

HIV抗体检测技术及质量控制

苏州市疾病预防控制中心

雅雪蓉

目录

CONTENTS

- 1 HIV抗体检测依据
- 2 HIV抗体检测及质量控制

01

PART

HIV抗体检测 依据



01 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

➤ WS 293-2019：艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

6.1 HIV 感染

6.1.1 成人、青少年及 18 个月龄以上儿童

符合下列一项者即可诊断：

- a) HIV 抗体筛查试验有反应和 HIV 抗体确证试验阳性；
- b) HIV 抗体筛查试验有反应和核酸定性试验阳性；
- c) HIV 抗体筛查试验有反应和核酸定量试验 >5000 CPs/mL；
- d) 有流行病学史或艾滋病相关临床表现，两次 HIV 核酸检测均为阳性；
- e) HIV 分离试验阳性。

ICS 11.020
C 59

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 293—2019
代替 WS 293—2006

艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

Diagnosis for HIV / AIDS

2019-01-02 发布

2019-07-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布



01 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

➤ 流行病学史：

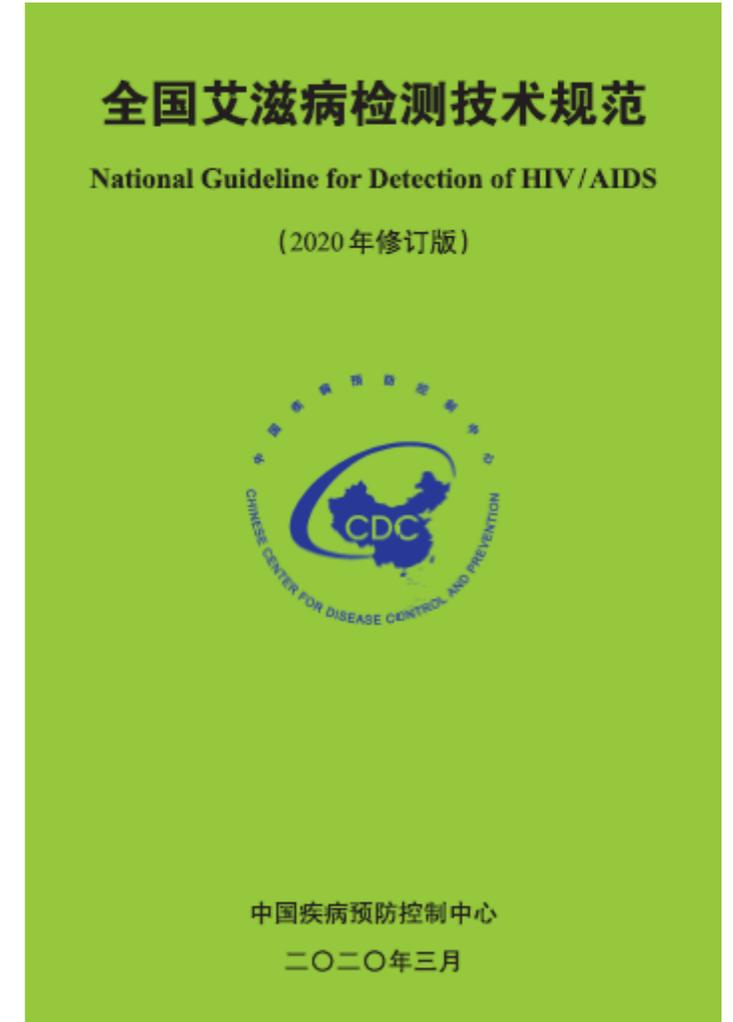
- 患有性病或有性病史
 - 有不安全性行为(包括同性和异性性接触)
 - 有共用注射器吸毒史
 - 有医源性暴露史
 - 有职业暴露史
 - HIV/AIDS患者的配偶或性伴侣
 - HIV/AIDS母亲所生子女
- 临床表现：A（免疫系统轻度缺陷）、B（中度）、C（重度）、D、E、F组临床表现



02 全国艾滋病检测技术规范（2020年修订版）

全国艾滋病检测技术规范（2020年修订版）：

- **目的**：诊断、血液筛查、监测
- **要点**：根据目的选择方法和策略；严格遵守SOP；结果判定以试剂盒说明书为标准；筛查试验呈反应性，需做补充试验；筛查试验无反应，不应做抗体确证试验；对筛查及补充试验对象均应做好咨询工作。
- **方法**：ELISA、化学发光或免疫荧光、快速检测、确证试验。



