（C 波段 254nm）。不同微生物对紫外线的抗力差异较大，可以相差 100~200 倍。由于穿透力较弱，很难用于物品的灭菌，通常用于室内空气、物体表面以及水的消毒。主要消毒设备包括紫外线消毒灯、循环风紫外线空气消毒器、高臭氧紫外消毒柜等。

主要消毒表面和空气；要求用于消毒的紫外线灯在电压为 220V、环境相对湿度为 60%、温度为 20℃时，辐射 253.7nm，紫外线强度不得低于 70uW/cm²。UV 不能穿透有机材料，水等，因此在开始紫外辐射之前，必须对物体表面进行清洁并且保证干燥。

1.2 艾滋病检测实验室常用化学消毒方法

1.2.1 气溶胶喷雾消毒法

适用于实验室空间和物体。采用过氧乙酸、过氧化氢、二氧化氯。消毒时，关闭门窗，作用时间 30~60 分钟。注意：因为对人员有刺激性，对仪器有腐蚀性，消毒后需通风。

1.2.2 熏蒸消毒法

适用于房间、高效空气颗粒过滤器，生物安全柜终末消毒。采用甲醛，消毒前密封，消毒后通风。用作空间消毒剂时，甲醛的标准浓度为 0.3g/ft³（11g/m³），相对湿度在 60%至 85%之间。

1.2.3 气化消毒法

需要专用设备。使用一定浓度的过氧化氢、二氧化氯。消毒前关闭所有门窗、管道。按照仪器的标准操作规程进行操作。

1.2.4 喷雾与擦拭消毒法

物品表面进行喷雾湿润即可，枪头盒，细胞板等不要用喷雾方式消毒。

日常实验活动中，使用 75%乙醇擦拭生物安全柜台面、实验台面和仪器表面，使用 0.5%次氯酸钠清洁实验室地面，并用清水再次清洁。

1.2.5 消毒剂的合理选用

（1）空气喷雾消毒：过氧乙酸、过氧化氢、二氧化氯；（2）表面擦拭消毒：乙醇、

过氧乙酸、含氯清洗消毒剂；（3）吸管浸泡消毒：过氧乙酸、含氯消毒剂；（4）金属器械消毒：戊二醛、氯化磷酸三钠；（5）无菌容器开封：碘酒、乙醇；（6）手皮肤消毒：手消毒凝胶、碘伏、洗必泰醇溶液；（7）台面菌液污染消毒：碘酒湿巾、含氯消毒粉剂；（8）光学电子仪器消毒：环氧乙烷、甲醛。

1.3 效果监测方法

化学监测法（化学指示剂、指示胶带），物理监测法（温度压力检测仪），生物监测法（生物指示剂-嗜热脂肪杆菌芽孢菌片）。

2. 实验室废弃物处理

是指医疗卫生机构在医疗、预防、保健以及其他相关活动中产生的具有直接或者间接感染性、毒性以及其他危害性的废弃物。

2.1 感染性废弃物

具有感染性的剩余标本、实验用具，使用后的培养基、防护用品，具有引发感染性疾病传播危险的实验废弃物应收集于符合《医疗废物专用包装袋、容器和警示标志标准》（HJ421）的医疗废物包装袋中；病原微生物实验室废弃的病原体培养基、标本，菌种和毒种保存液及其容器，应在产生地点进行压力蒸汽灭菌或者使用其他方式消毒，然后按感染性废物收集处理。

2.2 损伤性废弃物

注射器针头、缝合针、解剖刀、手术刀、载玻片、玻璃试管等能刺伤或割伤人体的废弃的实验锐器需放置在专用的锐器盒中，然后高压灭菌进行处理。

第五节 意外事故发生的处理和职业暴露的处置

根据《中华人民共和国生物安全法》，病原微生物实验室的设立单位应当制定生物安全事件应急预案，定期组织开展人员培训和应急演练。常规艾滋病检测工作在二级生物安全实验室或检测点内开展，实验室应基于风险评估和风险控制报告制定实验室应急预案。

1. 生物危险物质溢洒处理

实验室人员应熟悉生物危险物质溢洒处理程序、溢洒处理工具包的使用方法和存放地点。

1.1 溢洒处理工具包

在实验室应准备溢洒处理工具包，并明确标示出其存放地点。艾滋病检测实验操作的基础溢洒处理工具包通常包括：

1.1.1 对感染性物质有效的消毒灭菌剂（如含氯消毒剂、75%酒精等），消毒灭菌剂需要按使用要求定期配制；

1.1.2 消毒灭菌剂盛放容器；

1.1.3 镊子或钳子、一次性刷子、可高压的扫帚和簸箕或其他处理锐器的装置；

1.1.4 足够的纸巾、布巾或其他适宜的吸收材料；

1.1.5 用于盛放感染性溢洒物以及清理物品的专用收集袋或容器；

1.1.6 橡胶手套；

1.1.7 面部防护装备，如面罩、护目镜、一次性口罩等；

1.1.8 溢洒处理警告标识，如“禁止进入”、“生物危险”等；

1.1.9 其他专用的工具。

1.2 撤离房间

1.2.1 发生生物危险物质溢洒时，立即通知房间内的无关人员迅速撤离。实验人员是否需要立即撤离房间，根据溢洒量和病毒浓度等因素评估后确定。如需撤离，在撤离房间的过程中注意防护气溶胶；关门并张贴“禁止进入”、“溢洒处理”的警告标识，至少 30 分钟后方可进入现场处理溢洒物。如不需撤离，立即处理溢洒物。

1.2.2 撤离人员按照离开实验室的程序，脱去个体防护装备，做手卫生。如果发生了 HIV 职业暴露，按照本节第 2 部分的流程处理。

1.2.3 立即通知实验室主管人员。必要时，由实验室主管人员安排专人清除溢洒物。

1.3 溢洒区域的处理

1.3.1 准备清理工具和物品，穿着适当的个体防护装备。需要两人共同处理溢洒物，必要时，还需配备一名现场指导人员。

1.3.2 判断污染程度，用消毒灭菌剂浸湿的纸巾（或其他吸收材料）覆盖溢洒物，小心从外圈向中心倾倒适量的消毒灭菌剂，使其与溢洒物混合并作用一定的时间。应注意按消毒灭菌剂的说明确定使用浓度和作用时间。

1.3.3 到作用时间后，小心将吸收了溢洒物的纸巾（或其他吸收材料）连同溢洒物收集到专用的收集袋或容器中，并反复用新的纸巾（或其他吸收材料）将剩余物质吸净。破碎的玻璃或其他锐器要用镊子或钳子处理。用清洁剂或消毒灭菌剂清洁被污染的表面。

所处理的溢洒物以及处理工具全部置于专用的收集袋或容器中并封好。

1.3.4 用消毒灭菌剂擦拭可能被污染的区域。

1.3.5 按程序脱去个体防护装备，做手卫生，处理清除溢洒物过程中形成的所有废物。

1.4 生物安全柜内溢洒的处理

1.4.1 处理溢洒物时不要将头伸入安全柜内，也不要将脸直接面对前操作口，而应处于前视面板的后方。选择消毒灭菌剂时需要考虑其对生物安全柜的腐蚀性。

1.4.2 如果溢洒的量不足 1mL 时，可直接用消毒灭菌剂浸湿的纸巾（或其他材料）擦拭。

1.4.3 如溢洒量大或容器破碎，建议按如下操作：

（1）使生物安全柜保持开启状态。

（2）在溢洒物上覆盖浸有消毒灭菌剂的吸收材料，作用一定时间以发挥消毒灭菌作用。必要时，用消毒灭菌剂浸泡工作表面以及排水沟和接液槽。

（3）在安全柜内对所戴手套消毒灭菌后，脱下手套。如果防护服已被污染，脱掉所污染的防护服后，用适当的消毒灭菌剂清洗暴露部位。

（4）穿好适当的个体防护装备，如双层手套、防护服、护目镜等。

（5）小心将吸收了溢洒物的纸巾（或其他吸收材料）连同溢洒物收集到专用的收集袋或容器中，并反复用新的纸巾（或其他吸收材料）将剩余物质吸净；破碎的玻璃或其他锐器要用镊子或钳子处理。

（6）用消毒灭菌剂擦拭或喷洒安全柜内壁、工作表面以及前视窗的内侧；作用一定时间后，用洁净水擦干净消毒灭菌剂。

（7）如果需要浸泡接液槽，在清理接液槽前要先报告主管人员；可能需要用其他方式消毒灭菌后再进行清理。

1.4.4 如果溢洒物流入生物安全柜内部，需要评估后采取适用的措施。

1.5 离心机内溢洒的处理

1.5.1 在离心感染性物质时，要使用密封管以及密封的转子或安全桶。每次使用前，检查并确认所有密封圈都在位并状态良好。

1.5.2 离心结束后，至少再等候 5 分钟打开离心机。

1.5.3 如果打开盖子后发现离心机已经被污染，立即小心关上。如果离心期间发生

离心管破碎，立即关机，不要打开盖子。关闭离心机电源至少 30 分钟，等待气溶胶沉积后开盖进行清理工作。

1.5.4 穿着适当的个体防护装备，准备好清理工具。

1.5.5 消毒灭菌后小心将转子转移到生物安全柜内，浸泡在适当的非腐蚀性消毒灭菌剂内，浸泡时间根据消毒灭菌剂的说明书确定。

1.5.6 小心将离心管转移到专用的收集容器中。一定要用镊子夹取破碎物，可以用镊子夹着棉花收集细小的破碎物。

1.5.7 通过用适当的消毒灭菌剂擦拭和喷雾的方式消毒灭菌离心转子仓室和其他可能被污染的部位，空气晾干。

1.5.8 如果溢洒物流入离心机的内部，需要评估后采取适用的措施。

1.6 评估与报告

1.6.1 对溢洒处理过程和效果进行评估，必要时对实验室进行彻底的消毒灭菌处理和对暴露人员进行医学评估。

1.6.2 按程序记录溢洒处理的相关过程并报告给相关负责人。

2. HIV 职业暴露处置

2.1 HIV 职业暴露的定义

HIV 职业暴露是指医务人员从事诊疗、护理等工作过程中意外被 HIV 感染者或者艾滋病病人的血液、体液污染了皮肤或者黏膜，或者被含有 HIV 的血液、体液污染了的针头及其他锐器刺破皮肤，有可能被 HIV 感染的情况。

发生 HIV 职业暴露后，应立即实施局部处理措施，尽快报告，到职业暴露处置机构接受处置。如需服用暴露后预防药物应尽早开始服用，将职业暴露感染风险降到最低。

2.2 局部处理

2.2.1 皮肤暴露：用肥皂液和流动水清洗伤口或污染的皮肤。如有伤口，应当在伤口旁端轻轻挤压（从近心端向远心端挤压），尽可能挤出损伤处的血液，再用肥皂液和流动水进行冲洗；禁止进行伤口的局部挤压。受伤部位的伤口冲洗后，应当用消毒液（如 75%乙醇或者 0.5%碘伏）进行消毒，并包扎伤口。

2.2.2 黏膜暴露：用生理盐水（或清水）冲洗黏膜至少 15 分钟。

2.3 及时报告和处置

发生 HIV 职业暴露后，应在 1 小时内报告用人单位。用人单位应当在暴露发生后 2

小时内向辖区内的处置机构报告，并提供相关材料，配合处置工作。暴露人应在用人单位的安排下到当地职业暴露处置机构接受规范处置。

2.4 感染危险性评估、服药

尽早开展感染危险性评估。如需服用暴露后预防药物，尽早（2 小时之内）开始服用，最好不要超过 72 小时。如果在此时间内无法获得药物，即使超过 72 小时也建议服药。推荐服药疗程为 4 周。

对于交通不便的单位，为节约时间，可以在暴露人去职业暴露处置机构之前，请处置机构先远程进行初步的感染危险性评估，如需服药，尽早完成首次服药，再到处置机构完成后续处置工作。

2.5 HIV 职业暴露预防和处理流程

具有 HIV 职业暴露风险的医疗卫生人员要掌握 HIV 职业暴露预防和处理要点，以便发生暴露后能够快速应对、规范处置。流程见图 1-2-1。

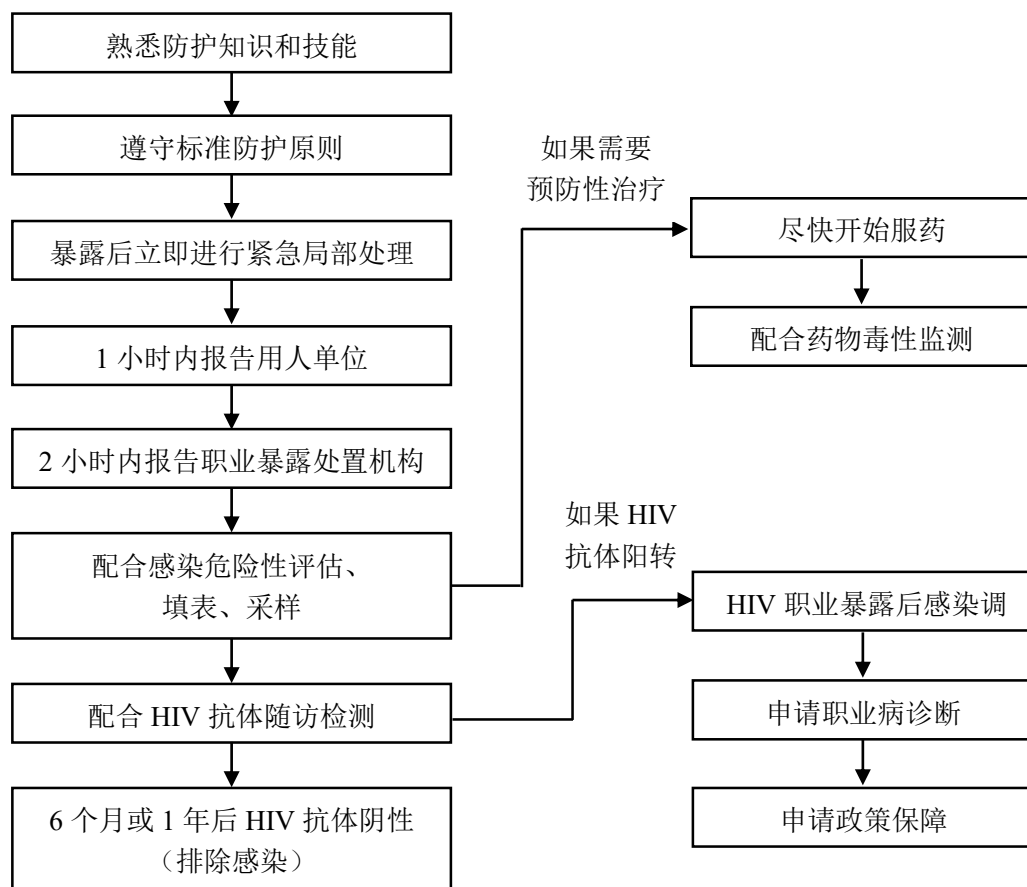


图 1-2-1 HIV 职业暴露预防和处理流程

2.6 实验室应制定 HIV 职业暴露预防和处理作业指导书,准备急救箱(内含消毒液、棉签、创可贴和医用纱布等),必要时储备 HIV 职业暴露后预防药物。

参考文献

1. 中华人民共和国国务院. 病原微生物实验室生物安全管理条例(2018 修订版)[Z]. 2018.
2. 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 实验室生物安全通用要求: GB 19489-2008[S]. 2008.
3. 全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国生物安全法[Z]. 2021.
4. 中华人民共和国卫生部. 医务人员艾滋病病毒职业暴露防护工作指导原则(试行)[Z]. 2004.
5. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床实验室生物安全指南: WS/T 442-2024[S]. 2024.
6. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南: WS/T 360-2024[S]. 2024.
7. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 人间传染的病原微生物名录[M]. 2023.
8. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 病原微生物实验室生物安全通用准则: WS 233-2017[S]. 2017.
9. 国家卫生计生委办公厅. 关于印发职业暴露感染艾滋病病毒处理程序规定的通知 [EB/OL].[2023-10-19].
https://ncaids.chinacdc.cn/fzyw_10256/jsgf/201507/t20150724_117600.htm
10. 中国合格评定国家认可委员会. 实验室生物安全认可准则: CNAS-CL05[S]. 2019.
11. 人民卫生出版社. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册(第 5 版)[M]. 2023.

第二篇 艾滋病检测的室内质量控制

第一章 总论

广义的室内质量控制包括获得检测结果所有步骤的内容，如检测前仪器设备的正确校准、检测人员的有效培训、检测过程中尽量保持环境条件的稳定、检测后对结果数据进行评价等。但在实际工作中，我们说的室内质量控制（internal quality control, IQC），简称室内质控，是由实验室检验人员按照一定的频度连续测定质控样本中的特定组分，并采用一系列方法对质控样本测定结果进行评估，以推断和评价同批次样本测量结果的可靠程度，以此判断检验结果是否可以发出。通过室内质量控制程序，在实验室检验过程中加入质控品，对照比较检验结果是否符合预期范围，其目的在于监视检测过程，及时发现检测系统中的异常变化。

第一节 室内质量控制要素

实验室检测结果可分为定量和定性结果，以统计学为基础的室内质量控制可分为定量检测的室内质量控制和定性检测的室内质量控制。为正确有效地开展室内质量控制，实验室质量管理和技术人员需要对室内质量控制涉及的有关统计学基础知识、检测误差知识以及常用质量控制方法有充分的了解。

1. 定量检测的室内质量控制

定量检测的特点是检测结果的连续性。在定量检测的室内质量控制中，常用的室内质控方法是通过测定已知浓度的质控品，将测定结果与已知值进行比较，以评价定量检测方法的质量表现。为了便于分析和及早发现检测过程中存在的问题，使用统计技术对质控值进行归纳和整理，因此，这样的质量控制方法称为统计质量控制方法。

1.1 实验室的测量误差

误差泛指实测值与真值之差。产生误差的原因很多，有些与分析方法有关，有些与试剂及质控品有关，还有些与方法操作的环境条件及操作人员有关。误差按其产生的原因和性质可分为随机误差（random error, RE）和系统误差（systematic error, SE），两者合并称为总误差（total error, TE）。

随机误差是测量结果与在重复性条件下对同一被测量进行无限多次测量所得结果的平均值之差，是在重复测量中以不可预见方式变化的测量误差的分量。以不可预见方式变化，是指在相同条件下多次测量时误差的绝对值和符号变化不定，时大时小、时正时负，不可预测。虽然单个随机误差是不可预测的，但就整体而言却服从一定的统计规律，故可用统计方法估计其界限或评估其对测量结果的影响。减小随机误差的方法，主要是严格控制试验条件，保持测量系统的稳定，另外还可通过增加测量次数的办法减小随机误差。

系统误差是指在重复性条件下，对同一被测量进行无限多次测量所得结果的平均值与被测量的真值之差。系统误差在测试过程中往往按一定的规律重复出现，一般有一定的方向性。系统误差对测量结果的影响若已识别并可定量表述，可通过估计的修正值予以补偿。通过对检测过程或检测系统经常使用计量标准或标准物质进行校准，可消除和减小系统误差。

过去的质控理论将过失误差作为一类误差单独列出。过失误差，也称为粗大误差，是由于检测人员在工作中的过失引起在检测过程中产生较大误差，比如错用试剂、加样量不准、读错结果或记录错误等。在建立了完善质量管理体系的实验室中，过失误差是不允许出现的。

