



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1228—2003

国境口岸艾滋病检验规程

Examination codes for HIV/AIDS at frontier port

2003-08-18 发布

2004-02-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 检验对象	1
5 检验程序	1
6 检验报告	2
附录 A(资料性附录) HIV 抗体的检测原理和方法	3
附录 B(规范性附录) HIV 抗体实验流程图	7
附录 C(资料性附录) HIV 抗原的检测原理和方法	8
附录 D(资料性附录) HIV 核酸的检测原理和方法	9
附录 E(资料性附录) HIV-1 的分离培养	11
附录 F(规范性附录) HIV 抗体初筛阳性送检化验单式样	12
附录 G(规范性附录) HIV 抗体检测确认报告式样	13

前 言

本标准的附录 B、附录 F、附录 G 为规范性附录，附录 A、附录 C、附录 D、附录 E 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国广东出入境检验检疫局负责起草，中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局参加起草。

本标准主要起草人：沈镜生、李华、罗小光、姜鹤、朱虹。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

国 境 口 岸 艾 滋 病 检 验 规 程

1 范围

本标准规定了国境口岸艾滋病的检验对象、检验程序及检验报告。

本标准适用于国境口岸艾滋病检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB 16000—1995 HIV/AIDS 诊断标准及处理原则

SN/T 1279 人出境特殊物品处理规程

SN/T 1229 国境口岸艾滋病监测规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

人类免疫缺陷病毒 human immunodeficiency virus(HIV)

引起艾滋病的病原体，目前发现有 HIV-1 和 HIV-2 型。

3.2

艾滋病 acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)