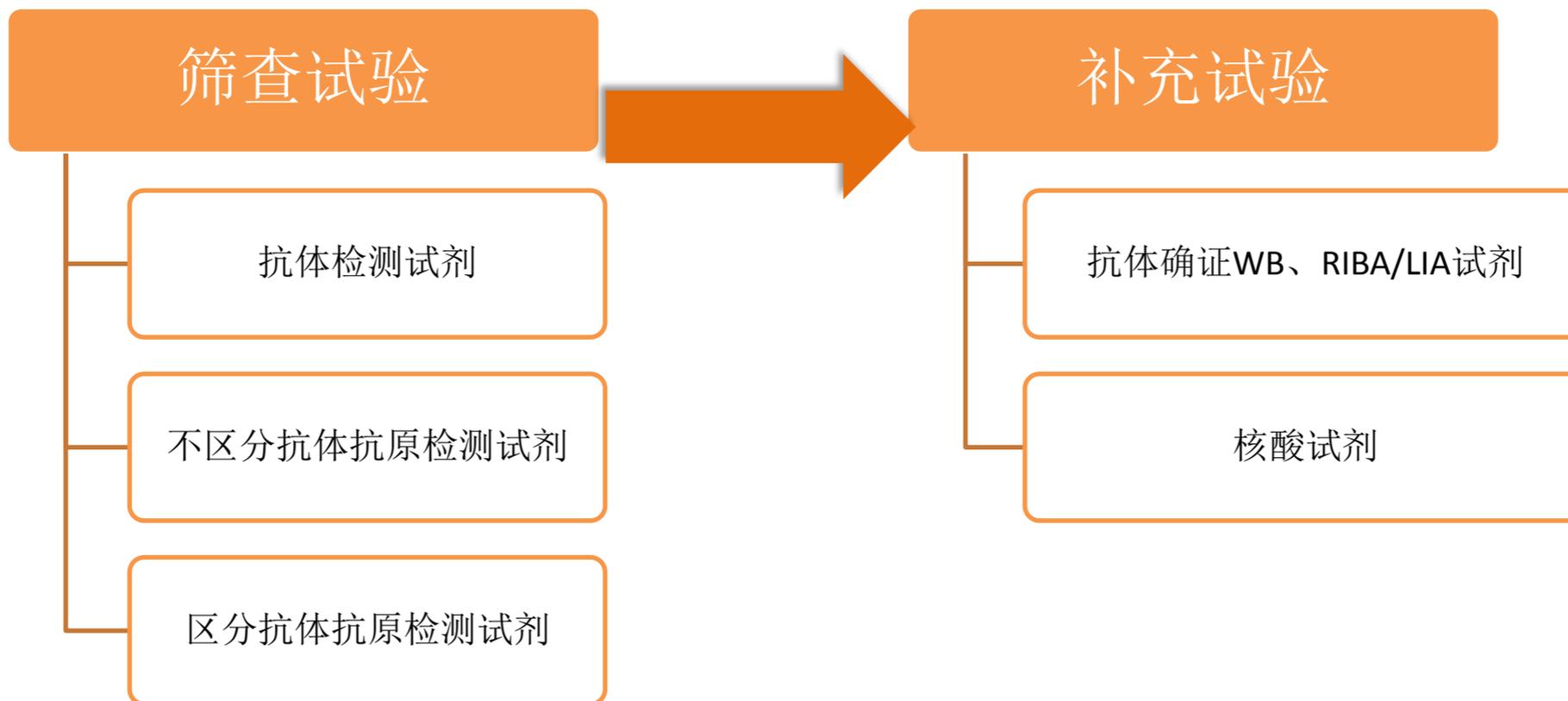
02

PART

HIV抗体检测 及质量控制



01 HIV检测流程

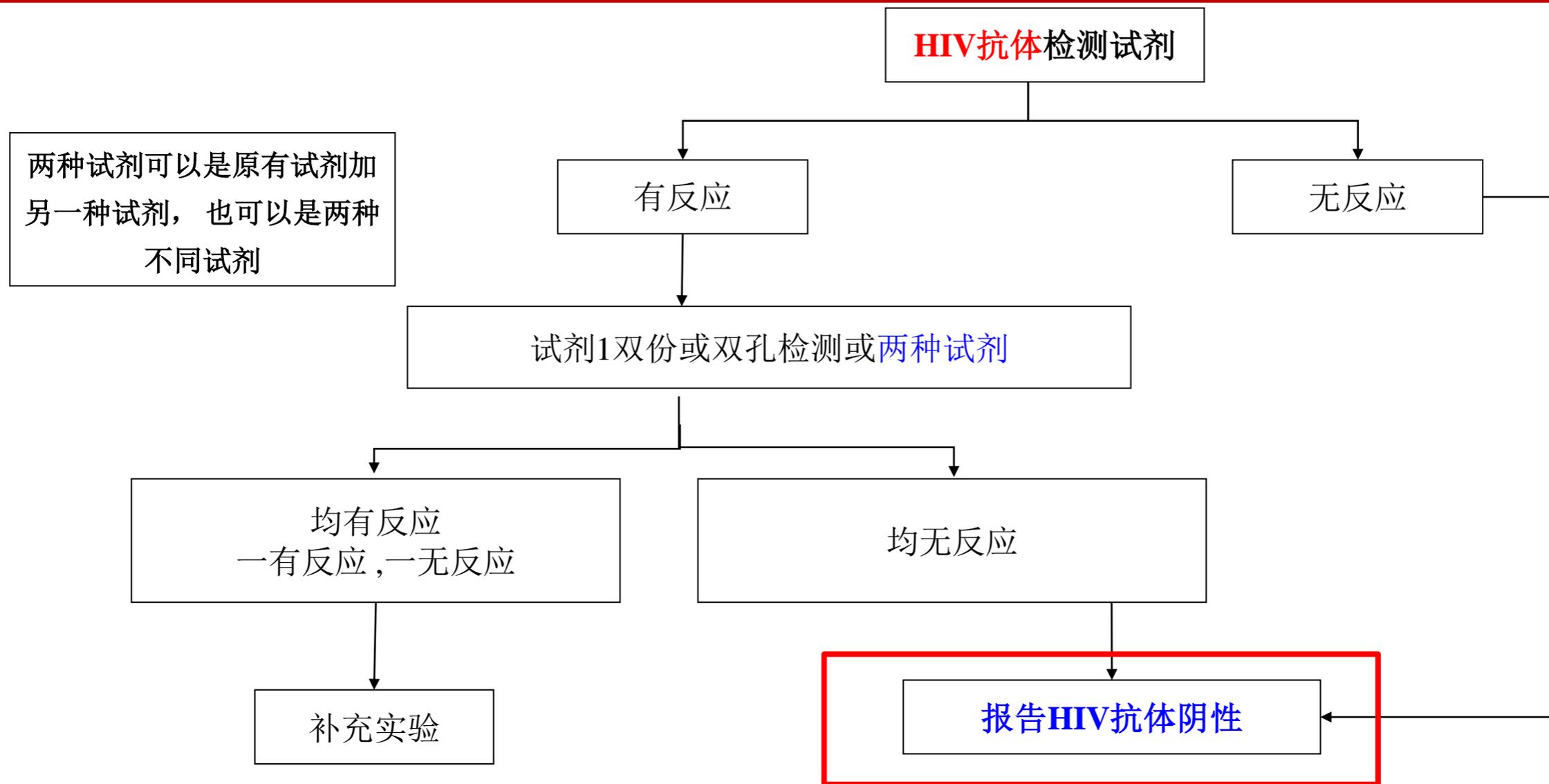