1.2 检测的正确度、精密度和准确度

正确度是指无穷多次重复测量所得量值的平均值与一个参考量值的一致程度。正确度反映了检测系统的系统误差大小，通常以偏倚来度量检测系统的正确度。偏倚越大，说明正确度越差，系统误差越大。

精密度是指在一定条件下进行多次测定时，所得测定结果之间的一致程度。精密度反映了测量结果中随机误差的大小。精密度无法直接衡量，往往使用不精密度，比如标准差和变异系数来描述。标准差或变异系数越大，说明精密度越差，随机误差越大。

在检测工作中，准确度是测量结果中系统误差与随机误差的综合，反映了总误差的大小。检测实验室更关心总误差，以判断检测系统给出正确结果的能力，当检测系统提供较小的测量误差时说明该检测系统是较准确的。

由上可知，准确度是由系统误差和随机误差所决定的，而精密度是由随机误差决定的。在检测过程中，虽然有很高的精密度，但并不能说明试验结果准确。只有消除了系统误差之后，也就是提高了正确度之后，精密度和准确度才是一致的。通过正确度与精

密度两个概念之间的关系（图 2-1-1）可知，精密度高是准确度高的前提，但精密度高不一定准确度高，只有通过仪器校准、比对试验等消除系统误差，才能保证检验结果的准确度。实验室通过对质控物进行重复测量的统计质量控制，可描述和控制测量系统的稳定性，提高精密度，是保证检测结果质量的重要手段。

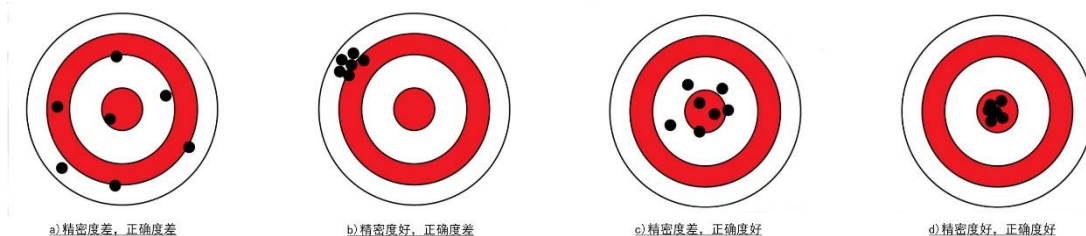


图 2-1-1 正确度与精密度的关系

2. 定性检测的室内质量控制

定性检测的特点是检测结果的二元性，即根据预先设定的临界值（cut-off value）将检测结果判断为阴性或阳性。随着检测技术发展，很多检测项目都可进行定量检测，因此大部分室内质量控制的规则根据定量检测设定，实验室通常会忽视定性检测的室内质控要求。

定性检测的室内质量控制有两个关键步骤：

（1）选择合适浓度的室内质控品

定性检测室内质控品建议选择两个浓度水平：弱阳性和阴性。弱阳性质控品的浓度一般为临界值的 2~3 倍。弱阳性质控品和阴性质控品的基质应尽量与检测样本一致。

（2）定性检测质控结果的判断

由于定性检测项目的结果不一定具有正态分布，通常只要质控结果符合预期定性结果就可判为在控，比如弱阳性质控品的检测结果为弱阳性，阴性质控品的检测结果为阴性。

第二节 室内质控品选择

室内质控品的选择对于确保实验室检测结果的准确性和可靠性具有重要意义。通过检测室内质控品，可以验证仪器和方法的准确性，以及评估实验过程中的系统误差等。因此，了解质控品并合理选择室内质控品是室内质量控制的保障。实验室应根据检测项目的要求确定质控品的种类、质控品检测的频次、以及质控品放置的位置等。

1. 质控品的种类

质控品是临床检验中的质量控制物质（control material, CM），物质含量已知，与实际样本的基质基本相同，用来评价或验证测量精密度和测量准确度、由于试剂或分析仪器的变化产生的分析偏差等性能特征。根据有无测定值可将质控品分为定值和非定值质控品。

1.1 定值质控品：指生产厂家联合几个使用相同检测系统的实验室，对同一质控品进行多次测定，得出均值作为该质控物的参考值。正规的定值质控品应该在说明书中给出该分析物在不同检测系统中的均值和预期范围。

1.2 非定值质控品：与定值质控物的质量是一致的，只是没有提供预期范围。

无论是定值还是非定值质控品，实验室均应根据自身检测系统确定自己的质控范围，质控品检测结果仅用于监督自身检验方法的精密度，并不能用于判断检验方法的正确度。

2. 质控品的选择原则

良好的质控品应同时具有以下几点特征：

2.1 良好的稳定性：质控品的稳定性包括开瓶稳定性和不开瓶稳定性。不开瓶稳定性决定了质控品的批次效期，开瓶稳定性好则保证了质控品最大程度的被使用，减少浪费。

2.2 瓶间变异小：瓶间变异性应小于分析系统的变异，只有质控品瓶间差足够小，才能更准确的反应检测系统的真实状态。

2.3 合适的质控品浓度：所选质控品的浓度应位于临床有意义的浓度范围内。

2.4 与患者样本基质的一致性：质控品的成分应与患者待测样本具有相似或相同的基质。

2.5 多项目复合质控品：将合适的多个项目复合在同一个瓶中，可精简实验室质控品类、减少仓储成本、缩短工作时间、提高工作效率，进而减少失误。

3. 质控品的检测频次和位置

质控品的检测频次和位置应反映检测系统的性能。为满足不同实验室情况的需要，实验室可额外增加质控品以及放于不同的位置。对于每一检测项目在规定的分析批内必须检测质控品。在每一个分析批内至少对质控品作一次检测。根据不同情况，可增加或减少质控品测定次数。质控品放置位置，原则是在报告一批检测结果前，应对质控结果做出评价。进行非连续样本检测时，质控品放在样本检测之前，可监测偏倚；如将质控品平均分布于样本检测中可监测漂移；若随机分布于样本检测中，可检出随机误差。在

任何情况下，都应在报告检测结果前评价质量控制结果。拟更换新批号的质控品时，应在“旧”批号质控品使用结束前，将新批号质控品与“旧”批号质控品一起测定，按照设定均值和控制限的步骤，设立新的均值和控制限。比如使用化学发光检测时，必要时可以在样本检测前、检测中和检测后分别进行质控，形成完整的闭环。使用酶联免疫检测或抗体确证检测时，质控品应放在不固定的位置。

第三节 室内质控规则和质控图

质控规则是室内质控过程中用于解释质控数据和评估分析批是否在控的判断规则。质控图是通过将质控结果绘制为图形，通过图形中质控结果的分布和变化趋势评估检测过程是否在控的一种工具。

1. 室内质控规则

质控规则是解释质控数据和判断分析批控制状态的标准，应具有高的分析误差检出能力，即可检出随机误差和系统误差。

1.1 定量检测的室内质控规则

常用的质控规则主要有六条（ \bar{x} ：平均数； S ：标准差）。

1.1.1 1_{2S} ：一个质控结果超过 $\bar{x} \pm 2S$ ，提示警告。

1.1.2 1_{3S} ：一个质控结果超过 $\bar{x} \pm 3S$ ，提示随机误差（可能也有系统误差），该批测试失控。

1.1.3 2_{2S} ：在批内测试中，若有两个浓度质控品的测定结果（或三个浓度质控品的测定结果中有两个）同时超过了 $\bar{x} + 2S$ 或 $\bar{x} - 2S$ ，为违背此规则；在批间测试中，当某一浓度的质控品在此批和前一批中的测定结果同时超过了 $\bar{x} + 2S$ 或 $\bar{x} - 2S$ 为违背此规则，表示存在系统误差。

1.1.4 R_{4S} ：同批两个质控结果之差值超过 $4S$ ，为违背此规则，表示存在随机误差。

1.1.5 4_{1S} ：一个质控品连续四次测定的结果都超过 $\bar{x} + 1S$ 或 $\bar{x} - 1S$ ，为违背此规则，表示存在系统误差。

1.1.6 $6\sim 10X$ ：六个到十个连续的质控结果在平均数一侧，为违背此规则，表示存在系统误差。

在艾滋病检测项目中，化学发光免疫检测、酶联免疫检测、 $CD4+T$ 淋巴计数检测、HIV-1 核酸定量检测等定量和半定量检测试验适用于以上室内质控规则。

1.2 定性检测的室内质控规则

在艾滋病检测项目中，HIV 抗体/抗原快速检测或免疫印迹检测、HIV-1 核酸定性检测、耐药位点检测等均是对检测样本进行定性检测分析。

对于定性检测，当质控品的检测结果与预期定性结果相同时，即为在控。当质控品的检测结果与预期定性结果不相同，出现假阳性（分析物为阴性的样本检测结果为阳性）、假阴性（分析物为阳性的样本检测结果为阴性）或检测结果无效（比如质控品检测时快速检测试剂盒质控带未显示）即为失控。

2. 质控框架平移法

质控框架平移法是一种基于滚动式数据分析的质量控制方法，是在原有质控数据的基础上，将已经证实有效的质控框架应用于当下实验。

在实际工作中，如果一种检测试剂连续两个批号间差异足够小，即 $<1/3$ 允许总误差（TEa），此时可以延用上个批号的质控框架，即为质控框架平移，也称为顺延。

质控框架平移法适用于质控频率较低的项目，且检测试剂或质控品的稳定性良好。当新批号检测试剂累计 20 个质控结果后，可采用质控图法。

3. 质控图

质控图（quality control chart）是对检测过程的质量加以测定、记录从而评估和监察过程是否处于控制状态的一种统计图，是用于判断检测过程正常还是异常的一种统计工具。质控图的主要参数包括：中心线（central line, CL）、上控制界限（upper control limit, UCL）和下控制界限（lower control limit, LCL），以及按时间顺序抽取的样本检测数据描点。CL、UCL 与 LCL 统称为质控限（control lines），若质控图中的数据描点落在 UCL 与 LCL 之外或数据描点在 UCL 与 LCL 之间的排列不随机，则表明过程异常。最常用的质控图是 Levey-Jennings 质控图。

3.1 建立质控图参数

3.1.1 均值（mean, M）：根据至少 20 次质控测定结果，对数据进行离群值检验（剔除超过 3S 以外的数据），计算出平均数作为均值绘制中心线。

3.1.2 标准差（standard deviation, S）：是描述样本与均数之间离散程度的一个指标，是与质控品检测值均值有关的预期范围。

3.1.3 变异系数（coefficient of variation, CV）：是反映各次测量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。CV 以小于 20%为宜。

3.1.4 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测量值的均值加减 2 个标准差；按照 1_{3S} 质控规则，控制限为外部质控品测量值的均值加减 3 个标准差。

需注意的是，HIV-1 核酸定量检测结果需换算成 Log_{10} 值后计算平均值和标准差；HIV-1 核酸定性检测结果可以靶标的检测 Ct 值计算平均值和标准差。

3.2 绘制质控图

以常用的 HIV 抗体酶联检测为例，将均值 (\bar{x}) 和标准差 (1S、2S、3S) 分别在质控框架图中标示出来。以酶联检测结果 S/CO 值作为纵坐标 (Y 轴)，每一批次试验作为横坐标 (X 轴)，绘制质控图。

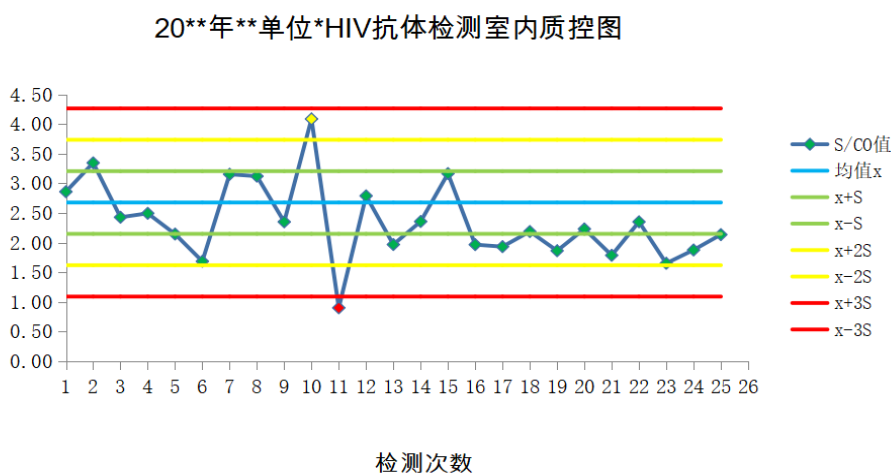


图 2-1-2 质控图示例

3.3 绘制和分析质控图的要点

(1) 建立质控图控制限时，应删除超过 3S 的数据。

(2) 位移：如果 3~5 次连续质控检测值都落在均值（中心线）的一侧称为位移，通常表示存在较大的变化，提示失控。引起位移的原因有使用新批号的试剂、更换厂家试剂、试验环境改变（如温度）、仪器故障等。

(3) 趋势：当 5~7 个连续质控检测值几乎按一个方向分布时称之为趋势，通常由参数的缓慢改变引起，如试剂放置时间长或失效、移液器逐渐不准确等。

(4) 由专人负责建立质控图，每月定期召开质控分析会，讨论本月的质量控制情况。

(5) 建议长期和稳定地使用一种质量好的试剂，更换不同厂家的试剂后，须重新绘制质控图。改用新批号试剂如外部质控品测定出现较大变化也应重新制作质控图。使用新批号或不同厂家的试剂，必须在质控图上注明使用日期。

(6) 发现质控结果失控，应填写报告单，上交质量负责人，分析原因并决定是否发出检测报告。

(7) 使用新批次的外部质控品时，如测定值出现较大变化，须重新绘制质控图。变异系数小于 20%，表示外部质控品处于稳定状态。

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：

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

3.2.2 计算 \bar{x} 和 S。

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

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

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

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

表 2-1-1 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 上限和 SI 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 上限和 SI 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 上限和 SI 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。

第四节 室内质控失控分析与处理

室内质量控制是确保实验室检测结果准确性和可靠性的重要环节。然而, 室内质控过程有时可能会出现失控的情况, 即检测结果偏离了预期范围。在这种情况下, 需要进行失控分析与处理, 通过系统性分析确定失控原因, 及时纠正并采取预防措施, 可切实提高实验室质量管理水平。

1. 失控的种类

实验室检测质量控制的关键问题在于分清误差类型。检验误差类型主要包括:

1.1 随机误差: 严密监测和控制使其限制在临床允许的范围之内, 并逐步使之缩小。

1.2 系统误差: 要求尽快发现, 及时校正。

1.3 过失误差: 尽量消灭。

2. 失控原因分析

当出现失控时, 重复进行质控品检测或重新分析新的质控品不是最有效的方法, 应当找出问题原因和解决问题的方法, 消除问题, 防止将来出现同样的问题。实验室应建立质控图分析及失控情况处理程序。

2.1 初步查找失控类型和失控原因

失控原因的查找过程并无固定模式, 一般由易到难、由近到远的查找。回顾性分析检测过程, 选择性复查、分析、判断失控原因。

2.2 与技术人员一起复习操作指导书:

2.2.1 检查操作步骤是否有遗漏或改变;

2.2.2 核查试剂及各组分的有效时间, 是否过期;

2.2.3 核对孵育的温度和时间;

2.2.4 检查仪器运行是否正常, 仪器如加样器、酶标仪和免疫分析仪等是否校准等;

2.2.5 检查纯水的质量；

2.3.6 检查试剂是否被污染，贮存条件是否合适。

2.3 通过检测数据分析失控原因

2.3.1 原始数据分析：原始数据包括空白对照、阴性对照、阳性对照、标准品等检测数据。如果这些原始数据一致，表明无明显系统误差，失控原因由于质控品或该管操作有问题造成误差的可能性较大。这时应分析同一瓶质控品的其他项目测定是否也有结果异常，如果有异常，说明质控品本身有问题；如果无异常，说明该管操作有问题。

如果这些原始数据不一致，表明该批检测中可能有系统误差，失控原因来自试剂仪器或操作等的可能性较大。观察仪器检测其他项目的结果有无异常。如果有异常，说明仪器原因；如果无异常，说明试剂或操作等原因。

2.3.2 质控图分析：进一步通过质控图观察失控是否发生在渐变的基础上。如果是渐变的，则由渐变的误差因素造成；否则，由突然发生的误差因素造成。发生位移和趋势的最常见原因是试剂或质控品失效，试剂盒中酶结合物最容易失效。另外试剂在运输和贮存过程中条件不当时，也容易失效。

引起位移的主要原因有：（1）使用一批新批号试剂；（2）更换新试剂；（3）孵育温度改变；（4）新的技术人员（加样技术也许不同）；（5）仪器改变（如加样器等）。

引起趋势的主要原因有：（1）试剂失效；（2）仪器有问题。

3. 失控后的处理

针对失控原因进行分析，排查出失控原因后，应采取相应纠正措施，并验证纠正措施的有效性。在纠正措施经验证有效后，恢复检验，评估最后一次成功质量控制活动后的样本检测结果，填写失控报告。

第五节 室内质控数据的管理

实验室应及时将质控结果记录在质控图上。在记录质控数据时，应同时记录对解释质控数据有重要意义的所有信息，以便为此后发生失控时查找失控原因提供可能。

1. 室内质控数据的范围

室内质量控制的信息通常包括：质控品的信息（如质控品的生产厂家、检测成分、批号、有效期等），分析仪器的信息（如仪器的型号、编号等）、试剂信息（如试剂的生产厂家、批号、有效期等）、检测人员、以及检测时的环境条件等。

每个月的月末，实验室应对当月的所有质控数据进行汇总和统计处理，统计的内容至少应包括：

- 1.1 当月每个检测项目原始控制数据的平均值、标准差和变异系数；
 - 1.2 当月每个检测项目除外失控数据后的平均值、标准差和变异系数；
 - 1.3 当月及以前每个检测项目所有在控数据的累积平均值、标准差和变异系数；
- 当月所有质控数据汇总整理后，应将汇总表上报实验室质量负责人。

2. 室内质控数据的保存

每个月的月末，实验室应将当月的所有质控数据汇总整理后存档保存，存档的质控数据应包括：

- 2.1 当月所有检测项目的原始质控数据；
- 2.2 上述项内所有统计的数据；
- 2.3 当月的失控分析报告。

3. 室内质控数据的长期利用

实验室应当周期性地汇总、检查和评价室内质量控制的数据，评估一段时间的控制数据，以回答以下两个问题：（1）实验室当前的质量（随机和系统误差）如何？质量是否发生了显著的变化；（2）控制图中，用于监测分析失控的控制限和中位线是否仍然最佳。

每个月的月末，实验室都要对当月室内质控数据的平均值、标准差、变异系数及累积平均值、标准差、变异系数进行评价，查看与以往各月的平均值之间、标准差之间、变异系统之间是否有明显不同。如果发现有显著性变异，应对控制图的均值、标准差进行修改，并要对控制方法重新进行设计。如检测频次过低（每周不足一次时），可适当延长评价周期，但最长不应超过一个季度一次。

另外，许多机构（包括一些商品质控物的生产厂家）提供了室内质量控制数据的实验室间比对计划。这些计划允许分析同一批号质控物的特定实验室向其提供每月的室内质控汇总统计量（平均值、标准差和数据个数）。通过将本实验室的均值与其他实验室产生均值的平均值或中位数进行比较，可显示出本实验室的分析性能，对于解决实验室潜在的问题有很大帮助作用。

参考文献

1. 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床实验室管理办法[Z]. 2006.
2. 中华人民共和国卫生部医政司. 临床检验操作规程(第4版)[Z]. 2015.
3. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法[Z]. 2010.
4. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床实验室定量测定室内质量控制指南: GB/T 20468-2018[S]. 2018.
5. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定室内质量控制: WS/T 641-2018[S]. 2018.
6. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求: WS/T 494-2017[S]. 2017.
7. 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 检测和校准实验室能力的通用要求: GB/T 27025-2019[S]. 2019.
8. 中国疾病预防控制中心. 艾滋病病毒抗体快速检测技术手册[Z]. 2011.
9. 中国疾病预防控制中心. 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[Z]. 2013.
10. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南[Z]. 2013.
11. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南[Z]. 2013.