由人类免疫缺陷病毒引起的获得性免疫缺陷综合征。

3.3

特殊物品 special products

可造成艾滋病传播的一类物品。包括：微生物、人体组织、器官、血液及血液制品、生物制品。

4 检验对象

4.1 人出境人员及其他申请接受检验的人员。

4.2 人出境特殊物品。

4.3 疑似 AIDS 病人和 HIV 感染者的尸体、骸骨。

5 检验程序

5.1 标本的采集、运送

遵照 SN/T 1229 和 SN/T 1279 的要求进行。

5.2 样品的处理

5.2.1 样品的核查

5.2.1.1 核实实验单或送检单与样品相符。

5.2.1.2 记录样品容器有无破损、溢漏情况。

5.2.1.3 如有溢漏，应立即将尚存的样品移出，并对样品容器消毒。

5.2.1.4 检查并记录样品的质量,如有无严重溶血、细菌污染、血脂过多以及黄疸等情况。

5.2.2 血液

5.2.2.1 将血液先自然存放 1 h~2 h 后,再 3 000 r/min,离心 15 min。

5.2.2.2 吸取上清液进行检测或吸出上清液于冻存管中,再进行检测。

5.2.2.3 样品如要储存,则应在室温下 4 h 内分离血浆。

5.2.2.4 离心后的样品如在三天内检测,可放 2℃~8℃冰箱中。

5.2.2.5 短期内储存可在-20℃以下保存,长期储存,则应在-70℃以下保存。

5.2.3 特殊物品

应先将各类特殊物品进行适当处理,如用生理盐水、去离子水等进行溶解、稀释,以便能用常规诊断试剂进行检测。

5.2.4 疑似 AIDS 病人和 HIV 感染者的尸体、骸骨

5.2.4.1 尽可能采集尸体或骸骨中尚存血液或其他体液,如尿液等,采集方法见 SN/T 1229。

5.2.4.2 对采集的样品处理方法参见 5.2.2 和 5.2.3。

5.3 实验室检测

5.3.1 HIV 抗体初筛试验

5.3.1.1 样品验收合格后,用符合规定的初筛检测试剂进行检测。

5.3.1.2 初筛检测结果呈阳性反应的标本,应进行复检。

5.3.1.3 复检时应用两种不同原理的初筛检测试剂。

5.3.1.4 复检如均呈阳性反应,或有一种试剂为阳性,该标本需送上级实验室复检或确认。

5.3.1.5 送检时应重新采集该受检者血液标本和原有血液标本一并送检。

5.3.1.6 初筛试验的方法参见附录 A。

5.3.1.7 初筛试验流程图遵照附录 B 的规定。

5.3.2 HIV 抗体确认试验

5.3.2.1 核对送检标本和送检单,确认无误后,方可进行 HIV 抗体确认试验。

5.3.2.2 将复检呈阳性反应的标本用免疫印迹法 HIV1/2 混合型试剂进行确认试验。

5.3.2.3 确认试验流程图遵照附录 B 的规定。

5.3.2.4 确认试验结果的判定遵照 GB 16000—1995 中的规定。

5.3.3 HIV 抗原的检测

参见附录 C。

5.3.4 HIV 核酸的检测

参见附录 D。

5.3.5 HIV 病毒分离

参见附录 E。

6 检验报告

6.1 HIV 抗体初筛检测报告

6.1.1 初筛检测阴性结果应标注实验方法并填记“阴性”。

6.1.2 初筛检测中发现 HIV 抗体阳性反应的,遵照 5.3.1.2 至 5.3.1.7 规定。

6.1.3 不得向受检者宣布初筛检测阳性结果。

6.1.4 送检单遵照附录 F 的规定。

6.2 HIV 抗体确认检测报告

6.2.1 确认试验结果阴性的,由一名高级卫生技术职称人员核签后向送检单位出具确认报告。

6.2.2 确认试验结果阳性的,应遵照附录 G 的规定填写确认报告。

附录 A

(资料性附录)

HIV 抗体的检测原理和方法

A.1 HIV 抗体初筛试验

A.1.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)

A.1.1.1 间接酶联免疫吸附试验

A.1.1.1.1 原理:反应孔包被 HIV 抗原+样品+酶标抗人球蛋白+底物。

A.1.1.1.2 结果说明:样品中有 HIV 抗体者显明确颜色,无色则无 HIV 抗体。

A.1.1.2 竞争酶联免疫吸附试验

A.1.1.2.1 原理:反应孔包被 HIV 抗原+样品+酶标 HIV 抗体+底物。

A.1.1.2.2 结果说明:样品中有 HIV 抗体者无色或淡色,显明确的颜色则无 HIV 抗体。

A.1.1.3 抗原夹心酶联免疫吸附试验

A.1.1.3.1 原理:反应孔包被 HIV 抗原+样品+酶标抗原+底物。

A.1.1.3.2 结果说明:样品中有 HIV 抗体者显明确颜色,无色则无 HIV 抗体。

A.1.1.3.3 方法举例

A.1.1.3.3.1 试剂配制

——洗液:用蒸馏水或去离子水 1:25 稀释浓缩磷酸缓冲液,配制好的洗液在 2℃~8℃可保存两周;

——TMB 底物:根据试验孔的数量将 TMB 底物与脲过氧化物(urea peroxide)溶液等量混合,配制后的底物避光储存,在室温(18℃~25℃)可保存 6 h。TMB 底物和脲过氧化物要避免与金属和金属器皿接触;

——终止液:取 50 mL 浓硫酸(18 mol/L)加 850 mL 蒸馏水配制浓度为 1 mol/L 的硫酸。

A.1.1.3.3.2 洗板程序

——每孔加洗液 300 μL,避免洗液溢出,洗液于孔中停留 30 s~60 s,然后将洗液吸干;

——重复五次;

——最后一次吸出之后,通过在吸水纸上拍打,将残留在孔底及孔壁上的磷酸缓冲液除去。

A.1.1.3.3.3 试验步骤

——取出所需酶标条,揭开封条,孔内的珠子为冻干的抗原酶结合物球,注意使其保留于孔内;

——每孔加 100 μL 标本稀释液,包括对照孔;