HIV检测策略的基本原则：首先做筛查试验，根据筛查结果，决定是否继续做补充试验。

- HIV筛查试验--敏感性高(初筛)
- HIV诊断依靠一系列补充试验联合应用提高准确性



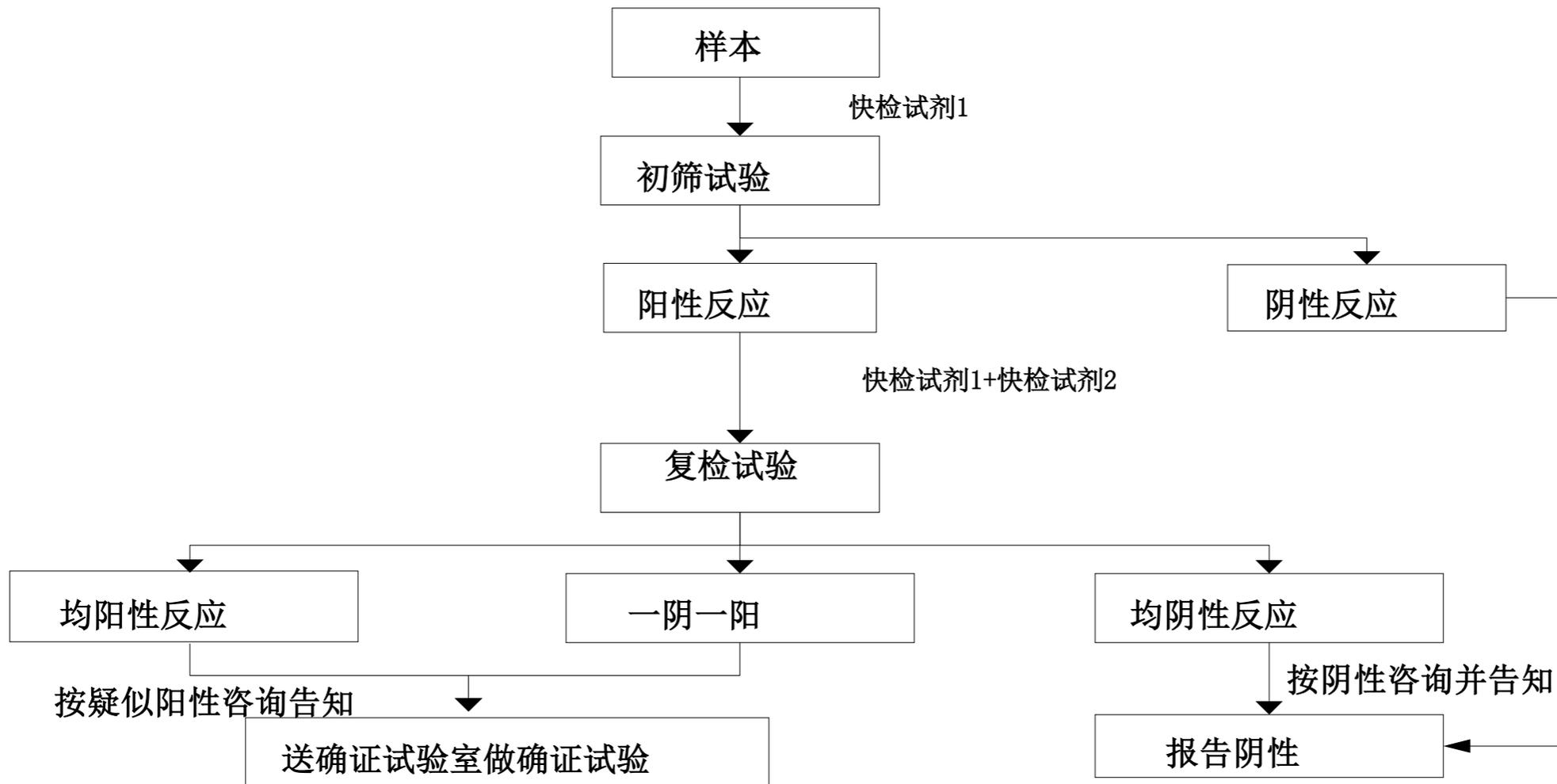