第二章 抗体和抗原检测的室内质量控制

抗体和抗原检测是艾滋病检测的常用方法，包括用于筛查试验的化学发光免疫检测和酶联免疫检测、快速检测，用于补充试验的抗体确证检测，以及用于区分新近感染者和既往感染者的新近感染检测等，本章将介绍抗体和抗原检测常用方法的室内质量控制，以保证艾滋病抗体和抗原检测质量。

第一节 筛查检测

实验室使用的艾滋病筛查检测方法包括化学发光免疫检测、酶联免疫检测、和快速检测。血液样本（包含血清、血浆和干血斑）既可检测 HIV 抗体，也可联合检测 HIV 抗体和抗原（同时检测 HIV-1 p24 抗原和 HIV-1/2 抗体）。口腔黏膜渗出液和尿液样本一般用于检测 HIV 抗体。本节介绍了艾滋病筛查检测方法的室内质量控制，包括室内质控品选择和制备、质控品检测频次和位置、失控原因分析及处理等。

1. 室内质控品选择

1.1 选择原则

化学发光免疫检测和酶联免疫检测，通常选择设置强阳性、弱阳性和阴性质控品；也可仅设置一个弱阳性质控，以该试剂盒临界值（cut-off）的 2~5 倍为宜。快速检测建议选择弱阳性质控，浓度宜接近所使用快速检测试剂可检出的最低浓度。

所选用室内质控品的管间或瓶间变异须小于检测系统预期的变异（ $CV < 20\%$ ）。质控品应稳定、无菌，且不含有影响试剂反应的防腐剂。

1.2 常用质控品

血液样本检测的室内质控品可以购买商业化质控品或由实验室自行制备。商品化质控品是试剂或质控品生产厂家制备并标定后获得的不同浓度的质控品，通常以 NCU/mL（national clinical unit 的缩写）为单位。实验室可对所使用的试剂进行试验，选择 NCU 值是 cut-off 值 2~5 倍的质控品。商业化质控品应置于 -20°C 以下保存并避免反复冻融，使用时需置于室温至少复温 30 分钟；正常开盖未使用完毕的质控品，须于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏，并在 2 周内使用完毕。

用于尿液或口腔黏膜渗出液抗体检测的质控品可从尿液或口腔黏膜渗出液检测试剂厂家或质控品生产厂家购买获得，参照上述血液检测质控品浓度的确定方法最终确定合适浓度的尿液或口腔黏膜渗出液检测质控品。

2. 质控品的制备

实验室可参考《实验室内部研制质量控制样本的指南》（CNAS-GL005）自制质控品。

2.1 血液检测质控品的制备

2.1.1 原料处理

血清学质控品的制备可选择血清或血浆，最好选择用血清，条件受限时可采用血浆。原料血清或血浆应无肉眼可见的溶血、黄疸、乳糜颗粒，血浆应呈清亮淡黄色。收集的血清或血浆于水浴 56℃ 热灭活 30 分钟后，在 3000r/分钟离心 15 分钟。如果血清或血浆中肉眼可见杂质较多，可用无菌纱布过滤，有必要可用 0.22μm 滤膜进行真空抽滤处理，处理后的血清或血浆即为原料质控品。阳性血清或血浆一般选用 3~5 份混合样，避免极度稀释后某种组分缺失影响。阳性血清或质控品如需稀释，尽量选用阴性血清或血浆稀释，也可尝试加入含一定胎牛血清的磷酸盐缓冲液（PBS）或者生理盐水（简称稀释液）。并可加入不影响反应的防腐剂和稳定剂，如庆大霉素+硫柳汞（最终浓度 1‰）。

2.1.2 质控品配制

根据阳性样本的检测值，在加样板上进行倍比稀释检测，如 1:2、1:4、1:8...1:2ⁿ。如果刚好稀释到 cut-off 值 2~5 倍稀释倍数可直接使用；如果没有，可调整稀释倍数，直到符合 cut-off 值 2~5 倍稀释倍数。使用清洁的容器进行稀释，如稀释 200 倍可使用 0.5mL 原料质控品+99.5mL 稀释品进行稀释，充分混匀 10 次以上。一次配制量应可满足本实验室 6 个月或 12 个月使用的量，按 1 周使用量进行分装，并注明配制时间、有效期、浓度及保存要求。

2.2 尿液检测质控品的制备

2.2.1 原料处理

实验室可使用 HIV 抗体阳性血清或血浆和 HIV 抗体阴性尿液模拟制备尿液检测质控品。HIV 抗体阴性尿液应呈无色透明或淡黄色，无肉眼可见的纤维、霉菌及其他杂质等，必要时可用无菌纱布过滤处理，处理后的阴性尿液即为质控品原料。

2.2.2 质控品制备

取 HIV 抗体阳性血清，用 HIV 抗体阴性尿液梯度稀释，如 1:2、1:4、1:8...1:2ⁿ，并充分混匀。分别用 HIV 抗体尿液快速检测试剂检测不同梯度稀释后的样本，检测结果为阳性且稀释倍数最大的对应管浓度即为最终确定的浓度。一次配制量应可满足本实验室 3 个月或 6 个月使用的量，按照每管 1 周用量进行分装、分类、标记、封口，并于-80℃ 以下保存备用。室内质控品不可反复冻融，一旦融化后应该存放 2~8℃，1 周内使用完毕。尿液 HIV 抗体快速检测阴性质控品，可采用日常 HIV 抗体检测阴性尿液作为原材料，阴性尿液性状要求及处理方式同上，处理后的阴性尿液即为阴性质控品。尿液 HIV 抗体阴性质控品分装、保存及注意事项同上述尿液 HIV 抗体阳性质控品。

2.3 口腔黏膜渗出液检测质控品的制备

2.3.1 原料处理

实验室可使用 HIV 抗体阳性血清或血浆和 HIV 抗体阴性口腔黏膜渗出液模拟制备口腔黏膜渗出液检测质控品。HIV 抗体阳性血清或血浆原料的处理见 2.1.1 部分。不同于血液和尿液，口腔黏膜分泌物样本来源于血液 HIV 抗体检测阴性人群，样本的采集要严格按照说明书执行，采集的样本应为口腔黏膜渗出液而非唾液：除了提前混匀样本处理液外，还应用口腔取样器的采样端上下两面分别沿着受试者的上、下齿龈轻轻从左至右，并从右至左两次擦拭；采样完成后应在处理液中按照说明书要求认真提取，提取后的液体应确保口腔黏膜渗出液无肉眼可见的纤维、霉菌及其他杂质，必要时可用无菌纱布过滤或 0.22μm 真空抽滤处理。HIV 抗体阴性口腔黏膜渗出液样本应无色透明，无肉眼可见的纤维、霉菌及其他杂质等，必要时可用无菌纱布过滤处理，处理后的 HIV 抗体阴性口腔黏膜渗出液即为阳性和阴性质控品原料。

2.3.2 质控品制备

取 HIV 抗体阳性血清，用 HIV 抗体阴性口腔黏膜渗出液梯度稀释（如 1:2、1:4、1:8...1:2ⁿ）并充分混匀，分别用口腔黏膜渗出液 HIV 抗体快速检测试剂检测不同梯度稀释后的样本，检测结果为阳性且稀释倍数最大的对应管浓度即为最终确定的浓度。一次配制量应可满足本实验室 3 个月或 6 个月使用的量，制备完成的口腔黏膜渗出液质控品按照每管 1 周用量进行分装、分类、标记、封口，并于-80℃ 以下保存备用。室内质控品不可反复冻融，一旦融化后应该存放 2~8℃，12 小时内使用完毕。

各实验室关于血液、尿液及口腔黏膜渗出液质控品详细的自制流程可参考《实验室内部研制质量控制样本的指南》（CNAS-GL005）执行，并开展均匀性和稳定性评价，

保存评价记录。

2.4 均匀性和稳定性评价

根据《实验室内部研制质量控制样本的指南》（CNAS-GL05）对配制的质控品进行均匀性和稳定性评价，并保存评价记录。

3. 检测频次及位置

开展化学发光免疫检测和酶联免疫检测时，每次检测除试剂盒自带的阴性和阳性内部对照质控品外，必须包含室内质控品。酶联免疫检测的质控品不能固定放置，而应随机放置且应覆盖不同的检测孔位。

无论使用血液、尿液，还是口腔黏膜渗出液进行快速检测，应按照正常操作步骤在每天检测样本之前分别检测 1 份弱阳性和 1 份阴性质控品，待质控品检测结果无误后方可进行样本的检测。当更换检测人员、更换不同试剂批号、更换不同试剂包装及更换不同厂家试剂时，需加做室内质控品检测。

4. 室内质控失控原因分析及处理措施

4.1 血清学检测出现假阳性失控的原因分析及处理方法

4.1.1 质控品原因：建议观察质控品性状，如出现霉菌或絮状漂浮物，建议更换新的质控品重新检测，如结果仍为假阳性，则该批次质控品需停用并详细查找原因。自制的质控品建议调整防腐剂用量或更换防腐剂，购置的质控品需要规范日常质控品取样步骤和保存条件，避免加样吸取质控品时引起的交叉污染和长时间非冷冻条件下保存。

4.1.2 试剂盒原因：查验试剂盒有效期及保存条件，使用同批号试剂盒再次检测如仍为假阳性，建议更换其他品牌的同种样本类型试剂盒对质控品再次进行检测；如果检测结果为阴性，说明原试剂盒质量不合格，建议对剩余原批号试剂盒进行性能验证，同时规范试剂盒保存条件。

4.1.3 操作原因：建议仔细阅读说明书，并按照说明书具体要求操作。如因结果读取时间过长，务必在规定时间内读取检测结果。

4.1.4 环境原因：试剂盒保存环境湿度过高或实验室环境温度过高，均可导致假阳性，建议规范试剂盒保存环境温湿度和实验室检测管理温湿度，确保检测结果可靠。

4.2 血清学检测出现假阴性失控的原因分析及处理方法

4.2.1 质控品原因：建议观察质控品性状，如出现霉菌或絮状漂浮物，建议更换新的质控品重新检测，如结果仍为假阴性，则该批次质控品需停用并详细查找原因。自制的

质控品建议调整防腐剂用量或更换防腐剂；同时查验质控品保存条件，避免反复冻融导致效价降低而引起的假阴性。

4.2.2 试剂盒原因：查验试剂盒有效期及保存条件，使用同批号试剂盒再次检测如仍为假阴性，建议更换其他品牌的同种样本类型试剂盒对质控品再次进行检测；如果检测结果为阳性，说明原试剂盒质量不合格。建议对剩余原批号试剂盒进行性能验证，同时规范试剂盒保存条件。

4.2.3 操作原因：实验室人员要严格按照试剂盒说明书进行操作。冷藏试剂未提前复温，开封后的试剂存放时间过长，检测结果读取时间过短及加样量过多均可导致假阴性。

4.2.4 环境原因：实验室环境温度过低会导致假阴性结果，建议有条件的实验室安装冷暖空调，没有条件的实验室应配置取暖器，确保检测温湿度符合试剂盒说明书要求。

4.3 检测结果无效失控的原因分析及处理方法

4.3.1 质控品原因：建议尽快使用同批号试剂盒对质控品和样本同时检测，如果质控品质控带未出现而样本质控带正常，考虑质控品不合格。应重新选购质控品或完善质控品配制方案重新配制质控品。

4.3.2 试剂原因：如果使用原批号试剂检测样本质控带也未出现，则提示试剂质量问题，建议查验试剂盒保存条件是否符合要求，有条件的对剩余试剂做性能验证。

4.3.3 操作原因：试剂盒未复温、加样量不足或未添加稀释液均可导致结果无效，建议按照试剂盒说明书规范操作。

4.3.4 环境原因：实验室环境温度过低可导致结果无效，应将环境温度调整为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

第二节 抗体确证检测

艾滋病抗体确证试验是目前我国使用最广泛的 HIV 补充试验，主要包括免疫印迹试验、重组条带/线性免疫试验等。

1. 室内质控品选择

1.1 选择原则

抗体确证试验检测试剂盒的组分一般已包含强阳性、弱阳性和阴性三个内部对照，通常选择试剂盒自带的三个内部对照作为质控品。

1.2 质控频率

每批次检测时都必须使用试剂盒内部对照，且试剂盒内部对照只能在同批号的试剂盒中使用。

1.3 质控品位置

实验室可以根据实验室的具体情况，设置质控品放置的位置，其原则为不要放在固定位置，最好与检测样本交叉放置。

2. 室内质控规则

2.1 强阳性、弱阳性及阴性对照都出现质控带，说明实验操作全部完成，未漏加试剂。

2.2 阴性对照未出现特异性条带，强阳性对照出现所有条带，弱阳性对照至少出现试剂盒说明书提示出现的所有条带，则试验结果有效。

2.3 若阴性对照出现特异性条带，提示存在假阳性；若弱阳性、强阳性对照出现的条带未达试剂盒要求，提示存在假阴性。一旦确定存在假阳性或假阴性，判定试验失控，不得出具检测报告。

3. 室内质控失控原因分析及处理

导致 HIV 抗体确证检测失控的因素很多，如操作失误、试剂或质控品失效、仪器设备维护不当等原因。实验室一旦出现失控，要尽快查明失控的原因，可以按照以下步骤查找：

3.1 核对实验室的温度是否满足实验的要求，温度过低会导致抗原抗体结合不完全，温度过高，可能会导致封闭液干涸，从而导致抗原抗体结合不完全；而抗原抗体结合不完全可能导致出现假阴性结果。

3.2 核对条带带型是否正常，在孵育过程中，由于条带翻转可能会导致抗原抗体结合不均匀，从而出现条带颜色不均或假阴性结果。

3.3 对蛋白印迹仪、移液器等进行检查，检查加样管道是否通畅，加样量是否准确，排除仪器设备加样量不准等原因导致的假阳性或阳性对照条带少。

3.4 核对是否使用不同批号组分，使用前试剂是否混匀，避免试剂使用不当导致的失控。

3.5 重测同一质控品。主要用以查明人为误差，操作人员每一步都应仔细操作，以查明失控的原因；还可以查出偶然误差，如果是偶然误差，重测的结果应该在允许的范围内。

3.6 更换检测试剂进行检测。如果结果在控，说明前一盒检测试剂出现问题，如阴性质控品被污染导致假阳性或阳性质控品因使用时间较长导致条带减少。

3.7 请求专家帮助。如果前 6 步都不能得到允许范围内（在控）的结果，那可能是仪器设备或者试剂的原因，此时需联系仪器或试剂厂家进行技术支援。

第三节 新近感染检测

HIV-1 新近感染检测不能用于个体诊断，可用于估计特定人群的 HIV 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、分析新发感染的热点地区和热点人群、以及指导对新近感染者进行溯源等防控工作。

1. 室内质控品选择

1.1 选择原则

由于 HIV-1 新近感染样本来源困难，不易自制，因此一般使用试剂盒自带的内部质控品，包括阴性、弱阳性及强阳性质控品。有条件的实验室可加入外部对照质控品，包括新近感染样本及既往感染样本各 1 个。

1.2 质控频次

每块检测板均应做质控，包括阴性对照（双孔），校准品、弱阳性对照及强阳性对照各 3 孔。

1.3 质控位置

按说明书要求设置，一般从第 1 列第 1~2 孔为阴性对照，第 3~5 孔为校准品，6~8 孔为弱阳性对照，第 2 列第 1~3 孔为强阳性对照。

1.4 运行的有效性和结果的计算

1.4.1 确定对照和校准品的中值 OD 值

弱阳性对照、强阳性对照及校准品的中值 OD 值为 3 孔 OD 值排序后中间的值，而不是平均值；阴性对照的中值为两孔 OD 值的平均值。

1.4.2 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

2. 室内质控规则

2.1 阳性对照和校准品的中值 OD 值以及两个阴性对照的 OD 值均必须在试剂盒说

说明书提供的质控范围内，并且所有对照和校准品的 ODn 值均必须在试剂盒说明书提供的质控范围内，该次试验的质控才有效。

2.2 若外部质控品包括已知新近感染样本及既往感染样本，检测结果应与预期结果一致。

3. 室内质控失控原因分析及处理

只要不满足质控规则的任一项，即判为失控，该试验无效，必须重复试验。若失控原因来自设备（包括检测设备、孵育箱及移液器），则对设备进行维护及校准；若来自试剂，则更换试剂；若来自人员操作失误，则严格按试剂说明书进行操作。

参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定室内质量控制: WS/T 641-2018[S]. 2018.
2. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求: WS/T 494-2017[S]. 2017.
3. 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020年修订版)[Z]. 2020.
4. 中国疾病预防控制中心. 艾滋病病毒抗体快速检测技术手册[Z]. 2011.
5. 中国合格评定国家认可委员会. 实验室内部研制质量控制样本的指南: CNAS-CL05[S]. 2018.
6. 人民卫生出版社. 临床检验质量控制技术(第3版)[Z]. 2014.