——加 50 μL 标本或对照血清到各试验孔。每板设三孔阴性对照,两孔阳性对照;

——振荡(微量振荡器 900 r/min)15 s;

——37℃±2℃孵育 60 min±5 min;

——用磷酸缓冲液洗六次,见洗板程序;

——将试验板倒扣,把水吸干后,每孔加 100 μL TMB 底物,不要混合或振荡,废弃过剩的底物;

——18℃~25℃孵育 30 min±2 min 避光;

——每孔加 100 μL 1 mol/L 硫酸终止反应,充分混匀,在 2 h 内检测;

——在波长 450 nm±5 nm(单波长)或 450 nm±5 nm 和 620 nm~700 nm 参照波长(双波长)测每孔的吸光度值(A)。

A.1.1.3.3.4 结果计算

a) NC 表示阴性对照 A 值;PC1 表示抗-HIV-1 阳性质控对照 A 值;PC2 表示抗-HIV-2 阳性质控

对照 A 值;

- b) NC 应小于 0.250, 去掉大于 0.250 的阴性质控对照; 留下的阴性质控对照计算平均值 NC_x ; 每个 NC 值应在 $0.6 NC_x$ 和 $1.4 NC_x$ 之间, 去掉不符合的 NC 值; 如果去掉任何 NC 值应重新计算 NC_x ;
- c) 满足下列条件实验结果有效:
 - 1) 半数以上的阴性质控对照符合要求;
 - 2) $PC1 - NC_x$ 大于 0.400;
 - 3) $PC2 - NC_x$ 大于 0.400 (如果使用);
 - 4) 临界值 (cut off) 计算: 临界值 = $NC_x + 0.100$ 。

A. 1.1.3.3.5 结果的判定:

- 样品的 A 值 $\geq$ 临界值判为阳性;
- 样品的 A 值 $<$ 临界值判为阴性。

A. 1.2 颗粒凝集法 (Particle agglutination test)

A. 1.2.1 原理

将 HIV 抗原吸附于载体上, 吸附于载体上的抗原, 如与相应抗体发生结合产生凝集称为颗粒凝集。大多数凝集试验可由肉眼观察结果。

A. 1.2.2 试验程序

- 每份样品三孔, 在第一孔加 75 μ L 血清稀释液, 第二孔和第三孔加 25 μ L 血清稀释液;
- 取 25 μ L 样品至第一孔, 混匀, 从中取 25 μ L 样品至第二孔, 混匀, 作倍比稀释;
- 同样, 从第二孔取 25 μ L 样品至第三孔, 混匀, 从第三孔吸出 25 μ L 弃去;
- 向每个第二孔加入一滴 (25 μ L) 溶解的非敏感颗粒液, 向每个第三孔加入一滴 (25 μ L) 溶解的敏感颗粒液;
- 轻轻敲打几下微量板混匀各孔内容物或在振荡器上振荡 1 min, 加盖, 室温放置 2 h。

A. 1.2.3 观察结果

- 颗粒在孔中间凝聚成圆形小块且外缘光滑的孔为阴性反应 (—);
- 颗粒在孔中凝聚成致密环状且外缘光滑的孔为可疑反应 ($\pm$);
- 孔内有清晰的宽环且外缘粗糙者, 为阳性反应 (+);
- 孔内凝聚颗粒形成均一的膜覆盖在整个孔底者为强阳性反应 (++);
- 孔内样品与非敏感和敏感颗粒均产生凝集者, 为非特异反应。