02 抗体检测试剂的筛查检测流程





03 快速检测策略及流程-1

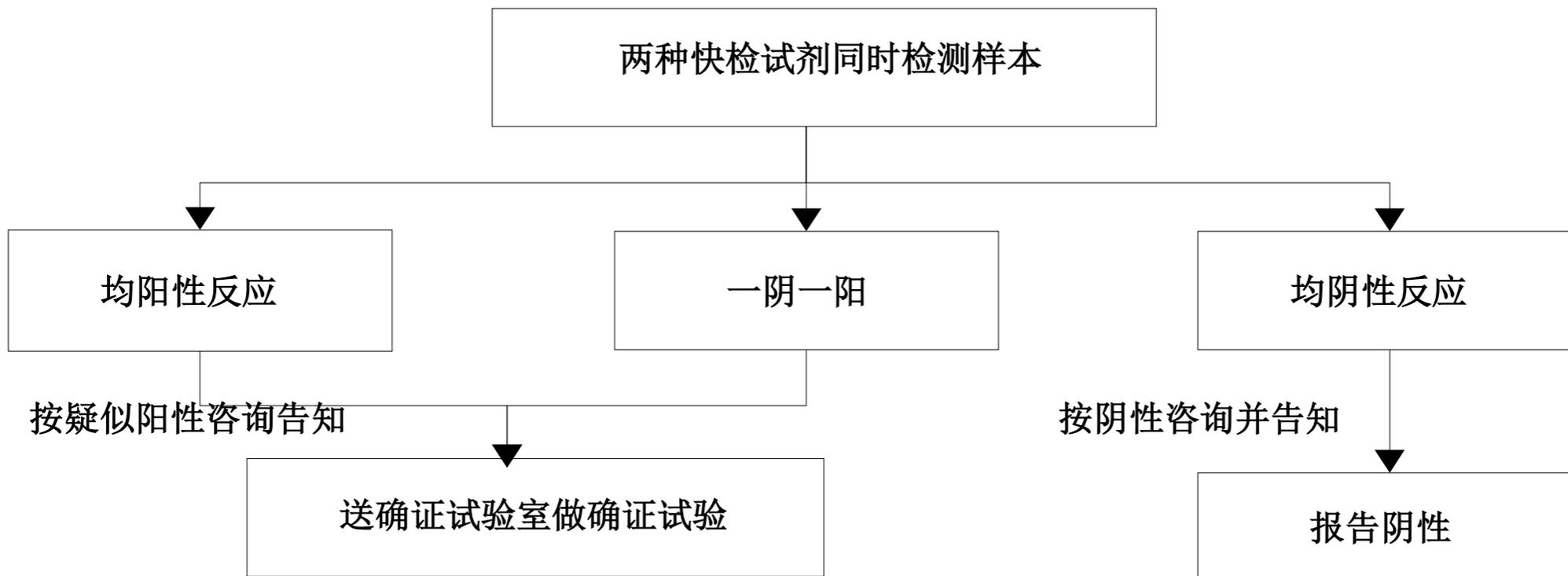
- 当有两种快速检测试剂时：常规检测





04 快速检测策略及流程-2

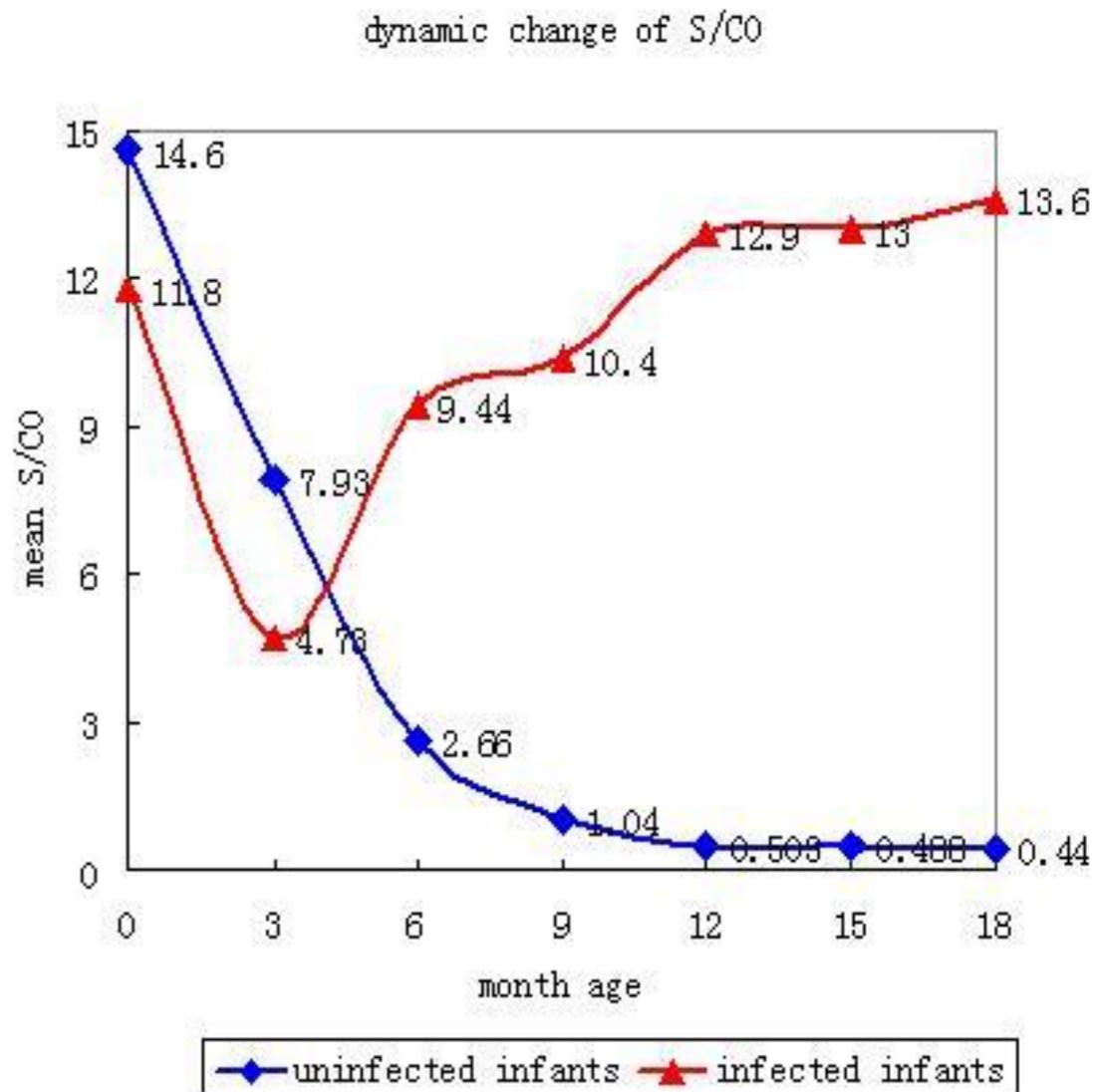