第三章 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的室内质量控制

随着我国艾滋病病毒感染者及艾滋病病人抗病毒治疗和检测咨询工作的深入开展，对 CD4+ T 淋巴细胞的检测需求日益增加，准确可靠的 CD4+ T 淋巴细胞检测为评价 HIV 感染者免疫状况、判断疾病进程、评价抗病毒药物治疗效果和估测预后提供了重要指标。保证 CD4+ T 淋巴细胞检测质量、提高检测的准确性是非常重要的工作。本章对 CD4+ T 淋巴细胞检测的室内质量控制进行介绍。

第一节 基于流式细胞术的 CD4+ T 淋巴细胞计数检测

CD4+和 CD8+T 淋巴细胞计数常用的检测方法是流式细胞术(Flow cytometry, FCM)。在实验过程中，样本和试剂的质量、实验操作人员的技能（例如对电压值调试、荧光补偿值的确定、阈值设定、数据获取量、图形分析能力）、仪器状态及数据分析方法等多种因素均有可能影响流式细胞检测结果。因此，对实验过程必须加强质量控制，增强检测数据的可靠性。本节以基于微球法的流式细胞术为例，介绍室内质量控制要求。

1. 样本质控

1.1 样本采集

1.1.1 采样时间：由于 CD4+ T 淋巴细胞数存在日间自然变化的个体差异，每个病人采样时间应尽可能集中在某个相同的时段。如：每次采样时间均在上午或均在下午。

1.1.2 采样量：成人可采集静脉血 2~5mL，采集儿童静脉血样本建议用儿童型注射器和小试管（2mL），采集婴儿样本较为困难，用小试管采集 0.5~1mL 即可。所有血样应立刻注入事先加入适当抗凝剂（肝素钠或 EDTA 均可）的试管。

1.1.3 样本混匀：采集的静脉血注入抗凝管后，立即轻轻颠倒抗凝管 6~8 次，使血液与抗凝剂充分混匀，防止血液凝固。

1.2 样本接收

1.2.1 样本质量评价

(1) 溶血：表明血液暴露在可导致红细胞溶解的条件下，提示白细胞（WBC）也可能受损。因此，溶血标本应拒收。

(2) 凝块即使是部分凝块也可能导致某些亚群的选择性丧失或改变。凝结样本不能反映体内存在的情况，因此出现凝块的样本应拒收。

1.2.2 样本如存在可观察到的任何异常，如脂血等，应记录观察结果。以便在样本处理、分析和解释过程中加以注意。

1.2.3 接收人员应核对样本管、及送检单上有关被检者的信息、如完整姓名、唯一标识符、采样日期等。如果使用双平台技术进行淋巴细胞亚群绝对计数，还应提供 WBC 浓度计数。如果信息不全或不可辨识，可拒收。

1.3 样本保存

1.3.1 原则上标本采集后应该立即检测，但是实际操作中往往无法做到。不能立即检测的标本应该保存于室温环境（18℃~25℃），EDTA 抗凝管采集的样品可稳定 12~24 小时，肝素钠和 ACD 抗凝管采集的样品可稳定 48~72 小时。

1.3.2 样本在采集后应尽快完成检测，最好在 24 小时内完成上机前处理，48 小时内完成上机检测，若采用 CD45 设门可在 72 小时内完成检测。使用双平台方法进行检测时，宜在 6 小时内获得白细胞计数和分类结果。

1.3.3 标本在保存和运输中宜尽量减少震动。

1.4 样本处理

处理样本时，应严格按照试剂说明书进行，需要注意以下几点：

1.4.1 避免淋巴细胞亚群在细胞制备过程中的损失至关重要。一般来说对细胞悬浮液的操作环节越多，细胞损失的机会就越大。建议选择全血、染色、免洗流式检测的方法。

1.4.2 使用单平台（Single platform technology, SPT）获得绝对计数，需要精确、准确的移取血液、荧光微球。建议使用反向移液法来分配这些悬浮液。

1.4.3 处理样本时，应充分混合样本和试剂后，再移至上样管。

2. 仪器性能质控

2.1 流式细胞仪

2.1.1 检测前的仪器设置

每次开机后，应先检查所有类型流式细胞仪的液路和光路稳定性以及激光管、滤光器和光电倍增管（PMT）的效率和性能。通过后再进行室内质控检测，质控通过后再进行标本检测。每次开机和关机应做好仪器保养维护。需定期进行荧光补偿的验证和调整，由仪器厂家工程师定期进行检测维护。

（1）确定仪器性能

大多数台式流式细胞仪在每次实验前应使用生产厂家建议的方法验证校准颗粒（如标准化荧光微球），以确定仪器性能是否符合规范。

（2）“分析窗口”在“样本空间”中的定位

根据应用需要调整每个参数的荧光信号放大器增益或 PMT 电压设置，以便该应用程序的常规样本出现在这些直方图通道的范围内（即“分析窗口”）。

（3）设置多色标记光谱重叠的荧光补偿（“颜色补偿”）

荧光补偿是校正一种荧光染料进入滤光片的光谱重叠的过程用于监视另一个荧光染料的窗口（见图 2-3-1）。在临床上使用的大多数仪器中，这种校正通过调整流式细胞仪上的荧光信号补偿来完成的。经过该校正，将不应该是两种荧光抗体双阳性的细胞群调整到相应的直角荧光象限中，使双阳象限中无荧光重叠。同时，避免过度补偿这是至关重要的，因为过度补偿可能会导致将双阳性细胞错误地归类为单阳性细胞。该程序可以手动执行；或者软件可以自动执行。

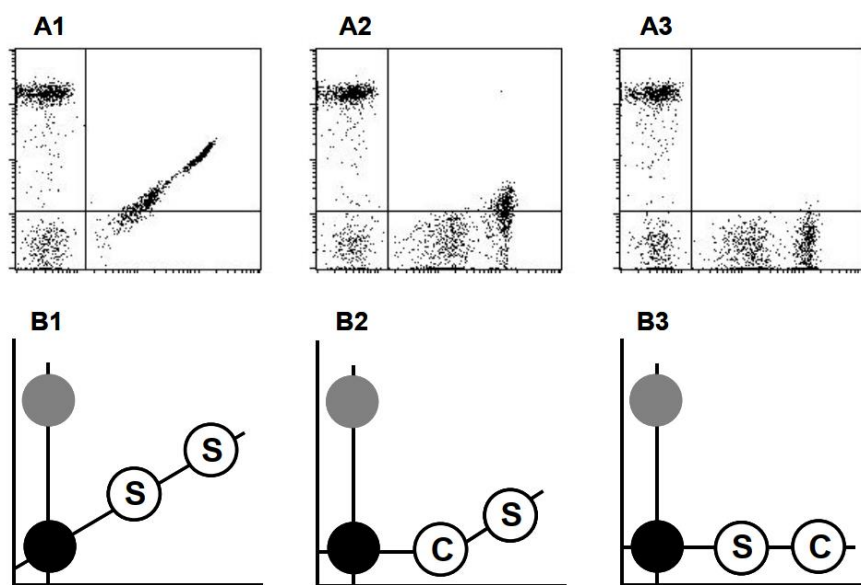


图 2-3-1 荧光补偿示意图

直方图 A1 至 A3 及其各自的示意图 B1 至 B3 说明分别为未补偿、欠补偿和正确补偿的双色显示器。这个标记为“S”的空心圆表示需要精确颜色补偿的细胞群体。标有“C”的空心圆表示用于调整颜色补偿设置。如果补偿设置的强度没有超过所分析样本的荧光强度，该样本将被过补偿（A2、B2）。如果补偿设置的强度超过荧光分析样本的强度，样本不太可能被过度补偿（A3, B3）。注：在图 A3 和 B3，未染色、补偿粒子和染色粒子的中值荧光（y 轴）单元格将大致相等。

当采用两种及以上抗体组合方案进行淋巴细胞亚群分析时，或当光学检测通道的电压及增益发生变动时，或当仪器维修保养后，都需要进行荧光补偿调整。按照操作说明书执行，避免过度补偿。

2.1.2 日常监测：利用 Levey-Jennings 质控图，观察质控品检测的趋势和变化，如果任何值超出要求的标准差范围，则应重复检测。如果问题持续存在，则调整仪器设置，或联系相关仪器厂家工程师。

2.2 移液器

定期对移液器进行鉴定并校准，确保移液器精度和准确度在正常范围内。

3. 数据分析质控

3.1 用高亮度的 CD45 和低亮度的侧向散射光确定淋巴细胞。使用 FS-SS 设门检测 CD3\CD4\CD8 时，要求待测样本尽可能新鲜，鞘液和洗液洁净，溶血和洗涤充分。检测时，可以适当增大前向散射光（FSC）和侧向散射光（SSC）的电压，有助于将淋巴细胞与碎片及单核细胞明显区分开。

3.2 对淋巴细胞进行设门时，单核细胞不能超过 3%，设门不能过小，应保证门内有 97%以上的淋巴细胞。

3.3 可靠性分析数据符合下面情况视为有效（以质控血样为参照）：

以 CD45 设门时，CD3+CD4+%与 CD3+CD8+%总和应在 CD3+%±5%范围之内；当两管都有 CD3 的三色试剂检测 CD3+CD4+与 CD3+CD8+T 淋巴细胞时，CD3 的变异性应小于等于 2%；更换操作者时，用正常血液，或者质控全血进行不少于 5 次重复检测，实验结果的变异系数应小于 10%。

4. 质控品的选择和检测频次

在 CD4+ T 淋巴细胞测定过程中，同时使用室内质控品，可帮助分析和判断仪器的准备和分析是否均处于最佳状态。稳定的全血样本可用于室内质控品，首选使用商品化质控品，使用全血质控品时，应按照说明书操作。

质控品应和检测样本同时进行免疫荧光染色，并在样本检测前进行上机测定和数据分析。如无法获取商品化质控品，实验室宜选择与检测值水平相近的质控品浓度，以保证检测值的有效性。

检测当日至少做一次室内质控，并至少包括两个浓度水平，CD4+ T 淋巴细胞的绝对细胞计数应包括低值浓度水平质控。有条件的实验室宜每批检测均进行室内质控。实

实验室应建立每一批次质控品的靶值和可接受范围，不可直接引用说明书提供的质控范围。更换新批号质控品前，可通过每日检测 4 次质控品（不同时间点），连续 5 天收集 20 次数据，计算均值。均值作为新批次靶值，结合既往累计 CV 值推算 SD。应至少选择 1_{3s} 和 2_{2s} 作为失控判断标准，应有相应的失控纠正措施。

5. 室内质控失控原因分析

如果阳性对照超出了既定的预定目标范围，则必须确定偏差的原因。

5.1 吸液不准确是导致检测错误的最常见原因。核查人员是否经过周期性培训和测评，移液器是否定期校准。

5.2 仪器设置是否按照生产厂家的要求用商业化的校准物质（如荧光微球）校准流式细胞仪并建立档案，监测仪器的性能变化。

5.3 核查试剂是否在有效期内。

5.4 全血质控品染色后的活力验证（不使用含固定剂溶血素溶血的情况下），7-AAD（7-氨基放线菌素 D）阴性者为活细胞群，7-AAD 阳性者为细胞膜不完整的死细胞群。将 7-AAD 阴性细胞群计数为 75% 时称为最低细胞活力。对于低于 75% 的细胞活力的标本，使用结合 CD45（评估淋巴细胞、单核细胞和粒细胞死亡）复染进行细胞活力的评估。

5.5 流式细胞仪的携带污染率是否大于 0.5%。（携带污染率：分析物被仪器由一个检测样本到下一个样本的携带量，从而错误地引起第二个被测样本分析物浓度的增加。）

5.6 流式细胞仪使用后是否根据厂家要求定期进行清洗及维护。检测环节诸多，需要根据具体情况逐项排查。

第二节 CD4+ T 淋巴细胞计数即时检测

随着我国艾滋病防控工作的进一步推进，感染者随访及检测咨询工作的深入开展，对 CD4+ T 淋巴细胞的检测需求日益增加。为了满足基层 CD4+ T 淋巴细胞检测技术需求，简便快速的便携式 CD4+ T 淋巴细胞仪越来越多的被基层医疗卫生机构及 VCT 点等使用，完善的质量控制对保证基层机构检测结果的准确性至关重要。

1. 样本质控

同流式细胞检测方法，按要求进行正确的样本采集、运输、接收、贮存、处理。

2. 仪器质控

2.1 以标准板校准的便携式 T 淋巴细胞计数仪

对于以标准板校准的便携式 T 淋巴细胞计数仪，仪器质控应使用仪器所配套的正常值、低值的标准板来进行。每日开机后或进行长距离移动后应使用标准板进行检测，以建立仪器质控，追踪其检测结果的 CV 值变化。

主要参考标准板指标：（1）出厂范围：每套标准板外盒上都注明各标准板的出厂范围。每次标准板检测值均应落在该范围以内。（2）变异系数：从第十次该检测板可得出变异系数开始，同一标准板有效期内同一仪器检测结果变异系数不应大于 5%。以上两个指标，若在正常范围，可进行样本的检测，任一指标不符合均为失控。当同一仪器同一标准板检测记录结果在出厂范围以外或变异系数大于 5%时应重新检测，若在正常范围，可进行样本的检测，如重新检测结果仍然如此，则通知厂家技术支持人员。

2.2 以光路成像校准的便携式 T 淋巴细胞计数仪

对于以光路成像校准的便携式 T 淋巴细胞计数仪，按照生产厂家对仪器的要求进行校准。正式检测样本前应先校准仪器，通过测试后方可检测样本。

每次仪器开机，进行自检质控：（1）激发 LED 照射测试：分别检测橙色和绿色 LED 系数，确定是否在规定的最小值和最大值，保证图像在最佳的拟合明场并在规定的范围内。（2）分辨率测试：使用橙色 LED，根据图像从暗区过渡到亮区的长度计算系统分辨率，确定其是否小于或等于规定值。（3）成像相机测试：找到 5 个以上落点值，并确定每次的放大倍数的标准偏差小于规定值，并用橙色 LED 计算出成像的放大的偏移系数，确定在其规定范围内。（4）线性 Y-移动台对齐：使用橙色 LED，用 QC2（一套明场部件）图像中心的垂直中心（图像 Y 方向）或水平中心（图像 X 方向）计算移动台的 X 或 Y 方向偏移，确定其小于或等于规定范围。仪器质控失控判定：主要参考仪器自检的四个方面，任一不满足要求均算失控，通知厂家技术支持人员。

2.3 其他类即时 T 淋巴细胞计数仪，按仪器厂家说明进行仪器质控。

3. 质控品的选择和检测频次

室内质控品的选择同流式细胞检测方法。实验室宜选择与检测值水平相近的质控品浓度，以保证检测值的有效性，建议至少每周进行一次室内质控品的检测。

4. 室内质控失控原因分析

4.1 一般标准板效期为密封时出厂后两年，开封后 6 个月。密封时检测板有效期标注在检测板外包装上，开封后需要以开封时间开始自行计算有效期。超过有效期的标准

板不得作为外部质控使用。

4.2 光路成像校准的仪器质控失控可能是仪器的主板问题，无法修复；LED 灯损坏，更换后使用。

4.3 目前市售第三方标准品以用于流式细胞仪为主，其流动性和吸光度与血液并不完全一致。当遇到吸光度不一致造成仪器质控不通过，出现错误代码时，选择继续进行检测，仪器会继续进行检测并记录该错误代码。建议对标准品摇匀时，滚动次数增加到 40 次以上，以应对标准品流动性与血液流动性不一致的情况。

参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定室内质量控制: WS/T 641-2018[S]. 2018.
2. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南: WS/T360-2024[S]. 2024.
3. 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 临床实验室定量测定室内质量控制指南: GB/T 20468-2006[S]. 2006.
4. 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 即时检验 质量和能力的要求: GB/T 29790—2020[S]. 2020.
5. 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020 年修订版)[Z]. 2020.
6. 中国疾病预防控制中心. 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[Z]. 2013.
7. 国家食品药品监督管理总局. 流式细胞仪: YY/T 0588-2017[S]. 2017.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, H42-A2. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline – Second Edition[M]. USA.: CLSI, 2007.
9. International Organization for Standardization. Medical laboratories--requirements for quality and competence[M]. Switzerland: ISO 15189, 2022.
10. International Organization for Standardization. Guidance for supervisors and operators of POCT devices[M]. Switzerland: ISO 22583, 2019.
11. Kearney E. (2013). Internal quality control. Michael J. Wheeler, Hormone Assays in Biological Fluids: Second Edition(277-89). USA.: Springer Science and Business Media.

12. HULSPAS R, O'GORMAN M R, WOOD B L, et al. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, 76(6): 355-364.

第四章 核酸检测的室内质量控制

HIV 核酸检测分为对 RNA 和 DNA 的检测，核酸检测质量的影响因素较多，可包括样本质量、试剂盒、检测相关设备、实验室设施环境、人员操作等。通过使用试剂盒内对照质控品与外部对照质控品进行室内质量控制，可以及时了解检测质量。核酸检测试剂盒内对照通常包括阴性、弱阳性、强阳性三个质控品，主要反映试剂盒的有效性。外部对照质控品有助于了解整个检测体系的运行情况。需对试剂盒内对照与外对照质控品的检测结果进行分析，以判定本次实验的检测质量，在质控品检测结果满足要求的前提下才能报告检测结果，出现检测结果失控时应及时查找原因，加以排除和改进。本章对 HIV-1 RNA 检测和 HIV-1 DNA 检测的室内质量控制进行介绍。

第一节 HIV-1 RNA 检测

目前常用的 HIV-1 RNA 检测方法包括实时荧光定量 PCR 扩增技术和 RNA 捕获探针等温扩增技术。

1. 质控品选择

1.1 质控品选择原则

HIV-1 RNA 检测的外部质控品应选择具有临床意义的病毒浓度，建议使用 HIV-1 RNA 为 1000~15000 拷贝/mL 的外部质控品。对于定值质控品，使用说明书上的原有标定值仅作为参考，实验室必须通过重复测定来确定均值和标准差。

1.2 质控品的制备

建议实验室首选使用商业质控品，实验室也可根据实际需求自制质控品。自制质控品可将大样本量的 HIV 阳性血浆用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后混匀，也可将 HIV 毒株或假病毒用 HIV 阴性血浆稀释后混匀，使用无菌冻存管定量分装，标记封口，冻存于 -80 $^{\circ}$ C 以下冰箱内存储备用。每管分装量建议满足 1 次用量，最多不超过 3 次用量，避免反复冻融，且每次使用前应充分混匀后再使用。每次自制质控品时应依照实际工作使用量，合理制备一批足够数量的外部质控品，建议有效期为 1 年。

1.3 检测频次和位置

每次实验需同时使用试剂盒内对照质控品以及一个外部质控品，外部质控品可随机放于临床样本中，以检出随机误差。所有质控品应与临床样本同步处理，参

与从提取到扩增全过程。应特别注意采取适宜措施，以降低大量样本检测或全自动核酸检测过程中阳性质控品对设备和环境的污染风险。

此外，全自动核酸提取纯化设备在使用过程中出现仪器卡顿、错位、移液装置洗头脱落等意外中断情况时，设备上的待测样本应重新进行核酸提取和检测。

2. 失控原因分析

2.1 失控情况处理

操作者在测定质控品时，如发现质控数据违背了控制规则，应上报实验室质量负责人，由质量负责人做出是否发出与测定质控品相关的样本检验报告的决定。

2.2 失控原因分析

提示失控时受多种因素的影响，这些因素包括操作上的失误，试剂、校准物、质控品的失效，样本与试剂运输、保存条件，试剂盒有效期，实验室环境温湿度，辅助设备的有效性，仪器维护不良以及采用的质控规则、控制限范围、一次测定的质控标本数等。提示失控时就意味着与测定质控品相关的那批样本报告可能作废。此时，首先要尽量查明导致失控的原因，然后再随机挑选出一定比例（例如 5% 或 10%）的样本进行重新测定，最后根据预先设定标准判断先前测定结果是否可接受，对失控做出恰当的判断。对判断为真失控的情况，应该在重做质控结果在控以后，对相应的所有失控样本进行重新测定。如失控信号被判断为假失控时，常规测定报告可以按原先测定结果发出，不必重做。

2.3 消除失控的原因

对失控的最佳处理是确认问题产生的原因，发现问题并提出妥善解决的办法，消除失控的原因，并防止以后再次发生。

第二节 HIV-1 DNA 检测

HIV-1 DNA 检测的样本类型主要是淋巴细胞、全血、干血斑或组织细胞。HIV-1 DNA 检测的主要方法有实时荧光定量 PCR、Alu-PCR 和数字 PCR 等，对 HIV-1 的病毒储存库检测和监测治疗效果等应用均有重要指导意义。本节针对 HIV-1 DNA 的定性和定量检测的室内质量控制进行介绍，以保证检测结果的准确性和可靠性。

1. 质控品

1.1 质控品的选择

每次实验均应按照试剂盒说明书的要求，使用试剂盒提供的内部质控品进行室内质控，检测结果应达到试剂盒说明书中的相应质控要求。对于 HIV-1 DNA 定性检测项目，试剂盒内对照的阳性质控样本检测结果应为阳性，可记录 Ct 值等检测数值；阴性质控样本检测结果应均为阴性，质控结果应符合试剂盒说明书的要求。

HIV-1 DNA 检测的外部质控品应与检测样本的类型一致，为全血或干血斑。质控品应包括至少三个全血或干血斑样本，包括一个不含 HIV-1 DNA 的阴性质控品和两个 HIV-1 DNA 阳性质控品，其中一个阳性质控品应为弱阳性（100~500 拷贝/10⁶ 细胞）。若使用商品化室内质控品，需严格按照质控品的使用说明书进行实验操作。