A. 1.3 胶体金法

A. 1.3.1 原理

胶体金法检测抗 HIV 抗体是一种不需要任何仪器设备的血清/血浆检测法, 它利用抗体抗原反应及免疫层析技术来定性检测血清/血浆中是否含有 HIV 抗体。

A. 1.3.2 测试步骤

- a) 去掉每个测试条的外包装;
- b) 对血清或血浆样品:
 - 1) 加 50 μ L 样品于样品反应皿中;
 - 2) 等最少 15 min (最多 60 min) 然后读取结果;
- c) 对全血样品 (静脉血):
 - 1) 加 50 μ L 样品于样品反应皿中;
 - 2) 直至血液吸入样本皿, 然后加入一滴 Chase 缓冲液;
 - 3) 等最少 15 min (最多 60 min) 然后读取结果;
- d) 对全血样品 (手指血):

- 1) 加 50 μL 样品于样品反应皿中;
- 2) 直至样品被样品反应皿全部吸收,然后加入一滴 Chase 缓冲液;
- 3) 等最少 15 min(最多 60 min)然后读取结果。

A.1.3.3 质量控制

为确保结果有效,有标有“Control”的质控条,当分析结束后质控条带没有变红,测试结果无效,必须重测。

A.1.3.4 结果判断

- 阳性(二条红线):病人条带(标有“Patient”)和质控条带(标有“Control”)都呈红色被认为是阳性,如有任何可见的红色在病人条带上,也解释为阳性;
- 阴性(一条红线):病人条带(标有“Patient”)无色而质控条带(标有“Control”)呈红色被认为阴性;
- 无效(没有红线):病人条带和质控条带都无色被认为结果无效,(即使病人条带有红线),需重作。

A.2 HIV 抗体确认试验

A.2.1 原理

HIV 抗体确认试验主要用蛋白印迹试验(western blot, WB)。

蛋白印迹试验是将 HIV 病毒蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-Polyacrilamide Gel)电泳,将分子量大小不等的蛋白带分离开,然后再把这些已经分离的不同蛋白带电转移到硝酸纤维素膜上,将此膜切割成条状,每一条硝酸纤维素膜上均含有经电泳分离过的 HIV 病毒抗原。将待检血清样品用稀释液稀释成 1:100,再把它直接放到硝酸纤维素膜上,并静置一段时间,使其充分接触反应,血清中若含有抗-HIV,就会与硝酸纤维素膜条上的抗原带相结合,经过冲洗去掉未结合的多余抗体,并加入抗人-IgG 酶结合物,洗去未结合的抗人-IgG 酶结合物,加入底物,即可使有反应的抗原-抗体结合条带呈现紫褐色,这表示阳性反应。

A.2.2 试验方法

A.2.2.1 试剂配制

- 配洗液:20 倍稀释浓缩洗液,1 mL 浓缩洗液+19 mL 蒸馏水;
- 贮存缓冲液配制 1:10 倍稀释,即 1 体积浓缩缓冲液+9 体积蒸馏水;
- 配印迹缓冲液:印迹缓冲液临用前配制,称取 1 g 奶粉加入 20 mL 稀释的贮存缓冲液;
- 配工作浓度的酶结合物:工作浓度的酶结合物为 1:1 000 稀释,即 5 μL 浓缩酶结合物加入 5 mL 印迹缓冲液。

A.2.2.2 操作步骤

- 用镊子小心将所需数量的硝酸纤维素条从管里夹出,放进槽内,每次实验包括强阳性反应对照,弱阳性反应对照和阴性反应对照;
- 加 2 mL 稀释洗液至槽内;
- 于摇床上摇动,室温($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)孵育至少 5 min,然后将液体吸去;
- 加 2 mL 印迹缓冲液至槽内,加 20 μL 病人血清标本或对照样品至各相应的槽内;
- 盖上盖子于室温摇床摇动孵育 1 h($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)或过夜(12 h~18 h);
- 吸去槽内液体,避免槽与槽之间的污染;
- 每槽加 2 mL 洗液,在摇床上摇动孵育 5 min,然后吸去洗液,重复两次;
- 加 2 mL 新配制的工作浓度酶结合物至各槽内,盖上盖子在摇床上摇动,室温孵育 1 h;而过夜孵育的标本则室温孵育 30 min;
- 吸去槽内液体,每槽加 2 mL 洗液,在摇床上摇动孵育 5 min,然后吸去洗液,重复两次;