- 当有两种快速检测试剂时：**应急检测-如孕妇产时、手术前、职业暴露等**





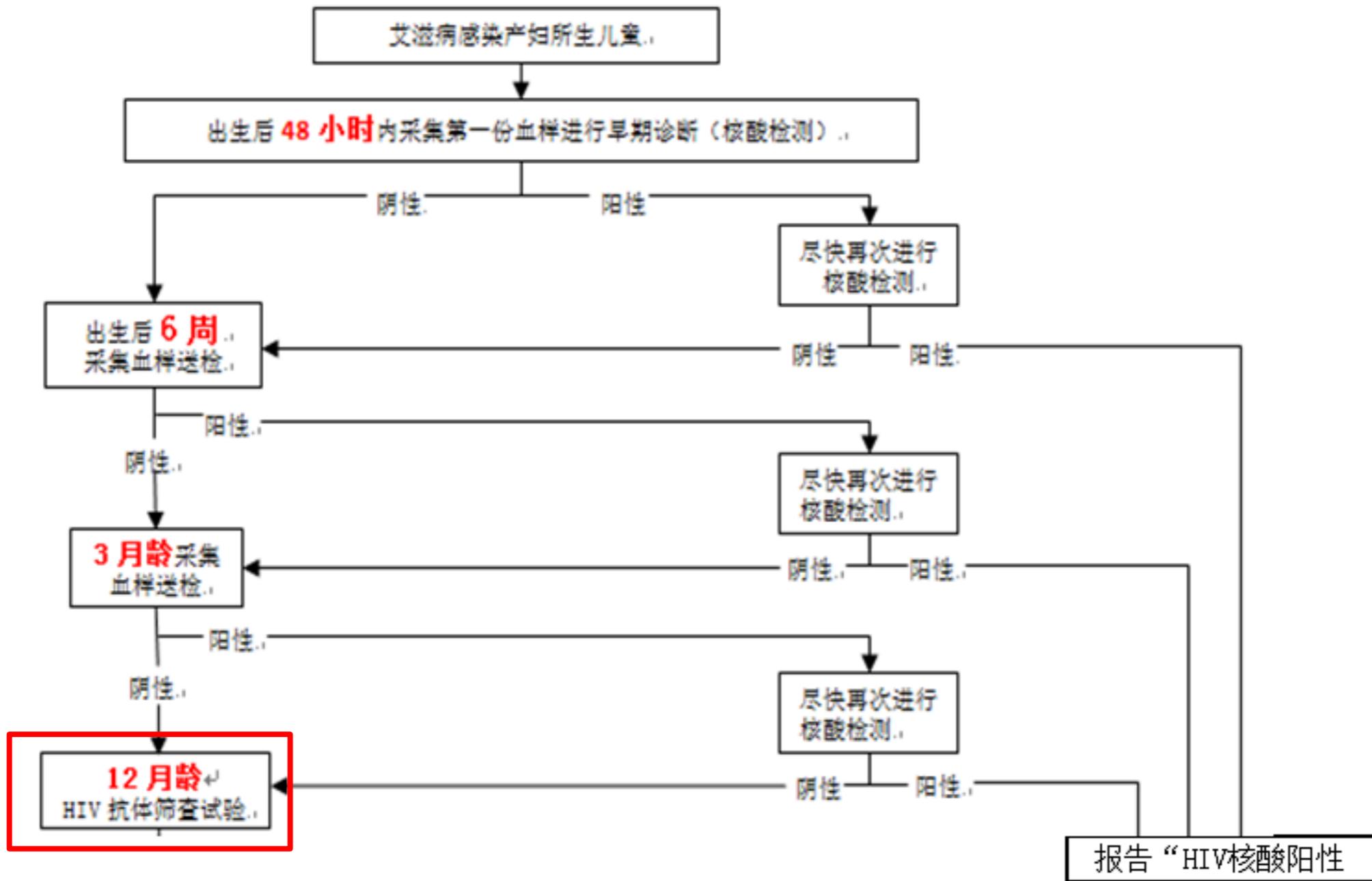
05 18个月以下婴幼儿HIV诊断

- 母亲HIV IgG抗体经胎盘进入胎儿体内，HIV阳性的母亲所生新生儿和婴儿早期HIV抗体阳性—不一定是HIV感染
- 出生时来自母体的抗体80-90%在出生后9-12个月消失，出生后18个月基本全部消失
- 18个月以后儿童HIV抗体仍然阳性的一般视为自身感染产生的抗体