1.2 质控品的制备

1.2.1 选用 HIV 阳性感染者的新鲜抗凝全血（含 EDTA 抗凝剂），充分混匀后，按照不同 DNA 定量方法对提取样本量的需求，用无菌冻存管进行分装，标记封口，冻存于-80℃以下冰箱内存储备用。每管分装量建议满足 1 次用量，最多不超过 3 次用量，避免反复冻融，且每次使用前应充分混匀后再使用。每次自制质控品时应依照实际工作使用量，合理制备一批足够数量的外部质控品，建议有效期为 1 年。

1.2.2 如需要一次制备大量外部质控品时，可在浓度为 1×10⁶ 个/毫升的 HIV-1 阴性 PBMC 细胞或培养细胞系（例如 293T）中，按每毫升加入 100~500 个、1000~5000 个等不同浓度的 HIV-1 阳性 8E5 细胞或 Ach2 细胞，制备出 100~500 拷贝/10⁶ 细胞、1000~5000 拷贝/10⁶ 细胞等不同浓度的外部质控品。用无菌冻存管分装，冻存于-80℃以下冰箱内存储备用，避免反复冻融。

1.2.3 如制备干血斑质控品，可将新鲜全血点到 Whatman 903 滤纸片或商业干血斑制备卡上，自然晾干获得。

1.3 检测频次和位置

质控品应在待测样本中随机放置。若同一次实验内使用多于 2 个批号的检测试剂或者同一次实验有多于 2 名技术人员参与操作时，均应分别针对不同批号试剂及不同人员设置各自的室内质控品。

2. 失控原因分析

2.1 对检测过程进行回顾分析，选择性复查分析判断失控原因。（1）与技术人员一起复习操作指导书，仔细检查操作步骤中是否有遗漏或改变；（2）核查试剂及各组分的有效期，包括核酸提取试剂的有效期；（3）核对 PCR 仪和移液器等分析和计量设备是

否在校准有效期内，注意 PCR 仪荧光信号是否需要校正，检测 PCR 仪的不同荧光通道间是否需要做色差补偿；（4）检查试剂是否被污染，贮存是否合适。

2.2 检测中的注意事项：（1）为确保检测准确性，减少检测的误差，HIV-1 DNA 和细胞数定量应采用同一份核酸，即在同一 PCR 反应内对 HIV-1 DNA 和细胞数定量，并确保在将核酸充分混匀后取用；（2）应采用试剂盒说明书指定或建议的提取试剂和提取方法进行 DNA 提取；若采用其他提取方案，应在使用前对该提取方法的细胞基因组 DNA 提取效率进行确认；（3）提取后的基因组 DNA 尽量避免剧烈震荡混匀；（4）应对 HIV-1 DNA 和细胞数定量扩增的不同荧光通道逐一设置正确的基线和阈值线。

第三节 HIV-1 核酸即时检测

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

完整的 POCT 检测实验室内部质量控制应是在良好实验室整体环境支持下，从样本接收到发出报告整个过程每个环节的管理过程，除了在检测人员和实验室分区上应确保满足 POCT 核酸检测的必须要求之外，对 POCT 仪器、检测过程、检测试剂、操作过程、质控品的使用以及检测数据也应进行室内质量控制。

1. 仪器设备质控

POCT 即时核酸检测仪器多为封闭式、一体化检测系统，仪器应具备自检和质控功能：

1.1 POCT 仪器应能对仪器关键组件的状态、功能、参数、就绪情况等具有实时监测和报警功能，例如器械运作组件、温控组件、光学组件、通讯连接组件等的自检。

1.2 POCT 仪器应对配套检测试剂盒的效期、完整性，内容物有效性、加样的正确性有识别检测功能，当自检（识别）不能通过时，应根据自检信息对仪器进行检修或更换新的试剂盒，重新检测。

1.3 用于 HIV-1 核酸检测的 POCT 检测仪器、离心机等设备可委托第三方公司或仪器生产厂家进行校准，每年一次。

2. 质控品的选择

POCT 试剂盒应带有内部质控品或提供具备内部质控功能的定量标准品，有的试剂盒还带有用于定量试剂校准的阳性校准品，用于监测每个样本结果的有效性和定量准确性，包含样本处理、核酸提取、扩增检测全程的监测，若内部质控结果无效，则必须重新试验。

外部质控品的选择原则：（1）可溯源性。可选择获得认证的第三方商品化质控品/标准品，或者自制质控品，在准备验证标本时，若无法获得足量阳性样本，可采用人工制备样本。若弱阳性标本不好获取，可采用适当稀释的方法获得弱阳性标本。（2）适用性。要求能够涵盖 HIV-1 型，应尽量覆盖常见亚型；此外在使用临床阳性样本自制质控品时，首次使用应先用被质控试剂进行阳性复核。（3）均质性。所选第三方质控品或自制质控品应包括不同的浓度，应至少包括一个弱阳性浓度且保持浓度一致。

3. 质控品检测频次和位置

3.1 检测频次

3.1.1 当检测环节出现改变或累计达到一定检测量之后需完成一次外部质控品的室内质控检测。例如当检测试剂更换批次、不同购买批次、更换实验操作人员、更换包装或距上次运行外部质控后累计达到一定的检测量（建议累计检测达到 50 例或 100 例）时，以及固定周期（例如每周或每月）应做一次室内质控；实验室可根据实际工作情况，设定合适的室内质控频次。

3.1.2 定性检测：建议检测时至少应有 1 份弱阳性质控品（第三方质控品或可溯源的自制临床阳性样本，质控品浓度建议设定在 POCT 试剂盒 LOD 的 5~10 倍为宜）、1 份阴性质控品（基质需与检测适用样本类型保持一致，例如阴性血浆等）。

3.1.3 定量检测：建议检测时至少应有 1 份 100~1000 拷贝/mL 浓度的弱阳性质控品（可使用商品化的第三方质控品或可溯源的自制临床阳性样本质控品）和 1 份阴性质控品（基质需相同或相近临床被测样本）。必要时，实验室可根据工作需要增加 5000~10000 拷贝/mL、20000~50000 拷贝/mL 等更高浓度的高阳质控品（可使用商品化的第三方质控品或可溯源的自制临床阳性样本质控品）。

3.2 检测位置

在使用外部质控品做室内质控时，应与待测标本同时检测，并随机排列在待测标本中上机，参照实验室在用 POCT 检测试剂的处理和上机要求，将室内质控品一起参与样本前处理、核酸提取、扩增和检测的全过程。

4. 失控原因分析

4.1 POCT 试剂盒内部质控失控原因分析

样本处理不当或存在干扰物导致 PCR 受到抑制，添加的样本体积不足，错误的样本类型，不当保存/运输导致试剂盒失效，不合适的实验环境温度，仪器缺少校准/维护等。

4.2 外部质控品失控原因分析

(1) 阳性质控品常见的失控原因：外部质控品保存条件不适宜，导致出现降解或不均一现象；检测试剂的批次差异；未严格按照 SOP 操作。

(2) 阴性质控品常见的失控原因：临床标本在采样、运输和加样环节发生标本间的交叉“污染”；不当操作导致出现扩增产物泄露，污染。

基于 POCT 的 HIV-1 定性和定量核酸检测具有较强的自动化操作流程，因此外部质控品检测发生失控的最常见原因还是检测试剂中组分失效或质控品的失效。

5. POCT 检测中导致室内质控失控的常见因素

5.1 仪器因素：长时间闲置，未定期清洁/维护，模块缺乏校准，模块有故障，仪器未放置在稳固的台面，靠近热源/通风口（温度不稳定），阳光直射，或靠近离心机/振荡器。仪器自检不通过的因素包括硬件故障、环境温度不适宜、电源不稳定、通讯连接松动，未按要求校准/维护仪器等。

5.2 环境因素：仪器运行时室内温度不在正常范围（15~26℃），部分地区温度过低或过高，积灰严重；电源电压不稳。

5.3 试剂盒因素：使用前未平衡至室温（18~28℃），过期，开盖后未及时上机；存储/运输温度过高或过低，被挤压、振荡、掉落后对试剂盒中的内容物（冻干珠/溶解液）有不可逆的影响。

5.4 样本因素：样本杂质多，未离心处理，保存或运输条件不当，样本采集管不符合要求，未正确处理。冻融次数超限，未恢复至室温。

5.5 操作因素：加入错误体积样本，未按标准处理样本/试剂盒使用/仪器操作，有粉手套，交叉污染，稀释过度。

参考文献：

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性

- 能验证: WS/T807-2022[S]. 2022.
2. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定室内质量控制: WS/T 641-2018[S]. 2018.
 3. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 实时荧光聚合酶链反应临床实验室应用指南: WS/T 230-2024[S]. 2024.
 4. 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 临床实验室定量测定室内质量控制指南: GB/T 20468-2006[S]. 2006.
 5. 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020年修订版)[Z]. 2020.
 6. 中国疾病预防控制中心. HIV-1病毒载量测定及质量保证指南[Z]. 2013.
 7. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求: CNAS-CL02-A001[S]. 2021.
 8. 中国医学装备协会基因检测分会, 中国医学装备协会现场快速检测(POCT)装备技术分会, 国家医学检验临床医学研究中心等. 新型冠状病毒核酸快速检测临床规范化应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(8): 698-702.
 13. International Organization for Standardization. Medical laboratories—requirements for quality and competence[M]. Switzerland: ISO 15189, 2022.
 14. NEWTON DW, VANDEPOELE N, YUNDT-PACHECO JC, et al. Management of Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and HIV Viral Load Quality Control Data Using Unity Real Time [J]. J Clin Microbiol, 2022,60(1): e167521.

第五章 基因型耐药检测的室内质量控制

由于艾滋病病毒本身高速复制及复制过程中缺乏自我校对功能等原因，易发生基因突变产生耐药。同时，在长期抗病毒治疗药物选择性压力作用下，艾滋病病毒耐药突变几率大大增加。耐药突变的产生和发展会影响抗病毒治疗的疗效。因此，及时进行耐药检测在艾滋病预防与治疗中具有重要作用，同时，为保证检测结果的准确性与可靠性，做好耐药检测实验室室内质量控制尤其重要，包括从样本采集及处理、核酸提取及纯化、目的基因片段扩增、基因序列测定和质量评价、序列比对和耐药位点判读及耐药解释等全部过程。

第一节 获得耐药基因片段

获得目的基因片段是基因型耐药检测的关键环节，包括样本采集制备、核酸提取纯化、扩增获得目的基因片段等多个试验流程，且主要通过人员的手工操作完成，应通过室内质控确保各个流程得到严格的质量保证。

1. 样本质控

常用的样本是血浆，也可使用滤纸片干血斑（DBS）样本，样本处理和保存方法应不影响核酸的稳定性和完整性。

2. 质控品选择和制备

2.1 阳性对照

2.1.1 制备材料

（1）血浆样本阳性对照：首选 HIV 阳性血浆，也可使用 HIV 阴性血浆稀释的 HIV 毒株培养上清液，或者使用 HIV 阴性血浆稀释含有 HIV 基因片段的质粒或假病毒。

（2）DBS 样本阳性对照：首选 HIV 阳性全血，也可使用 HIV 阴性全血稀释的 HIV 毒株培养上清液制备。

2.1.2 主要技术指标

（1）应包括我国主要 HIV-1 流行亚型（CRF01_AE、B、CRF07_BC 或 CRF08_BC）。

（2）在 HIV-1 的逆转录酶和/或蛋白酶和/或整合酶区带有主要耐药基因突变。

（3）血浆样本阳性对照的病毒载量可设定为低（1000~5000 拷贝/mL）、中（5000~50000 拷贝/mL）、高（>50000 拷贝/mL）三个水平。DBS 样本阳性对照的病毒载量可设

定为 1000~10000 拷贝/mL，或 >10000 拷贝/mL。

(4) 对上述技术指标应至少检测 3 次，准确鉴定 HIV-1 基因亚型、病毒载量和耐药基因突变。

2.1.3 制备方法：

使用全血、血浆或病毒培养上清液，用 HIV 阴性全血或血浆稀释成特定的病毒载量水平，制备成稀释的血浆样本或 DBS。注意稀释样本应充分混匀，全血不能溶血，最好一次制备可满足 1 年的使用量。DBS 样本置于含干燥剂的密封袋，在 -80℃ 或以下保存。

2.2 阴性对照

2.2.1 制备材料：

- (1) 血浆样本阴性对照：HIV 阴性血浆；
- (2) DBS 样本阴性对照：HIV 阴性全血。

2.2.2 制备方法：

常规方法采集全血或血浆，最好一次制备可满足 1 年的使用量。DBS 样本应置于含干燥剂的密封袋中，在 -80℃ 或以下保存。

3. 质控品的检测频次和位置

3.1 检测频次和位置

对于每一批检测样本，从核酸提取纯化开始，将质控品随机加入待检样本中，一般每 50 份样本应至少使用 1 份阳性对照和 1 份阴性对照。可根据预估的污染风险、实验室条件及人员操作的熟练程度，适当增加阳性对照或阴性对照的数量。质控品与待检样本应同步操作，直到完成耐药突变检测和耐药解释，从而实现检测全流程的监控。进行 RT-PCR 时，应增加设置以水代替模板的空白对照，用于监控实验室污染。

预计实验室污染风险较高时，例如不久前曾发生过污染、或限于客观条件实验室分区不严格，或人员操作经验不足等，可增加使用阴性对照的数量，每 50 份待检样本可使用 2~3 份阴性对照，随机混入待检样本中。

3.2 质控品的数量

如实验室的技术水平较低，例如初建的实验室、新上岗技术人员等，可选择高水平病毒载量的阳性对照；技术成熟的实验室一般应使用低水平病毒载量的阳性对照；有条件的实验室每 50 份样本应使用 2~3 份中、低病毒载量的阳性对照。

应选择待检人群中流行率最高的病毒基因亚型作为阳性对照，有条件时可使用 3 种

主要基因亚型作为阳性对照。根据待检人群的抗病毒治疗史及使用药物，建议选择对待检人群中预计流行率最高的耐药突变作为阳性对照。

4. 质控规则及失控处置

4.1 检测在控

凝胶电泳显示阳性对照出现分子量正确的扩增条带，同时阴性对照无电泳条带，提示结果可接受，经 2 名技术人员审核确认后，可进行后续扩增产物纯化及测序。

4.2 检测失控

4.2.1 阴性对照出现扩增条带或者出现拖尾，提示来自阳性样本或实验室其他材料（质粒、病毒株等）的阳性模板污染了环境或试剂，如空白对照也同时出现电泳条带，可进一步证实发生了污染。这种情况下，不论阳性对照结果如何，同批次检测均不可接受，检测均无效。可对环境样本、核酸提取和扩增试剂等进行不加核酸模板的扩增检测，结合系统进化分析，调查污染来源和污染范围。采用稀酸擦拭或浸泡、紫外线照射、DNase I 处理等方法消除污染；采用严格实验分区并规范化操作、使用尿嘧啶-糖苷酶（UNG）、抗污染引物等方法预防污染。确认污染已消除并已落实各项预防污染措施后，可重新检测。

4.2.2 如果阴性对照无扩增条带且阳性对照无扩增产物、阳性对照的扩增产物分子量不正确、或阳性对照的扩增产物分子量虽正确但有拖尾，视为无效。应全面调查和分析原因，如是否存在样本采集和处理不当、模板量低或纯度不够、引物与模板匹配不好、扩增试剂失效、扩增条件不合适、扩增仪参数不准确等情况，根据调查结果及时改正。同批次有分子量正确扩增产物的待检样本可接着进行扩增产物纯化和测序，没有扩增产物的待检样本则需要问题调查清楚并纠正后再次检测。

第二节 基因序列测定和质量评价

基因序列测定是 HIV 耐药检测的关键步骤，也是质量控制的重要一环。目前常用一代 Sanger 测序方法，其优点是测序准确性高，读长较长，但不能检测到低丰度 HIV 准种病毒序列（如丰度<20%的劣势耐药株序列）；二代测序可对 HIV 基因进行深度测序，其技术的突出特点是通量高，可用于检测 HIV 劣势耐药株序列，并且监测 HIV 准种的组成和进化。

1. 一代 Sanger 基因测序

1.1 测序原理

基于双脱氧末端终止法原理，待测序 DNA 片段与寡核苷酸引物退火，在聚合酶的催化下，在 4 种脱氧核苷酸三磷酸（dNTP）和双脱氧核苷酸三磷酸（ddNTP）的存在下合成双链 DNA，由于 ddNTP 缺少 3'-OH，一旦被加入到新合成的 DNA 链上，这条 DNA 链就停止延伸反应，获得不同长度的 DNA 片段，通过标记 ddNTP，依次检测合成片段的碱基排列顺序。

1.2 主要测序流程

1.2.1 DNA 测序模板的制备：通过对 PCR 产物电泳后切胶等方式分离纯化目标片段，去除寡核苷酸、杂带和杂质。

1.2.2 测序反应和纯化：在反应体系中加入纯化的目标 DNA 片段、测序引物、dNTP 和 ddNTP、聚合酶和缓冲液，进行测序循环反应；利用乙醇沉淀等方式纯化测序反应产物。

1.2.3 毛细管电泳：纯化后的测序产物电泳，收集荧光信号，读取序列数据。

1.3 测序数据的质量评价

1.3.1 起峰位置应在引物下游 50bp 左右。

1.3.2 碱基峰高度应正常、波峰与波谷应清晰可分辨，峰与峰之间距离应均匀。

1.3.3 有效读长应在 500bp 以上。

1.3.4 基线噪音峰应较小，不干扰主峰和次级峰的辨别。

1.4 质控品的制备和检测频次

1.4.1 质控品的制备

使用在核酸提取和扩增过程中加入的阳性对照质控品获得的目标基因片段作为测序的阳性对照。在测序反应体系中加入去离子水作为阴性对照。

1.4.2 质控品的检测频次和数量

在 96 份测序样本中至少加入 1 份阳性对照，1 份阴性对照。阳性对照有两方面作用：（1）测序模板制备、测序反应和纯化等实验过程中涉及样本标记和转移的步骤较多，可以监测是否存在样本混淆；（2）可以监测不同批次检测中序列和耐药突变结果的一致性。阴性对照也可监测是否有样本标记和转移引起的样本混淆，还可监测测序反应和纯化过程中是否存在污染。

1.5 质控规则及失控处置

1.5.1 检测在控：

同一阳性对照在不同批次检测所得序列结果间一致性需 $\geq 99\%$ ，同时阴性对照无可分辨碱基峰，提示结果可接受。经 2 名技术人员审核确认后，可进行后续序列分析和耐药判读。

1.5.2 检测失控：

(1) 如果同一阳性对照在不同批次检测所得序列结果间一致性 $< 99\%$ ，且与其他样本的序列一致性 $> 99\%$ ，说明可能存在样本标记或转移错误，检测无效，需检查操作程序，找出错误来源，制定纠正措施。

(2) 如果阴性对照可检出序列，检测无效，可做系统进化分析，调查是否存在样本标记或转移错误，或者是否存在环境、样本和试剂污染。

(3) 如果阴性对照没有可分辨的碱基峰，同时阳性对照测序也无可分辨的碱基峰，应考虑测序模板量低或纯度不够、测序引物量不够、测序引物与模板匹配不好、测序反应试剂失效、测序反应产物纯化时丢失、测序胶灌注失败。

(4) 如果阳性对照噪音峰较明显，且碱基峰较低，应考虑测序模板量低或降解、测序反应试剂失效、测序胶灌注失败和扩增仪参数不准确；阳性对照噪音峰较明显，但碱基峰较高，应考虑测序模板纯度不够、多模板、多引物结合位点、测序引物不纯。