- 每槽加 2 mL 底物缓冲液,摇床上摇动孵育 10 min~15 min;
- 吸去底物,加蒸馏水洗数次终止反应(如果此步骤洗不充分可造成黑色背景);
- 用镊子将反应带移至滤纸吸干。

A. 2. 2. 3 结果观察(试剂说明):

- 阴性反应对照:无 HIV-1 和 HIV-2 异性带,但可见血清质控带;
- 强阳性反应对照:可出现下列反应条带,依分子量大小依次排列为:p17、p24、p31、gp41、p51、p55、p66、gp120、gp160,另还可出现其他核抗原带如:p39 和 p42,注意不要将其误认为是 gp41,可见到血清质控带和 HIV-2 特异性反应带;
- 弱阳性反应对照:可出现下列反应带,p24 和(或)gp41 和 gp120/160,另外还可以出现一些弱带。

A. 2. 2. 4 结果判断:根据 GB 16000—1995 的规定,蛋白印迹法的判断标准为:

- 阳性:至少有一条 env(gp160, gp120, gp41)带和一条 pol(p65, p51, p32)带或至少有一条 env 带和一条 gag(p55, p24, p18)带或至少有一条 env 带和一条 gag 带,一条 pol 带或至少两条 env 带;
- 阴性:无病毒特异带;
- 可疑:一条 gag 带和一条 pol 带或只有 gag 带或只有 pol 带。

附 录 B
(规范性附录)
HIV 抗体实验流程图

B.1 HIV 抗体初筛实验流程图(见图 B.1)

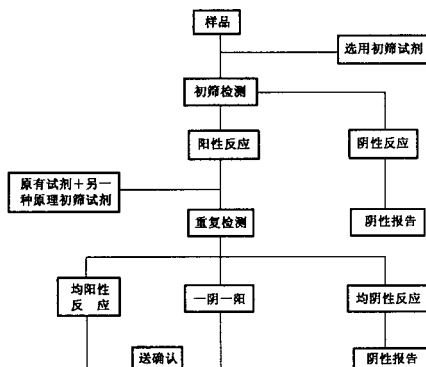


图 B.1

B.2 HIV 抗体确认实验流程图(见图 B.2)

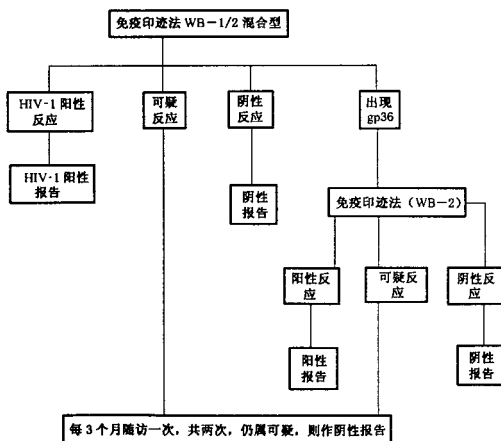


图 B.2

附录 C

(资料性附录)

HIV 抗原的检测原理和方法

C.1 原理

将纯化的 HIV 抗体包被在固相反应板小孔中,当待测样品加入后,若样品中有 HIV 抗原,即被抗体固定于板上,洗涤后再加入酶标记的同种 HIV 抗体,因此,在抗原之上又结合了一层带有酶的抗体,加入底物液显色后,可在酶标仪上读出结果,此时的阳性反应,表明样品中含有 HIV 抗原。通常检测 HIV 核心蛋白 p24 抗原。