06 艾滋病感染孕产妇所生儿童艾滋病早期诊断（核酸检测）





07 常规HIV抗体检测方法-筛查

同时检测HIV抗体
与P24抗原，缩短
窗口期

➤ 酶联免疫吸附试验（ELISA）

- 血液（包含血清、血浆和滤纸干血斑）、尿液样品
- 三代试剂 VS **四代试剂**
- 酶标记，TMB底物，酶标仪，吸光度

➤ 化学发光或免疫荧光试验（CIA/IFA）

- 血液(包含血清和血浆)、尿液样品
- 酶/荧光标记，发光/荧光底物，发光或荧光仪，发光强度

➤ 快速检测（RT）及其它试验

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



08 常规HIV抗体检测方法-确证

- 免疫印迹试验 (WB)
 - 可使用血清、血浆和滤纸干血斑
 - 检测样品中的抗HIV-1/HIV-2特异性抗体
 - 按照试剂盒说明书判定标准，判断待测样品为阳性、阴性或不确定
 - 特异性最高的方法，故用来做确证
- 条带/线性免疫试验 (RIBA/LIA)
- 替代策略



09 如何做好HIV抗体检测？

- **标本**是正确的和好的：**采集、运送和保存**
- 实验室**环境条件**是好的：**温湿度、可能的干扰的避免**（分区、灰尘、电磁、振动等）
- **仪器设备**状态是好的：**维护、定期校准**
- **试剂**是好的：**性能验证、质检**
- 实验室**人员**是有能力的：**外部和内部培训，能力评估**
- **SOP和试剂说明书**是正确的、最新的：**定期更新，严格遵照执行**
- 能正确的理解和应用**检验结果**于患者疾病的诊断和治疗

样 本



Download from
Dreamstime.com
This watermarked image is for previewing purposes only.

21415858
Jarun011 | Dreamstime.com



01 样本的采集和处理

一般不用，因为
会抑制PCR扩增

- **血液（全血、血）**：流动在心脏和血管内的不透明红色液体。
 - **抗凝全血**：消毒局部皮肤，用加有抗凝剂（EDTA 钠盐或钾盐、枸橼酸钠、**肝素钠**）的真空采血管抽取适量静脉血，或用一次性注射器抽取静脉血，转移至加有抗凝剂的试管中，轻轻颠倒混匀**10~15**次，备用。
- **血浆**：血液的重要组成部分，呈淡黄色液体，含纤维蛋白原。
 - 根据检测需要，选择含适宜抗凝剂的采血管，按照采血管说明采集静脉血，分离血浆；或将采集的抗凝全血1500-3000转/分钟离心15分钟，上层即为血浆，吸出置于合适的容器中，备用。



01 样本的采集和处理

- **血清**：离体的血液凝固以后，经血凝块聚缩释出的淡黄色透明液体，不含纤维蛋白原。
 - 根据检测需要，按照采血管说明采集静脉血，分离血清；或用不含抗凝剂的真空采血管抽取适量静脉血，或用一次性注射器抽取静脉血，转移至无抗凝剂或含促凝剂的试管中放置1-2小时，待血液凝固、血块收缩后再用1500-3000转/分钟离心15分钟，吸出上层血清，置于合适的容器中，备用。
- **末梢全血**：消毒局部皮肤（成人和1岁以上儿童可选择耳垂、中指、无名指或食指，1岁以下儿童采用足跟部），用采血针刺破皮肤，用无菌纱布擦掉第一滴血。收集滴出的血液，备用。



01 样本的采集和处理

- 尿液：按照试剂盒说明书要求采集样本。尿液样品可采集随机尿，女性经期应取**中段尿**。尿液样本准备好带有唯一编码的采尿管或者尿杯，并保留唯一编码。
- **口腔黏膜渗出液**：按照试剂盒说明书要求采集样本。口腔黏膜渗出液应采集口腔黏膜渗出液，**不是唾液**。



01 样本的采集和处理

如不及时处理导致严重溶血或微生物污染可能影响检测结果

- 全血、血清、血浆、口腔黏膜渗出液、尿液、干血斑以及血液制品原料样本可用于HIV抗体检测。
- 根据检测项目的具体要求，确定采集样本的种类、处理、保存及运输的时限和方法，按照临床采血技术要求操作，遵守生物安全相关要求。
- 采样前应检查所需物品是否已备齐，是否在有效期内，有无破损，是否足量，特别应检查受检者信息与样本容器表面的标记是否一致，并注明**样本采集时间**及**唯一编码**。
- 采集的血样应**及时分离出血浆、血清**等用于检测或保存。