2. 二代基因测序

2.1 测序原理

二代测序为高通量测序，在微珠或芯片中边合成边测序，通过电流或荧光信号读取序列，对数千至数百万个核酸分子测序，获得数兆甚至数 G 的数据，可用于劣势耐药突变的检测。

2.2 主要检测流程

2.2.1 病毒核酸提取，利用特定引物、随机引物等 PCR 扩增目的基因；

2.2.2 测序文库构建

(1) 核酸片段化，使用超声波、酶法等打断方法，形成 100~500bp 长度的小片段；

(2) 末端修复：使片段化 DNA 成为平末端及 DNA 平末端 5' 磷酸化处理；

(3) 添加 A 尾和接头连接：在相应酶反应下对平末端 DNA 片段添加碱基 A 和添加 Y 型接头；

(4) 文库富集： PCR 扩增富集和产物纯化。

2.2.3 建库的片段放入测序仪中测序

2.2.4 通过生物信息学分析软件将小片段拼接成长片段。每一个片段都有独立的标记“接头”，这样测序仪可以一次检测所有独立的标记“接头”的 DNA 序列信息。

2.3 测序数据的质量评价

2.3.1 以每测序单位产生的数据量先粗略评价测序深度。

2.3.2 通过质量筛选的测序单位比例应>80%。

2.3.3 碱基质量分数（Q score） ≥ 30 的比例应>70%。

第三节 序列比对和耐药位点判读

基因序列测定完成后，需通过双人判读解析突变位点和基因序列比对等质量控制措施，保证耐药结果报告的准确性，指导临床选择和优化抗病毒治疗方案、分析治疗失败的原因。

1. 保证序列比对和耐药位点判读的正确性

以 Sequencher 5.0 软件为例，进行 HIV 基因序列清理、拼接、突变位点的判读原则和要点，结合基因序列比对进行质控分析，验证基因亚型，排除疑似实验室污染序列，提高检测结果准确性。

1.1 核实最终所获得的基因序列编号与之前的样本编号是否一致或对应。

1.2 序列编辑、清理、拼接和突变位点判读须有两人完成，一人完成的序列编辑拼接和对变异位点的判读须由第二人复核，通过双人判读一致的结果才可以提交数据库。

1.3 对 5~10% 的单次提交序列按序列编辑的流程进行抽查，检查序列的修改是否正确，是否存在误读的移码，如果发现存在读码框移码序列，将序列挑出来，对照色谱图峰型进行核对。检查是否存在氨基酸的缺失/插入（indel）、误读和终止密码子。

1.4 应用 BioEdit 软件对用 Sequencher 所得到的序列排列和比对，再用 MEGA 软件对所得一组序列与参考毒株序列进行邻接法（Neighbor-Joining, NJ）进化树分析，通过对实验室以前的数据与当前数据进行比较，分析是否存在潜在的实验室污染。一旦发现污染应采取相应的措施。

2. 基因突变位点判读要点和质控

2.1 基因突变位点判读

以 Sequencher 软件为例，演示基因测序获得的 Abi 序列清理、拼接和混合碱基判读

基本过程和关键点。

2.1.1 Abi 序列末端剪切

利用软件默认的末端剪切（Trim Ends）功能，对测序获得的 Abi 序列进行序列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（图 2-5-1）。

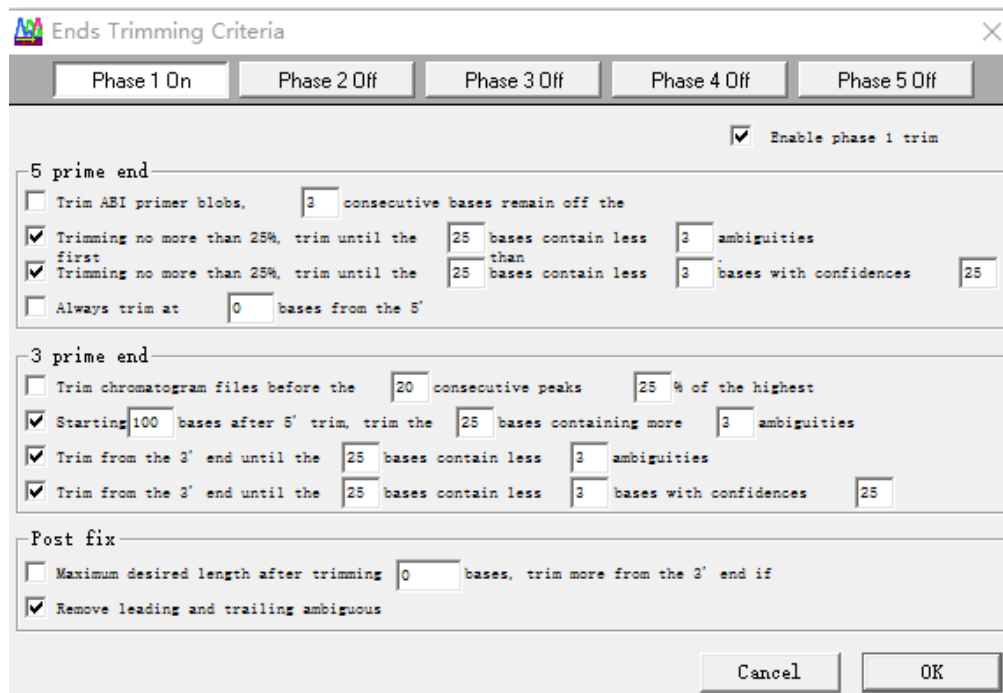


图 2-5-1 Sequencher 软件 Abi 序列末端碱基剪切参数设定

2.1.2 序列拼接

把测序获得的 Abi 序列文件拖拽到 Sequencher 5.0 中。根据测序获得 Abi 序列文件名格式，在 Sequencher 软件中设定拼接参数（Assembly Parameters），从 Abi 序列文件名提取生成样本编号（Handle，可含有测序基因区等信息）。

然后，点击 Auto Assemble by Name，拼接序列。点击 Overview，核实序列方向正确（5' → 方向），拼接后的序列指示条下面的 3 种可能开放读码框（ORF）中的一种 ORF 顺框（in frame），即能够翻译为氨基酸。

2.1.3 次级峰（secondary peak）搜索和混合碱基判定

序列拼接后，选定所有样本序列，点击 Sequence 菜单，Call Secondary Peak 进行次级峰搜索，一般设定参数为 20%。

打开序列色谱图（点击 Bases，然后点击 Show Chromatograms），启用次级峰查找快捷键（Ctrl+N），然后按空格键（Space）核实和校准每个混合碱基判读。

在基因型耐药检测方法中，出现以下 3 种情况时，应参照国际纯应用化学联合会-国

际生化联合会 (IUPAC-IUB) 规则判定混合碱基:

(1) 双向测序获得的序列均清晰地包含次级峰, 并且次级峰高度均超过临近基线噪音信号 2 倍。

(2) 双向测序获得 2 条序列, 一条序列某个碱基的次级峰至少占主峰的 20%, 并且反向序列中也存在类似现象。

(3) 双向测序只获得 1 条序列, 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%。

表 2-5-1 碱基 IUPAC-IUB 通用编码规则

碱基或混合碱基释义	中文名
A=Adenosine	腺嘌呤
C=Cytidine	胞嘧啶
G=Guanosine	鸟嘌呤
T=Thymidine	胸腺嘧啶
B=C, G or T	
D=A, G or T	
H=A, C or G	
V=A, C or G	
R=A or G (purine)	
Y=C or T (pyrimidine)	
K=G or T (keto)	
M=A or C (amino)	
S=G or C (strong-3H bond)	
W=A or T (weak-2H bond)	
N= any bases	

2.1.4 终止密码子核实和纠正

经 Sequencher 拼接后的序列点击 Overview, 如果序列下方的 3 种可能的 ORF 均存在终止密码子, 有可能序列为反向(3' -5' 方向)。在 Sequencher View 菜单中点击 Reverse & Comp, 将序列进行反向互补。

2.1.5 另一种情况是存在碱基缺失、插入或终止密码等。这种情况下, 建议选择存在有终止密码前后约 30~50 个碱基序列, 用 HIV-1 BLAST 与标准序列比对碱基差异, 并在色谱图上核对校准。

2.2 基因突变位点判读复核和序列质量控制

建议由两名经过规范培训的技术人员分别对拼接后的序列进行序列编辑清理和混

合碱基判读，以查验基因突变位点判读准确，并通过序列比对来验证序列清理和混合碱基判读准确性。必要时，可以使用 MEGA 软件构建邻接法（NJ）系统进化树，以验证基因亚型判定，排除疑似的实验室污染序列。


耐药相关的基因突变一般分基因区报告，如将蛋白酶（PRO）和逆转录酶（RT）两个基因区的基因突变分开报告。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。

3. 基因序列比对要点和质控

3.1 导出拼接后的 fasta 序列：

测序获得 Abi 序列经拼接、清理，判读混合碱基后，确认序列方向为 5' → 3'，导出 fasta 格式基因序列；

3.2 基因序列比对：建议采用 Los Alamos 国家实验室（LANL）HIV 序列数据库 Gene Cutter 工具将测序获得序列（两个人判读序列）与分型参考毒株序列一起进行基于密码子的序列比对；

3.3 碱基差异显示：用 BioEdit 打开比对后的 fasta 文件，点击控制面板上的  按键，显示序列间每一列的碱基差异，来区分不同技术人员序列清理和突变位点判读情况（图 2-5-2），在 Sequencher 文件上查看差异原因并予以校准。

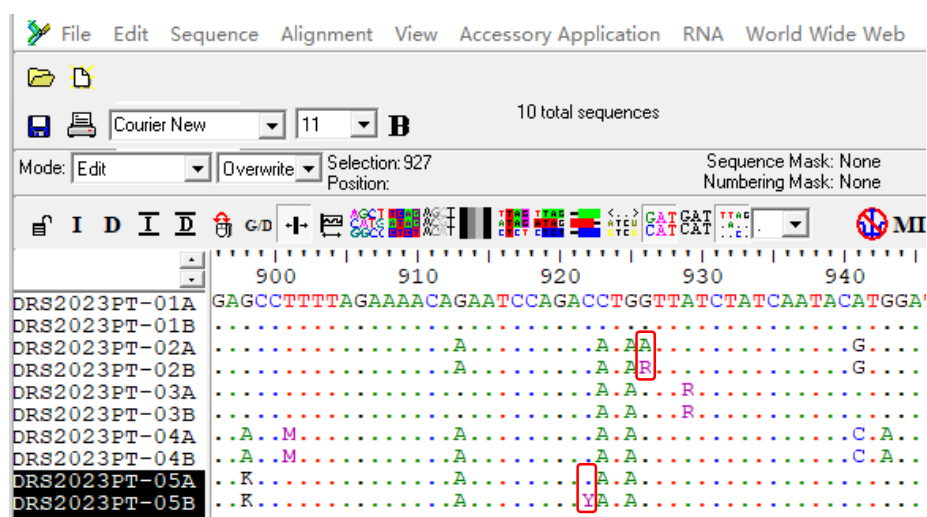


图 2-5-2 BioEdit 查验不同技术人员序列清理和基因突变位点判读情况

备注：序列 ID 中 A 和 B 指代两名技术人员；红色方框所示碱基判读

4. 系统进化树污染识别

4.1 基因序列数据

用于实验室污染监测系统进化分析的数据包括：当前检测获得的 HIV-1 *pol* 基因序列、实验室既往 3~6 个月获得的 *pol* 基因序列，LANL HIV-1 分型参考毒株 *pol* 基因序列；

4.2 序列比对和数据整理

采用 LANL HIV 序列数据库 Gene Cutter 工具将 4.1 中的基因序列数据进行基于密码子的序列比对；

应用 BioEdit 软件查看序列比对结果，删除 5' 或 3' 端参差不齐数据，保留尽可能多的公共数据集（列）。

4.3 邻接法系统进化分析，圈定疑似污染的基因序列

用 MEGA 11 软件对对比好的序列构建邻接法（NJ）系统进化树聚类分析，利用 Bootstrap 法重复计算 1000 次检验节点的可靠性（超过 70% 的节点认定为成簇可靠）。通过对当前获得的数据与实验室以前的数据进行聚类分析，尤其包含耐药能力验证获得的基因序列，分析是否存在潜在的实验室污染。对 2 条序列的 bootstrap 值为 99% 及以上，需进行流行病学调查甄别：直接或间接传播关系，抑或污染序列（图 2-5-3）。一旦发现污染应采取相应的措施。

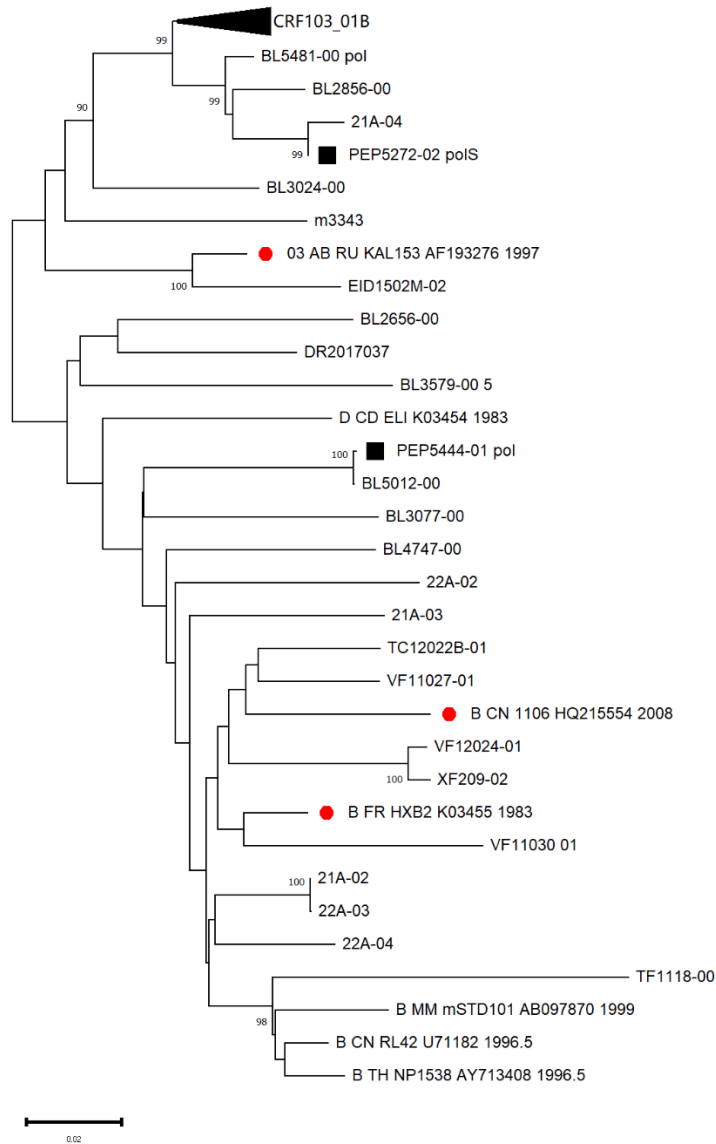


图 2-5-3 HIV-1 *pol* 基因 NJ 进化树识别潜在的污染序列

备注：1) 21A-04（2021 年耐药能力验证样本）与 PEP5272-02 为同一批次内污染，可能由于核酸提取或扩增过程中污染所致。2) BL5012-00 与 PEP5444-01 为不同批次扩增间污染；2021-8-10 进行 BL5012-00 近全长基因组扩增，疑似核酸污染实验室；2021-10-26 扩增 PEP5444-01，发生污染，且两个序列高度同源。

5. HIV-1 耐药结果解释

5.1 获得性/治疗前耐药突变分析

获得 HIV-1 *pol* 基因序列后（PR-RT 或 IN 基因片段），推荐使用斯坦福大学 HIV DB 程序 (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/By-Sequence>) 预测耐药相关突变，解析突变对抗病毒药物的耐受程度。HIV DB 程序被用于治疗前（治疗前耐药）或治疗后（获得性

耐药)横断面耐药调查分析,该程序也提供序列质量评估。

WHO 推荐的分类中,“潜在低水平耐药性(P)”的分类被认为是对特定药物“敏感(S)”的。“低度(L)”、“中度(I)”和“高度(H)”耐受的分类应被认为对某一指定药物“耐药”。

5.2 传播性耐药突变分析

对新诊断或未治疗的 HIV-1 感染者可以分析传播性耐药突变,推荐使用斯坦福大学 CPR 程序 (<https://hivdb.stanford.edu/cpr/>) 评估 PR-RT 或 IN 基因携带具有传播性耐药相关突变水平和特征。2019 年 CPR 程序做了更新,增加了 24 个整合酶监测性耐药相关突变 (SDRM)。

6. 质控规则及失控处置

6.1 *pol* 基因序列及基因突变判读在控

6.1.1 对实验检测获得的 HIV-1 *pol* 基因序列达到如下 3 个条件,则任务序列及位点判读在控:

6.1.2 拼接后的 *pol* 基因序列经 2 名技术人员分别进行基因突变判读后,经序列比对分析,耐药相关突变(混合碱基)判读一致;

6.1.3 经 NJ 系统进化树分析显示所获得 *pol* 基因序列聚类成簇,如果 2 条序列的 bootstrap 值为 99%及以上,经流行病学调查核实,排除实验室污染;

6.1.4 2 名技术人员分别判读后的序列经斯坦福大学 HIV DB 程序预测耐药相关突变,解析药物耐受程度一致。

6.2 数据分析失控及处置

6.2.1 两名技术人员分别进行基因突变判读后,经序列比对分析,耐药相关突变(混合碱基)判读不一致:混合碱基判断有差异的位点,需在 Sequencher 文件上查看测序峰图文件,分析差异原因并予以校准。

6.2.2 经 NJ 系统进化树分析显示所获得 *pol* 基因序列聚类成簇,如果 2 条序列的 bootstrap 值为 99%及以上,经流行病学调查核实排除直接或间接传播关系,则认定为实验室污染;如果流行病学数据不可及,可以重新检测予以验证,或者结合 *gag* 基因区或整合酶基因区验证传播关系抑或实验室污染。

6.2.3 两名技术人员分别判读后的序列经斯坦福 HIV DB 程序预测解析,如果耐药相关突变或药物耐受程度不一致,需要核实两者的序列差异所在,修改基因突变判读。

参考文献

1. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南[Z]. 2013.
2. 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020 年修订版)[Z]. 2020.
3. World Health Organization. WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens[M]. Geneva: WHO, 2020.
4. World Health Organization. HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework, second edition[M]. Geneva: WHO, 2020.
5. YOSHIDA S, HATTORI J, MATSUDA M, et al. Japanese external quality assessment program to standardize HIV-1 drug-resistance testing (JEQS2010 program) using in vitro transcribed RNA as reference material [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015, 31(3): 318-325.