C.2 方法

C.2.1 操作步骤

- 加入 25 μL 稀释液至各反应板孔;
- 加入 100 μL 血清标本或对照于相应孔中,对照设三孔阴性,一孔阳性;
- 混匀,用粘胶纸封板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;
- 用新鲜配制的洗涤液洗板四次;
- 吸干,每孔加入 100 μL 酶结合物;
- 混匀,用粘胶纸封板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;
- 在孵育的最后 10 min,准备底物液;
- 洗板四次,吸干,每孔加入 100 μL 底物液;
- 置室温下(15 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$)30 min 左右;
- 每孔加入 100 μL 终止液,反应结果必须在 15 min 内读数完毕;
- 以空气为空白对照,用单波长 450 nm 或以波长 450 nm、630 nm(参比波长)测定 A 值。

C.2.2 结果分析

判定试验有效的条件如下:

- 阴性对照 NC,阴性对照平均值 NC_x ,阳性对照 PC;
- 单波长测定:阴性对照 $0.04 \leq \text{NC} \leq 0.13$,而且 $0.8(\text{NC}_x) \leq \text{NC} \leq 1.2(\text{NC}_x)$, $\text{PC} \geq 1.00$;
- 双波长测定:阴性对照 $0.00 \leq \text{NC} \leq 0.09$,而且 $0.7(\text{NC}_x) \leq \text{NC} \leq 1.3(\text{NC}_x)$, $\text{PC} \geq 0.96$;
- 至少有两个阴性对照 A 值符合上述要求。

C.2.3 计算

- 临界值 $= \text{NC}_x + 0.07$;
- 待检标本 A 值小于临界值为阴性;
- 待检标本 A 值大于等于临界值表示有反应,应将原标本重复实验一次(平行做双孔),如仍有一孔呈阳性反应,必须做确证实验。

附录 D

(资料性附录)

HIV 核酸的检测原理和方法

D.1 原理

D.1.1 定性检测是通过将样品进行处理,从样品中提取 HIV 核酸并扩增,最后对核酸进行检测以判定是否存在 HIV。

D.1.2 定量检测又称病毒载量实验,它是对感染者体内游离病毒核酸 RNA 含量的定量测定,通常使用血浆作为检测样品。目前使用的病毒载量测定技术主要有三种:逆转录多聚酶链反应系统(RT-PCR);分枝 DNA 信号扩大系统(bDNA);核酸序列扩增系统(NASBA)。本附录提供了最常见的核酸定性检测方法。

D.2 方法

D.2.1 样品采集

标记好试管后,抽取静脉血 5 mL,去除针头加到有抗凝剂的试管中(管内有 1.5% EDTA 0.5 mL 终浓度为 0.15%),立即混匀。

D.2.2 外周血淋巴细胞(PBMC)的分离

- 将样品 2 000 r/min,离心 15 min,吸取血浆层—80℃冻存;
- 加入 2.5 mL PBS 稀释下层血球并混匀;
- 取一支 10 mL 试管,加入 2.5 mL 淋巴细胞分离液;
- 在分离液面上缓缓加入 5 mL 稀释全血,注意勿破坏分离层;
- 将试管轻轻放入离心机,2 500 r/min,离心 20 min;
- 轻轻取出离心管,又上而下可见血浆层(或 PBS 层)、淋巴细胞层、分离液层、红细胞层;
- 吸出红细胞层(2 mL~3 mL)至一新试管中;
- 加 4 mL~5 mL PBS 或生理盐水(NS),混匀;
- 1 700 r/min,离心 10 min,反复洗两遍,沉淀溶于 PBS 至 200 μ L,用于核酸提取。

D.2.3 提取核酸

D.2.3.1 准备工作

- 准备 70℃水浴;
- 蛋白酶溶液的配制(蛋白酶溶液 4℃可保存二月至三月),蛋白酶储存液 20 mg/mL(溶于水—20℃保存),反应浓度 50 μ g/mL~200 μ g/mL;
- AW 使用液的配制(室温保存),按试剂瓶上的要求加入乙醇后使用。