第三篇 艾滋病检测的室间质量评价

第一章 总论

艾滋病检测实验室质量控制中的一个重要的环节是室间质量评价。艾滋病检测实验室可以通过室间质量评价监测自身检测方法标准化的水平，确定实验室是否能够准确地开展特定的检测方法，识别实验室检测中存在的问题并启动改进措施，确保结果的准确性，提高质量管理水平，实现检测质量的持续提升。

第一节 室间质量评价要素

室间质量评价（external quality assessment, EQA）和能力验证（proficiency testing, PT）都是利用实验室间比对的方法，按照预先制定的准则，组织两个或多个参评实验室对相同的样本进行检测，通过分析检测结果评价参加者能力的过程。两者的区别在于，能力验证由权威部门组织实施，一般应具有 CNAS 认可的能力验证提供者资质，具有公信力和权威性。

室间质量评价不是用于实验室日常检测的质量控制措施，而是通过评估实验室整体性能，帮助实验室发现存在的问题，进而提高实验室的检测质量和管理水平，确保实验室检测结果的准确性。室间质量评价的要素主要包括，提供者、参加者、质控品、组织流程、结果分析、结果利用等几个方面。

1. 提供者：应是艾滋病检测领域的权威机构，是具有法律地位、能够承担法律责任的实体单位。提供者在开展室间质量评价前，应成立顾问委员会（包含统计学专家）以负责室间质量评价活动的设计、计划、实施等工作。提供者应具有成熟的检测质量管理体系，具备设施、设备、人员等实验条件，能够提供质控品且具有相应检测能力，且组织的室间质量评价活动应满足标准或准则的要求。

2. 参加者：参加者应选择适合其检测范围的室间质量评价活动，应理解室间质量评价的要求和意义，能够在规定时间内提交申请、完成检测并反馈信息。

3. 质控品：室间质量评价质控品应具有均一性、稳定性、无基质效应等特征，质控品的指定值应能够在整体数据分析时反映参加者的检测质量。质控品的获得、制备、存储、销毁等应符合相关法规要求。。

4. 组织流程: 室间质量评价活动的组织流程包括制定室间质量评价计划、计划书发布、参加者申请、实施评价、检测结果回报、检测数据分析、能力评价、形成报告等。

5. 结果分析: 提供者应基于质控品的指定值,并结合不同实验室的检测结果,进行统计分析和质量评价。提供者应与参加者就质量评价结果进行沟通交流,重点讨论参加者检测结果与指定值不符的情况及其可能的原因。

6. 结果利用: 提供者和参加者均可利用室间质量评价的结果。提供者可利用室间质量评价结果持续评估参加者的能力,对参加者的纠正措施提供帮助,并根据相关规定做出维持承认、暂停承认或撤销承认的决定。参加者可利用室间质量评价结果证明其检测能力,当出现检测结果偏离参考值情况时,可根据室间质量评价报告分析影响检测结果的因素,确定导致室间质量评价失败的原因,采取纠正或预防措施,保证实验室检测结果的准确性。

第二节 室间质量评价质控品的选择

室间质量评价质控品的设计和选择应建立在对检测方法(包括检测试剂和检测设备)充分评估的基础上。室间质量评价质控品的设计还应考虑样本的复杂性、稳定性、检测时间、运输条件以及实验室人员的技术水平。

1. 室间质量评价质控品的基本要求

1.1 质控品尽可能与日常检测样本相似。

1.2 质控品的均一性,稳定性应可以满足运输及质量评价项目的要求。

1.3 除预定检测项目,已知潜在可能会干扰的病原体应均为阴性。

1.4 质控品分装量应满足常规检测量,且包装容器规格便于实验室按常规样本对待进行加样和上机。

1.5 质控品的瓶间差异和批间差异应满足室间质量评价要求。

1.6 采用灭菌或无菌器皿制备质控品,最大限度地降低污染风险;可加入抗生素或防腐剂,消除可能存在的污染风险,添加的防腐剂、抑菌剂或稳定剂等应不影响检测。

2. 常用室间质评质控品的种类和特点

用于质控品制备的血液或血液成分的收集必须遵守国家相关规定。阳性质控品原材料的来源可以是天然的,也可以是模拟的。主要分为以下几类:

2.1 来源于人类的天然原材料,其优点是更接近于日常检测样本,但是天然原材料

有感染性风险并且不易获得。

2.2 人工模拟材料安全性好，易于制备，但是与人源性材料的互通性和基质效应需要进行验证。

2.3 体外细胞培养是一类制备病原体材料的有效方法，但培养物通常需要进行大比例稀释和基质的调整才能用于室间质评，同时培养物具有生物活性，需进行适当的灭活处理。

第三节 室间质量评价质控品的制备和评价

室间质量评价质控品的制备对原材料性能和制备技术均有要求，对制备完成的质控品应评价其均一性和稳定性，并确定指定值。

1. 质控品原材料性能的要求

1.1 血清学检测质控品的原材料性能：血清学检测质控品的原材料必须是同质和稳定的。质控品原材料的检测和验证应有明确的操作流程和结果判定程序。应选择高灵敏的检测方法进行首轮检测，以确定真阴性结果。对于首轮检测为阳性的，应进行补充实验，以明确其阳性结果，避免假阳性样本被纳入原材料。

1.2 核酸检测质控品的原材料性能：血浆、干血斑样本是用于核酸检测室间评价的常用样本类型。应测定原材料的浓度和基因型，以便设计质控品时包括不同浓度的样本以及覆盖当地流行的基因型。

1.3 CD4+ T 淋巴细胞检测质控品的原材料性能：应测定全血中 CD4+ T 淋巴细胞的百分比和绝对数。质控品的 CD4+ T 淋巴细胞计数应处于临床检测值范围。

2. 制备技术的要求

2.1 设施环境 室间质量评价的质控品准备区域应远离常规样本的处理和检测区域，

2.2 灭活 用作室间质量评价的天然原材料可以灭活，以降低人员受到污染/感染的风险。使用 56° C 水浴（或培养箱）30 分钟的热灭活过程足以灭活 HIV 病毒以及除乙型肝炎或丙型肝炎病毒之外的许多血源性病原体。

2.3 过滤：质控品原材料可以使用真空或压力过滤设备进行过滤，逐步缩小孔径（预过滤器可为 0.8 μ m 和 0.45 μ m，最终为 0.22 μ m）。过滤可以去除原材料中的微粒物质，比如微凝块和污染的细菌。过滤应在生物安全柜中进行，人员应有相应防护装备（包括防护服）。如果不进行过滤除菌，应严格在制备过程中保持无菌，包括使用无菌设备和

容器。

2.4 分装：用于分装质控品的容器材料应确认不影响质控品的性能和稳定性，包括无蛋白和/或核酸的吸附、在保存和检测期间无影响检测的成分释放等。容器的盖子应有良好的密闭性，确认在冻存和运输过程中无渗漏。分装用管/瓶的容积不小于分装样本体积的 1.5 倍，分装样本体积应满足质评项目的检测要求，以便于按照常规样本对待进行检测。

2.5 包装：质控品在运输过程中可能遇到极端温度（包括高温和低温）、长时间运输或过度粗暴处理而损坏。质控品的包装应考虑运输条件，包括运输距离、时间和运输方式。

2.6 标签和说明：质控品的标签宜明确标识室间质评项目的名称、保存温度、室间质评提供方名称、室间质量评价批次、样本编号、有效日期等信息。室间质评的质控品应有使用说明书，内容包括质控品接收后的处理、保存、使用注意事项以及质控品中的添加剂等，如果是冻干品还应包括复溶操作步骤。

如果使用购买的质控品，应与质控品制造商签订协议，制造商应提供原材料来源、添加剂、稳定剂等详细信息，以及是否具有感染性的说明等生物安全相关信息。

3. 质控品均一性评价

3.1 基本要求：质控品制备完成后，应检测质控品的均一性，即检测每个分装样本检测值的一致性。

3.2 抽样方式：对于少于 100 个分装样本的批次，应选择至少 10% 的样本进行测试。对于样本量大的批次，可以适当减少抽检比例。如果制备的分装样本少于 30 个，应至少选择 3 个样本进行测试。

3.3 均一性指标：每个分装样本检测值的标准差应不大于检测方法标准差的 10%。如果难以做到，可以将室间质量评价结果标准差的 30% 做为合格标准。

4. 质控品稳定性评价

4.1 基本要求：质控品的稳定性，应考虑运输和储存条件下的变化是否影响实验室检测结果。由于运输持续时间和运输条件的潜在可变性，运输可能对样本产生影响。进行稳定性验证时应考虑可能的温度变化，储存后反复冻融的影响等。此外冻干质控品应评估复溶后的稳定性。

4.2 评价方法 可以采用均一性试验的结果做为参照，对不同时间和不同温度条件下

放置的质控品进行检测,可接受的检测值变化一般为 10%。一些保存期比较短的质控品,应在质控品制备时以及质控品发出时进行稳定性验证,以保证质控品在有效期内完成相应的检测。

5. 确定指定值

指定值是对室间质量评价质控品的特定性质赋予的值。在某些定性或半定量计划中,质评物的特性不以量值表示。在进行室间质量评价数据分析和确认指定值时,应结合整体数据分析影响检测结果的因素。对于定性检测项目,指定值应以至少 80%的参评实验室可以得到正确结果。

质控品设计时应考虑室间质量评价结果的预期可比性。对于定性检测,最重要的是检测结果是否与参考结果一致。对于大多数分析物来说,参考结果通常更可靠。多数室间质量评价采用比较相同检测方法参与者之间结果的方法,但是部分疑难样本可能出现检测方法整体偏差,因此在质控品设计和确定指定值时应充分评估检测方法间可能存在的差异。

第四节 室间质量评价的组织

在组织室间质量评价活动中,对提供者和参加者有不同的工作要求。

1. 对提供者的要求

室间质量评价提供者的工作主要包括室间质量评价计划的设计、质控品的制备或采购、检测结果的统计分析、出具质评报告等。室间质量评价提供者或其所在组织,应是一个具有法律地位并能承担法律责任的实体,有责任确保所提供室间质量评价活动符合国家相关要求;应建立、实施和保持与其活动范围相适应的管理体系;应规定组织中关键岗位所需资格和经验的最低要求,并确保人员满足要求;应确保具有与室间质量评价计划运作相适应的设施和设备。

室间质量评价提供者应使用长期雇用人员或签约人员,确保工作人员获得必要的培训。在使用签约人员及其他的技术人员及关键支持人员时,提供者应确保这些人员是胜任的且受到监督,并能够按照管理体系要求工作。室间质量评价提供者应授权专门人员从事以下工作:

- (1) 策划和设计室间质量评价计划;
- (2) 选择适当的室间质量评价质控品;

- (3) 制备、处理并分发室间质量评价质控品；
- (4) 操作特定的仪器设备；
- (5) 确定室间质量评价质控品的稳定性和均匀性、指定值及其不确定度；
- (6) 进行数据的统计分析；
- (7) 评价参评实验室的能力；
- (8) 提供意见和解释；
- (9) 批准发布室间质量评价报告。

2. 对参加者的要求

参加者是接收室间质量评价质控品并提交检测结果以供室间质量评价提供者评价的实验室。参加者选择室间质量评价计划时，应考虑以下因素：

- a) 涉及的检测应与参加者所开展的检测类型相匹配；
- b) 对计划设计的细节、确定指定值的程序、给参加者的指导书、数据统计处理以及最终总结报告的可获得性；
- c) 室间质量评价计划运作的轮次；
- d) 室间质量评价计划组织保障方面（如时间、地点、样本稳定性考虑、样本发送安排）的适宜性；
- e) 接受标准（即用于判定室间质量评价中的满意表现）的适宜性；
- f) 成本；
- g) 为参加者保密的政策；
- h) 报告结果和分析数据的时间表；
- i) 室间质量评价质控品的特性，如均匀性、稳定性。

参加者应仔细阅读并理解室间质量评价计划书的有关要求，并必须在规定时间内向室间质量评价提供者申请参加某项室间质量评价计划。接收质控品后按照存储要求保存。质控品与日常检测样本的处理方式以及所使用的主要检测系统和常规检验方法应相同，并由进行常规检验的人员检测。质控品处理、准备、检测、结果审核等每一步骤应形成文件化的记录，包括所有不满意结果的调查结论及随后的纠正或预防措施，所有记录必须保存至少 2 年。

在规定回报质控品检测结果的截止日期之前，参加者之间不能进行检测结果的交流。出现以下情况时，参加者该轮次的室间质量评价成绩为不合格：参加者将质控品送至其他实验室进行检测；参加者在规定的质控品检测结果回报截止日期前，未能将质控品检测结果回报给提供者。

第五节 结果统计分析和评价

在室间质量评价活动中，一般根据检测结果的特性（定量或定性）、统计假定、误差的性质以及预期的结果数量，制定符合室间质量评价目标的统计分析方法和成绩评价方式。

1. 室间质评结果的常用统计方法

室间质评的统计方法应该适合室间质评计划的目的，并且符合统计学原理。统计方法所依据的任何统计假定均应在统计设计或室间质评说明书中予以说明，并证明这些统计假定具有合理性。

1.1 对于定性结果

在每轮次室间质量评价活动中，某一检验项目的得分计算公式如下：

$$\text{某一检验项目得分} = \frac{\text{该项目可接受结果个数}}{\text{该项目总的测定质评物个数}} \times 100\%$$

1.2 对于定量结果

可使用标准差指数（standard deviation index, SDI）作为统计量，通过比较实验室与同行分组的检测结果，评价实验室检测水平。SDI的计算公式如下：

$$\text{SDI} = \frac{\text{实验室的均值或均分} - \text{同行分组的均值或均分}}{\text{同行分组的标准差}}$$

2. 评价方式

SDI 值通常反映了实验室检测结果的系统误差，SDI 值的大小代表实验室检测值的偏离程度，符号“+”和“-”代表偏离方向。一个结果的 SDI 绝对值越接近于 0，则表明该结果与其它实验室检测结果的符合性越好。

当一个结果的 SDI 绝对值小于 2 时（ $|\text{SDI}| < 2$ ），表明结果满意；当一个结果的 SDI 绝对值大于 2 而小于 3 时（ $2 < |\text{SDI}| < 3$ ），表明结果可疑，应引起实验室注意，并鼓励实验室对检测流程进行复查；当一个结果的 SDI 值的绝对值大于或等于 3 时（ $|\text{SDI}| \geq 3$ ），

为离群结果，实验室应开展纠正措施。

3. 室间质量评价报告

室间质量评价提供者应给所有参评实验室提供评价报告，将参评实验室的检测能力与同行实验室进行分析比较。能力验证报告应清晰、全面，包含所有参加者结果的资料，并指出每个参加者的能力。室间质量评价报告主要有两种类型，首先是一份初步报告，在室间质量评价截止日期后立即发送，以便实验室尽早调查可能出现的错误，这份报告可以仅包括预期值。之后，应提供给参评实验室一份更全面的个性化分析报告，报告内容可以根据质量评价项目类型而有所不同，但应该包括：室间质量评价提供方授权人和参与者的详细联系方式；每个检测批的报告和年终报告；明确报告是保密的；根据每个实验室的检测结果给出结论和建议。

室间质量评价提供者应定期提供各个项目的累计检测能力评价，累计评价可以是连续1年至5年的，在必要时应将累计检测能力和单次检测能力共同评价分析。

第六节 室间质量评价结果的应用

参评实验室应重视室间质量评价结果的应用，对不合格原因进行及时分析并相应采取纠正措施，持续改进工作。

1. 参评实验室对报告的回应

参加室间质量评价是一个发现问题的机会，通过分析原因，制定并实施纠正预防措施，使实验室质量管理得到持续改进。

1.1 参评实验室应通过质量方针、各项质量目标、审核结果、数据分析、纠正措施、预防措施和管理评审来持续改进实验室管理体系的有效性。

1.2 实验室负责人应与实验室或样本检测相关的每个人员分享该报告。

1.3 实验室出现不相符的结果时，应系统地评估检测过程的每一个环节。应由文件化的程序来分析、发现、识别和纠正存在的问题。

1.4 实验室应审核来源于不合格室间质量评价结果时间内的样本检测数据，目的是确定是否已影响到日常样本的检测结果。如有影响，应立即采取措施，消除或降低影响，并有文件化记录和相应的追踪措施。

实验室应尽可能找出不合格结果的原因，制定改进实验室质量体系的措施，使问题复发的危险性降到最低。

2. 不合格原因分析

应对检测前、中、后的流程进行全面分析

2.1 检测前

2.1.1 室间质量评价质控品储存不当

2.1.2 室间质量评价质控品复融混匀不充分

2.1.3 加样设备未校准

2.1.4 设备未进行合理维护

2.1.5 设备功能问题

2.1.6 设备参数设置问题或设备故障后修复未确认

2.1.7 仪器数据处理功能的问题

2.1.8 试剂检测灵敏度问题、试剂特异性问题

2.1.9 检测试剂未进行充分的质量验证

2.2 检测中

2.2.1 样本错误，如未核实样本检测项目和编码信息

2.2.2 计算机键入或数据输入样本信息错误

2.2.3 工作台上的样本混淆

2.2.4 检测系统/仪器问题

2.2.5 检测系统报错未及时识别和处理

2.2.6 加样量不足

2.2.7 检测过程无有效监控（如加样量不足的监测、温育温度的监测）

2.2.8 仪器管道/孔口被凝块阻塞

2.2.9 设备加样或加试剂有漏液

2.2.10 不合理或未正确使用检测试剂

2.2.11 结果传输或导出错误

2.2.12 室内质控超出可接受范围，未进行恰当的梳理

2.3 检测后

2.3.1 填写室间质量评价结果报告错误或不完整

2.3.2 结果上报时未进行核对

2.3.3 质量控制措施和执行存在问题

2.3.4 无书面的质量控制程序或质量控制程序未能达到现行的质量标准

2.4 管理因素

2.4.1 人员配备不足

2.4.2 操作前培训不足

2.4.3 设备不足和/或使用不恰当的设备

2.4.4 不恰当的工作环境设置

2.4.5 所有在岗人员沟通不足，工作流程设计不合理，员工相互配合度不够

3. 对不合格实验室的处理措施

所有实验室都可能会出现不合格的室间质量评价结果，揭示了实验室可能在样本处理或分析过程中存在不恰当情况。因此，应彻底调查每个不合格结果，提高纠正潜在问题的机会；大部分监管机构都要求调查每一个不合格结果。后续措施包括确定其他结果是否受到影响、错误问题根源调查、排除问题根源的纠正措施（适用于该问题原因）、对纠正措施监控和要求时向监管机构报告。

在任何情况下，实验室均应该使用从不合格结果调查中获得的信息，将其作为避免室间质量评价问题而进行连续性改进工作的一部分。

4. 室间质量评价的局限性

室间质量评价存在一些局限性：a. 由于实验室没有将样本按常规标本去做（或弄虚作假），评价的可能不是实验室常规水平，而是最好水平（或虚假水平）；b. 质控品有时出现问题，影响对实验室的评价。如质控品中添加了影响试验的成分，质控品的基质效应，质控品指定值的确定出现偏差；c. 由于统计录入的低效，实验室通常需几个星期后，才能知道自己的质评成绩；d. 不能发现实验室检验工作前及检验工作后存在的一些问题。

室间质量评价不能替代包括病人准备、标本收集、运输、储存、处理、校准、室内质控等综合质量管理和保证体系。室间质量评价也不能代替室内质控，室间质量评价结果不好的主要原因是由于室内质控薄弱所致。室内质控对每个检测实验室都非常重要，每个实验人员都需具备检测的质量意识，通过开展室内质控，参加室间质量评价提高检测能力水平。

参考文献

1. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 临床实验室室间质量评价要求: GB/T 20470-2006[S]. 2006.
2. 国家市场监督管理总局. 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法: GB/T 28043-2019[S]. 2019.
3. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 室间质量评价不合格原因分析: WS/T 414-2024[S]. 2024.
4. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验室间质量评价: WS/T 644- 2018[S]. 2018.
5. 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证结果的统计处理和评价指南: CNAS-GL002[S]. 2018.
6. 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样本均匀性和稳定性评价指南: CNAS-GL003[S]. 2018.
7. 中国合格评定国家认可委员会. 实验室内部研制质量控制样本的指南: CNAS-GL005[S]. 2019.