D.2.3.2 核酸提取

- 取 200 μ L 淋巴细胞富集液(或 200 μ L 抗凝全血),加入 1.5 mL 离心管中;
- 加入 25 μ L 蛋白酶溶液,再加 200 μ L AL 溶液,盖好盖子,立即混匀;
- 70℃水浴保温 10 min,同时可将洗脱液或 10 mmol/mL, pH 8.0 Tris-HCL 预热到 70℃;
- 从水浴中取出,加入 210 μ L 无水乙醇,盖好盖子,立即混匀;
- 将提纯柱放入离心套管中,然后将上述混合液加入提纯柱中,盖好盖子,于台式高速离心机中 12 000 r/min,离心 1 min;
- 将提纯柱移入一新的离心套管中(原套管连同滤液高压消毒后丢弃),加 500 μ L AW 使用液于提纯柱中,离心 1 min;

- 重复上一步骤,再全速离心 2 min,弃套管及滤液;
- 将提纯柱放入一新的 1.5 mL 离心管中,将 200 μ L 预热到 70℃ 的洗脱液加入提纯柱中,盖好盖子,12 000 r/min,离心 1 min,洗脱下来的即为核酸样品;
- 将上步接有核酸样品的 1.5 mL 离心管及提纯柱盖好盖子,分别做好标记,并用封口膜封好盖子及提纯柱漏口,4℃ 保存。

D.2.3.3 核酸扩增

D.2.3.3.1 第一轮 PCR 扩增

- 取 0.2 mL 或 0.5 mL 管,每管依次加入:
- 10 $\times$ buffer 3 μ L;
- dNTP(2 mmol/L) 3 μ L;
- 引物 1(20 μ mol/L) 0.6 μ L;
- 引物 2(20 μ mol/L) 0.6 μ L;
- Taq 酶(3 μ /L) 0.6 μ L;
- ddH₂O 17.2 μ L;
- DNA 模板 5 μ L;
- 总体积 30 μ L,充分混匀后,在离心机上将管内液体甩入管底;
- 将管置于 PCR 仪上;
- 扩增条件:
- 94℃ 2 min,55℃ 30 s,72℃ 3 min,1 cycle;
- 94℃ 30 s;55℃ 30 s,72℃ 1 min,30 cycle;
- 72℃ 10 min;
- 4℃ 保温。

D.2.3.3.2 第二轮扩增

- 第一轮扩增完毕,取 5 μ L 扩增产物作为第二轮 DNA 模板;
- 按上述体系配置反应混合物,除引物换为内侧引物外,其余成分与第一轮扩增反应相同,以相同循环参数设置 PCR 反应条件;
- 对于不同的引物,应相应的改变反应条件。

D.2.3.4 凝胶电泳检测 PCR 扩增产物

- 取第二轮扩增产物 5 μ L 加入 1 μ L 上样缓冲液,混匀后在含有 0.5 mg/mL 溴化乙锭的 1% (或 1.5%) 琼脂糖凝胶上进行电泳,电泳缓冲液可以是 TAE 或 TBE;
- 电泳条件:80 V,40 min;
- 电泳完毕在紫外灯下观测结果,如出现与阳性对照同样大小的条带,则判为阳性。

附 录 E

(资料性附录)

HIV-1 的分离培养

E.1 原理

从 AIDS 病人或 HIV 感染者的血液、体液或有关组织器官中采集标本,用外周血单核细胞培养,观察病变情况,以 HIV 半数细胞感染剂量(TCID₅₀)为指标。