第二章 抗体和抗原检测的室间质量评价

抗体和抗原检测是常用的艾滋病检测方法。本章介绍了化学发光免疫检测和酶联免疫检测、快速检测、抗体确证检测及 HIV-1 新近感染检测的室间质量评价，主要包括室间质评质控品的选择、室间质评结果的统计分析和评价、不合格原因分析和处理等。

第一节 筛查检测

常用的艾滋病筛查检测方法包括化学发光免疫检测、酶联免疫检测、和快速检测，对艾滋病筛查检测实验室开展室间质量评价，可以评价实验室整体性能，包括环境、设备、试剂、人员操作、样本管理等，帮助实验室发现存在的问题，有针对性地进行改进，提高艾滋病筛查检测的质量。

1. 室间质评质控品的选择

1.1 样本类型

根据检测项目选取适用的样本类型，血液检测项目的质控品应使用血清或血浆样本，尿液、口腔黏膜渗出液检测项目的质控品应使用模拟检测样本。可自制质控品或购买商用质控品。质控品应保存于-20℃以下，使用前应在室温（18~25℃）平衡 30 分钟，检测前需充分混匀。

1.2 浓度要求

每次室间质评的质控品应包括阴性和阳性质控品，其中阳性质控品应包括弱阳性和强阳性质控品。

2. 室间质评结果的统计分析和评价

2.1 统计方法

根据参与室间质评 80%以上实验室的检测结果或者室间质评提供者的检测结果确定指定值，即确定哪些质控品的预期结果为阴性，哪些质控品的预期结果为阳性。将参加者反馈的结果与预期结果进行比较。如果结果相符合，则结果为满意；如果不相同，则结果为不满意。

2.2 评分规则和成绩要求

如果每次室间质评检测 5 份质控品，其中有至少 3 份不同浓度的阳性质控品。每份质控品可赋值 20 分，结果满意得 20 分，结果不满意得 0 分，预期阳性质控品的检测

结果为阴性扣 10 分。室间质评得分为 5 份质控品得分的累加值。

参评实验室的成绩在 80 分及以上为合格，低于 80 分为不合格。

3. 不合格原因分析和处理

出现不合格结果时，应首先核对检测原始记录，查看检测试剂盒的内部质控及外部质控是否在控。如果不在控，按照本指南第二篇第二章第一节内容进行原因分析及整改；如果在控，核对样本保存条件、检测编号、结果录入、结果回报是否正确。常见的不合格原因包括：质控品储存或前处理不当、检测试剂盒或内部质控有问题、环境条件不适宜或数据处理出现问题、检测人员没有遵循检测程序等。

如分析发现问题，应制定相应的纠正措施，并及时整改。如未发现问题，重新对质控品进行检测，如果检测结果与之前的结果一致，确定本次不合格结果与本实验室检测质量无关，可与室间质评提供者联系进行复议。

第二节 抗体确证检测

艾滋病抗体确证检测使用免疫印迹试验或重组/线性免疫印迹试验，检测流程较复杂，通过室间质量评价，建立实验室间抗体确证检测结果的可比性，可有效判定实验室间工作质量的差别，帮助实验室发现存在的问题并加以改进。

1. 室间质评质控品的选择

1.1 样本类型

质控品优选血清样本（但受条件限制亦可选用血浆样本），可购买商用质控品或自制。质控品应保存于 -20°C 以下（建议 -70°C 以下），不可反复冻融。

1.2 浓度要求

至少 5 个质控品，并涵盖阳性、不确定和阴性质控品，其中阳性 2~3 个，不确定 1~2 个；阳性质控品在膜条上出现目标条带的数量应尽量不一致。

2. 室间质评结果的统计分析和评价

艾滋病抗体确证检测的检测结果为定性结果，对检测结果的评价应包括质控品检测结果（阳性、不确定和阴性）的判断和关键条带的判读。指定值可使用 80%以上参加者的结果来确定。

将参加者结果与指定值进行比较，并计算参加者成绩。以 5 个质控品为例，每个质控品 20 分，检测结果和关键条带判读各计 10 分，如预期阳性结果检测为阴性倒扣 10

分。关键条带包括：gp160、gp120、p66、p55、p51、gp41、p31、p24、p17，错判一个条带扣3分，扣完为止。但因不同试剂盒用于包被膜条的HIV裂解蛋白或重组蛋白存在差异，应根据试剂盒实际可检测的条带数计分。室间质评分数为所有质控品的累加总分。

参评实验室的成绩在80分及以上为合格，低于80分为不合格。

3. 不合格原因分析和处理

3.1 参加者

参加者可从以下几方面进行不合格原因分析：

(1) 质控品处理不当：对质控品的接收、保存、冻融次数等情况进行检查，以确定是否存在因上述过程的不当处理造成质控品变质或抗体降解的可能。

(2) 试剂质量或保存有问题：对室间质控所用批次的检测试剂的采购、入库及保存情况进行检查，并收集其他实验室同批次试剂的使用情况，以确定是否存在试剂质量或保存因素造成不合格结果的可能。

(3) 检测仪器有问题：对检测设备的使用和维护情况进行检查。用于HIV抗体确证检测的设备主要是蛋白印迹仪，易于出现的故障是管路堵塞或污染、加液量不准、吸液不尽、温控失效等，实验室应建立设备标准操作规程，确保其规范使用、有效维护和定期核查。

(4) 室内质控失控：实验室日常应使用人员比对、设备比对和试剂比对等方法作为内部质量控制手段。新批次试剂投入使用前应进行技术验收，比如使用余样进行检测，以确保与在用批次试剂检测结果的一致性。免疫印迹及重组/线性免疫印迹检测一般仅使用试剂盒内质控作为室内质控品，应确保每次室内质控品均在控。

(5) 检测结果记录或抄写错误：应检查原始记录，确保其内容完整、规范编写。实验室应有相关程序文件或标准操作规程对实验原始记录进行管理，并落实实验复核人员的责任，杜绝记录或抄写错误的情况。

3.2 提供者

对检测结果不合格的实验室，提供者应协助分析原因，必要时提供现场技术指导，了解存在问题，及时改进。此外，当多个实验室出现与指定值不一致的条带判读情况时，提供者应对质控品的均匀性和稳定性检测结果进行复核，并对质控品的保存、包装、运输或发放等过程进行核查。如经核实质控品存在质量问题或指定值存在问题，应使用公认值进行结果评价，或在计算成绩时剔除该样本。

第三节 新近感染检测

与常规的 HIV 抗体检测方法相比，基于抗体亲和力的 HIV-1 新近感染检测对实验室环境、设备、样本保存、人员操作技术的要求更高，对检测结果的评价更为复杂。对开展 HIV-1 新近感染检测的实验室组织室间质量评价，有助于实验室发现存在的问题，改进实验室检测方法和工作流程，保证检测结果的准确性。

1. 室间质评质控品的选择

1.1 样本类型

质控品优选血清样本（但受条件限制亦可选用血浆样本），可购买商用质控品或自制质控品。质控品应保存于 -20°C 以下。质控品使用前应在室温（ $18\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）平衡 30 分钟，检测前需充分混匀。

1.2 浓度要求

每次室间质评样本应至少包括 5 份质控品，包括新近感染质控品和既往感染质控品，其中新近感染质控品不少于 3 份，ODn 值应尽量分布在 0~0.4、0.5~0.9、1.0~1.5 范围内。

2. 室间质评结果的统计分析和评价

2.1 统计方法

根据参与室间质评 80%以上实验室的检测结果或者室间质评提供者的检测结果确定指定值，即确定哪些质控品的预期结果为既往感染，哪些质控品的预期结果为近期感染。将参加者反馈的结果与预期结果进行比较。如果结果相符合，则结果为满意；如果不相同，则结果为不满意。

2.2 评分规则和成绩要求

如果每次室间质评检测 5 份质控品，每份质控品赋值 20 分，结果满意得 20 分，结果不满意得 0 分。室间质评得分为 5 份质控品得分的累加值。

参评实验室的成绩在 80 分及以上为合格，低于 80 分为不合格。

3. 不合格原因分析和处理

因 HIV-1 新近感染检测需要阴性对照、弱阳性对照、强阳性对照及校准品 OD 值及 ODn 值均在控才出具结果，故可排除设备及试剂原因。出现不合格结果时，应核对样本保存条件、检测编号、加样位置、结果录入、结果回报是否正确。

如分析发现问题，应制定相应的纠正措施，并及时整改。如未发现问题，重新对质控品进行检测，如果检测结果与之前的结果一致，确定本次不合格结果与本实验室检测

质量无关，可与室间质评提供者联系进行复议。

参考文献

1. 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 检测和校准实验室能力的通用要求: GB/T 27025-2019[S]. 2019.
2. 中国疾病预防控制中心. 艾滋病病毒抗体快速检测技术手册[Z]. 2011.
3. 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证结果的统计处理和评价指南: CNAS-GL002[S]. 2018.
4. 中国合格评定国家认可委员会. 医学领域定性检测能力验证实施指南: CNAS-GL021[S]. 2020.
5. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明: CNAS-CL02-A004[S]. 2018.
6. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则: CNAS-CL02[S]. 2023.
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]. 中华传染病杂志, 2024, 42:(05): 257-284.

第三章 CD4+ T 淋巴细胞计数检测的室间质量评价

CD4+ T 淋巴细胞检测实验室定期参加室间质量评价有助于提高实验室的检测质量,发现实验室自身不易发现的问题。通过持续开展室间质量评价,有助于增加实验室间检测结果的可比性。

1. 室间质评质控品的选择

1.1. 质控品类型

质控品通常购买商品化全血质控品或使用冻干淋巴细胞。

1.2. 浓度要求

每次不少于 2 支质控品,至少包括 1 支中浓度,1 支低浓度。

2. 室间质评结果的统计分析和评价

2.1 统计方法

2.1.1 提供者按不同设备机型对参评实验室进行分组,并分组计算 SDI 值。 $SDI = (\text{某实验室试验结果} - \text{同机型实验室试验结果的平均值}) / \text{同机型实验室试验结果的标准差}$ 。

建议判定标准如下:

当 SDI 值在 ± 1.5 以内时系统运行正常,判为通过;

当 SDI 值等于或超出 ± 1.5 时系统处于告警状态,应予注意;

当 SDI 值等于或超出 ± 2.0 时整个系统处于失控状态,提示存在较大的问题,结果无效。

2.1.2. 若某种机型的数量小于 2 台,建议将检测结果与质控品指定值进行比较。

2.2 评价方式和成绩判定

建议每年至少组织一次,有需求和有条件的可每季度组织一次。建议考评成绩分为优秀、良好、合格及不合格四个等级。两份质控品的 SDI 值均在 ± 1.5 以内,评为优秀;两份质控品的 SDI 值均在 ± 2.0 以内,评为良好;一份质控品的 SDI 值在 ± 2.0 以内,另一份的质控品 SDI 值等于或超出 ± 2.0 ,评为合格;两份质控品 SDI 值均等于或超出 ± 2.0 ,评为不合格。

3. 不合格原因分析和处理

3.1 样本未混匀

处理方法：充分颠倒混匀，枪头靠液体中心取样。

3.2 仪器堵塞或进气泡

处理方法：按照仪器操作说明冲洗管路或执行 2 遍排气泡流程，做机器质控测试确认是否通过，如不通过重复上述步骤，直至机器质控测试通过并样本结果正常。

3.3 吸液量不准确

处理方法：双平台法检测的实验室，在检测前实验人员必须经技术培训，并接受周期性测评；定期校准移液器；可采用反式加样法保证加样体积的准确性。

3.4 质控血保存不当

处理方法：大部分质控血的储存要求是 4℃，应严格按质控血要求温度运输及储存，加入荧光微球后 2 小时内上机检测。加冰袋运输时注意运输途中质控品第一层包装勿直接接触冰袋。

3.5 圈门错误

处理方法：自动分析模板通常不适用于考核样本，需手动圈门分析。

参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南: WS/T360-2024[S]. 2024.
2. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验室间质量评价: WS/T 644- 2018[S]. 2018.
3. 中国疾病预防控制中心. 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[Z]. 2013.
4. 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证结果的统计处理和能力评价指南: CNAS-GL002[S]. 2018.

第四章 核酸检测的室间质量评价

我国获批有多种 HIV 核酸检测试剂，包括核酸 RNA 检测试剂和核酸 DNA 检测试剂。其中，HIV-1 核酸定量检测试剂种类较多，不同核酸定量检测试剂的检测结果会有差异，不同实验室所获得的检测结果也会有差异。持续开展室间质量评价，保持实验室核酸检测质量的稳定，有助于增加不同实验室进行核酸定量检测结果的可比性。另外，核酸检测作为 HIV 感染的补充实验，检测可及性和应用将不断增加，对实验室检测质量也提出了更高的要求，除了参加中国疾控中心组织的室间质量评价，有条件的省市可以组织辖区内实验室的核酸检测室间质量评价，以增加室间质量评价频次，及时发现检测中存在的问题，确保核酸检测结果的准确性。

1. 室间质评质控品的选择

核酸检测的室间质评质控品可购买商业质控品，或者使用毒株培养上清、临床样本、假病毒进行制备，当使用毒株培养上清制备质控品时，推荐使用国家标准株。根据室间质评的考核目的，核酸检测室间质评质控品的浓度可选择阴性质控品、以及不同浓度的阳性质控品，比如低浓度、中浓度、高浓度。此外，也可根据质控品的亚型、介质等进行选择。

HIV-1 RNA 质控品，一般可选择低浓度（ 10^{2-3} 拷贝/mL）、中浓度（ 10^{4-5} 拷贝/mL）、高浓度（ 10^{6-7} 拷贝/mL）。HIV-1 DNA 质控品，一般可选择低浓度（1000~5000 拷贝/ 10^6 细胞）、中浓度（5000~50000 拷贝/ 10^6 细胞）、高浓度（>50000 拷贝/ 10^6 细胞）。

2. 室间质评结果的统计分析和评价

2.1 室间质量评价结果的报告：参评实验室必须在规定的时间内报告实验结果，并将仪器原始检测记录一起上报给组织方。

2.2 统计分析

将参评实验室回报的检测结果（拷贝/mL）先进行对数换算；然后将使用同一种检测试剂对同样质控品进行检测的实验室分为一组；对每一组实验室，计算组内所有实验室检测结果的平均值（M）和标准偏差（S）；将每个实验室的检测结果与本组实验室的统计结果进行比较。

2.3. 评分

根据参评实验室对一年两次的室间质评中所有考核品的检测结果进行综合评分，评

分标准和结果如下：

优秀：所有考核品的检测结果在 $M-2S \sim M+2S$ ；

良好：有一个考核品出现情形①；

合格：两个考核品出现情形①；

不合格：至少有三个考核品出现情形①或至少一个考核品出现情形②。

情形①包括以下情形：检测结果在 $M+2S \sim M+3S$ ；检测结果在 $M-2S \sim M-3S$ ；考核结果报告没及时上报；没按要求上报原始检测记录。

情形②包括：检测结果 $>M+3S$ ；检测结果 $<M-3S$ ；出现假阳性；出现假阴性；出现无效结果。

3. 不合格原因分析和处理

根据考核结果，组织者可对不合格实验室进行现场检查和督导，以发现不合格原因。常见的不合格原因主要包括：

3.1 实验原始数据记录错误

3.2 实验室布局存在问题，有污染的可能

3.3 核酸检测设备运行状况不佳，疏于维护

3.4 辅助设备没有按照要求定期校准和维护

3.5 实验耗材质量存在问题

3.6 样本保存条件不当

3.7 试剂盒保存条件不当或过期，或没有按照说明书操作

3.8 人员培训不足

参考文献

1. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 临床实验室室间质量评价要求: GB/T 20470-2006[S]. 2006.
2. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验室间质量评价: WS/T 644- 2018[S]. 2018.
3. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南[Z]. 2013.
4. 中国合格评定国家认可委员会. 实验室内部研制质量控制样本的指南: CNAS-GL005[S]. 2019.

第五章 基因型耐药检测的室间质量评价

HIV-1 基因型耐药检测的流程复杂，需要大量手工操作，且易出现核酸污染，需要严格进行实验室质量控制。实验室通过参加外部质量评价，有助于及时发现问题，改进实验室管理，获得准确的耐药检测结果。

1. 室间质评质控品的选择

HIV-1 基因型耐药检测的室间质评质控品可选择携带有耐药位点的 HIV 感染者血浆，HIV 耐药毒株培养上清液，或者 HIV 阴性血浆稀释的带有耐药位点的假病毒或质粒。质控品中也可包括不携带有耐药位点的 HIV 感染者血浆，HIV 非耐药毒株培养上清液，或者 HIV 阴性血浆稀释的不带有耐药位点的假病毒或质粒。

根据考核目的，可选择不同病毒载量浓度的质控品，一般低浓度（1000~5000 拷贝/mL）、中浓度（5000~50000 拷贝/mL）、高浓度（>50000 拷贝/mL）。也可考虑 HIV-1 基因亚型、耐药基因突变位点等，耐药位点一般包括蛋白酶和/或逆转录酶基因编码区的耐药突变位点，也可扩展到整合酶基因编码区的耐药突变位点。

2. 室间质评结果的统计分析和评价

HIV-1 基因型耐药检测结果的评分流程如下：

3.1 共享序列分析

将参评实验室提交的所有序列使用 Bioedit 软件进行比对，对每一个位点采用 80% 以上实验室获得一致结果的原则产生共享序列。如果某个位点的实验室检测一致率 <80%，则该位点标记为*，不参加评分。

3.2 耐药位点评分（DRM site score）

综合斯坦福 HIV DB 耐药解释系统的耐药位点，既包括主要耐药位点，也包括次要耐药位点，进行评分。

蛋白酶（PR）区 26 个位点：10, 11, 20, 23, 24, 30, 32, 33, 43, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 58, 73, 74, 76, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 90。

逆转录酶（RT）区 35 个位点：41, 44, 62, 65, 67, 69, 70, 74, 75, 77, 98, 100, 101, 103, 106, 108, 115, 116, 138, 151, 179, 181, 184, 188, 190, 210, 215, 219, 221, 225, 227, 230, 234, 236, 238。

整合酶（IN）区 23 个位点：51, 66, 92, 95, 97, 118, 121, 138, 140, 143, 145,

146, 147, 148, 149, 151, 153, 155, 157, 163, 230, 232, 263。

每个考核样本对 PR-RT 区与整合酶区分别进行评分，耐药位点分值 (%) = (一致位点数/总位点数) × 100, ≥99%为合格。

3.3 碱基比对评分 (Nucleotide alignment score) :

碱基比对区域包括: PR 区 10~93 位, RT 区 41~238 位, IN 区 51~263 位。PR-RT 区共 846 个碱基, IN 区 639 个碱基, 对每个区域分别计算不一致的碱基数量。

不一致碱基包括以下情况: 1、缺失; 2、不完全一致, 共享碱基为混合碱基, 提交序列的碱基为混合碱基中的一个, 或相反; 3、完全不一致, 如共享碱基为 T, 提交序列的碱基为 C。

每个考核样本的碱基位点分值 (%) = (一致位点数/总位点数) × 100, ≥99%为合格。

3.4 总体评价

考核总分值=所有考核样本的分值之和/样本数目, 耐药位点总分值 ≥99%, 且碱基位点总分值 ≥99%, 通过考核。

参考文献

1. 中国疾病预防控制中心. HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南[Z]. 2013.
2. 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2020 年修订版)[Z]. 2020.
3. World Health Organization. WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens[M]. Geneva: WHO, 2020.
4. World Health Organization. HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework, second edition[M]. Geneva: WHO, 2020.