E.2 方法

E.2.1 从 HIV 阳性病人制备 PBMC

- 取 40 mL 经抗凝处理的血(EDTA-血),加 PBS 稀释至 80 mL;
- 取三支 50 mL Falcon 管,分别加 25 mL Ficoll;
- 小心加入 25 mL 稀释的病人血,使分层;
- 2 000 r/min 离心 30 min(不能急停),移去大部分上层液相(稀释的血浆)分成 10 份,各 1.8 mL, -80℃ 冻存;
- 余液 2 500 r/min 再离心 10 min,从液面交界处收集 PBMC,转移至新 50 mL 管,用 PBS 加满至 50 mL,如此洗两次,1 200 r/min 离心 10 min;
- 在细胞团中有许多红细胞,可将细胞在 10 mL 0.87% NH₄Cl 中 37℃ 孵育 10 min 即可除去;
- 离心后用 PBS(或 HBSS)洗,细胞需计数;
- 将四份 5×10^6 个外周血单核细胞,置于 50% FCS、10% DMSO 的 RPMI 1640 中, -80℃ 冻存;
- 剩余的细胞(至少 5×10^6)用作 HIV 分离。若细胞数不足,每小瓶的细胞数需减少。

E.2.2 HIV 的分离

- 在测试当天,取 15% FCS 的 RPMI 1640 培养液 14 mL,加入 12×10^6 激化的正常人外周血单核细胞与至少 5×10^6 (病人的)共培养;
- 在测试第三天加 2 mL 初培养液于 12 mL 新激化的正常人外周血单核细胞(1×10^6 /mL),每天镜检;
- 根据培养物的形态和代谢决定整个培养时期的添加物是培养液和(或)新激化的正常人外周血单核细胞(大约三分之二的细胞悬浮液需替换),并开始检测病毒,即 HIV 抗原鉴定(ELISA)和(或)RT 鉴定;
- 当抗原鉴定首次为阳性时,即日收获病毒;上清液(ISF)为 1 mL $\times$ 10 小瓶和细胞(1 mL)为 5×10^6 个细胞 $\times$ 5 瓶(在 50% FCS、10% DMSO 中, -80℃ 冻存);
- 平行的细胞继续培养使病毒敏殖至最高滴度,当 HIV 抗原鉴定达最大值时,需做 RT 活性鉴定测试;
- 若 RT 活性达每个单独分离所能达到的最大值,再一次收获病毒,即上清液(2SF)为 1 mL $\times$ 10 小瓶,细胞(2CC)为 5×10^6 个细胞 $\times$ 5 瓶(在 50% FCS、10% DMSO 中),需找出各个的最适值;
- 若检测为阴性,培养物需继续培养,直至第 7 d,按上述方法检测病毒;
- 如仍为阴性,则培养至 10 d,或 14 d,或 17 d,或 21 d,或 24 d;
- 若至第 28 d 仍为阴性,弃去培养物(个别培养至 35 d)。

附 录 F
(规范性附录)
HIV 抗体初筛阳性送检化验单式样

表 F.1

秘密

编号

送检单位				送检日期	年 月 日		
送检标本				送检人群			
姓名		性别		年龄		职业	
国籍或民族			地址				
		初筛实验	复核实验				
			第一次		第二次		
检测日期							
检测方法							
试剂厂家							
批 号							
有效期							
ELISA 法 A 值	空白						
	阴性对照						
	阳性对照						
	临界值						
	样本						
结果							
检测者			审核者				
送检单位(公章)			备注				
电话 邮编							

附 录 G
(规范性附录)
HIV 抗体检测确认报告式样

HIV 抗体检测确认报告
REPORT OF HIV ANTIBODY TESTING

秘密 SECRET

编号 NO.

送检单位 FROM					送检日期 DATE	年 月 日	
送检标本 SPECIMEN					送检人群 GROUP		
姓名 NAME		性别 SEX		年龄 AGE	职业 OCCUPATION		
国籍或民族 NATIONALITY			地址 ADDRESS				
检测方法 METHOD		检测日期 DATE			检测结果 RESULTS		
酶标法 ELISA							
免疫印迹法 带型 WESTERN BLOT BANDS							
结论 CONCLUSION							
检测人 OPERATOR			签发人 HEAD			报告日期 DATE	年 月 日
确认单位或实验室(公章) INSTITUTION OF LABORATORY				备注 NOTE			