02 样本的保存

- 用于抗体和抗原检测的血清或血浆样本，短期（1周）内检测的可存放于2~8℃，一周以上应存放于-20℃以下。
- 用于核酸检测的血浆和血细胞样本，4天内进行检测的可存放于2~8℃，3个月以内应存放于-20℃以下，3个月以上应置于-70℃以下保存。
- 口腔黏膜渗出液样本应即刻使用，需要保存应以产品说明书为准。尿液快速检测样本保存条件以产品说明书为准。
- 尿液样品，使用专用采尿管，室温下可保存2周，三个月之内存放宜在2~8℃。长期保存（三个月以上）的样本冻存条件、是否添加防腐剂等以产品说明书为准。



02 样本的保存

- 用于CD4+T淋巴细胞检测的全血样本，室温保存，时间不超过48小时。如果用CD45设门，样本保存不超过72小时。
- 筛查结果为阳性的样本应及时进行补充试验；筛查结果为阴性的样本，可根据具体需要决定保存时间，**建议至少保存1个月**。艾滋病检测确证实验室收到的筛查阳性样本，无论补充试验结果如何，均应保存剩余样本，保存时间根据**需要确定，建议至少保存3年，特殊用途或专项项目**的样本根据具体要求确定保存时间。补充试验结果为阳性的样本按照国家生物样本管理的有关规定执行。



03 样本的运送

- 全血、血浆的运送应符合**生物安全要求**，参照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（卫生部第45号令，2006年2月1日执行）。
- 血液样本运送时应采用**三层容器**对样本进行包装，随样本应附有与样本唯一性编码相对应的**送检单**。送检单应标明受检者姓名、样本种类等信息，并应放置在第二层和第三层容器之间。
- **第一层容器**：直接装样本，应防渗漏。样本应置于带盖的试管内，试管上应有明显的标记，标明样本的唯一性编码或受检者姓名、种类和采集时间。在试管的周围应垫有缓冲吸水材料，以免碰碎。



03 样本的运送

- 第二层容器：容纳并保护第一层容器，可以装若干个第一层容器。要求不易破碎、带盖、防渗漏、容器的材料要易于消毒处理。
- 第三层容器：容纳并保护第二层容器的运输用外层包装箱。外面要贴上醒目的标签，注明数量、收样和发件人及联系方式，同时注明“小心轻放、防止日晒、小心水浸、防止重压、禁止倒立”等字样，还应易于消毒。
- 用于抗体检测的血清和血浆样本应在冻存条件下运送。用于CD4+和CD8+T淋巴细胞测定的样本应在室温下（18~25℃）运送。用于病毒载量检测的样本应在-20℃以下运输。干血斑和尿液样本应在室温下（18~25℃）运送，可通过邮寄方式运送。血液制品样本的运送按照血液制品有关使用说明执行。



03 样本的接收

- 样本包裹必须在具有处理感染性材料条件的实验室内、由经过培训的工作人员打开，打开包裹时应穿戴**防护衣、戴手套、口罩和防护眼镜**，在**生物安全柜**中打开，用后的包裹应及时进行消毒。
- **核对样本与送检单**，检查样本管有无破损和溢漏。如发现溢漏应立即将尚存留的样本移出，消毒样本管和盛器，同时报告实验室负责人和上一级实验室技术人员。
- 检查样本的状况，记录血液样本有无**严重溶血、微生物污染**、血脂过多以及黄疸等情况。记录干血斑和尿液样本包装是否完整，如果污染过重或者不符合接收要求，应将样本安全废弃。并立即将样本情况通知送样人，要求重新采集样本。



04 送样要求小结

- 样本量
- 样本的质量
- 样本管（高质量螺口管）
- 单独包装（每份样本用自封袋单独包装）
- 重新采样（双份样）
- 样品和送检单分开
- 专人送样
- 血清or血浆2-8度运送或者冻存状态下直接运送（看样本原先保存条件）



04 送样单要求小结

- 送样单打印
- 检测者/审核者手签，单位或实验室盖章
- 信息完整（送检人群、真实姓名、身份证号码、联系电话、地址等）
- 详细的样本来源（监管场所的具体到哪个监管场所）
- 充分利用备注栏（病人的其他检测信息、临床信息及自我报告信息）
- 规范性（试剂）

试剂





01 试剂的选择和保存

- 国家药品监督管理局（NMPA）注册批准；
- ELISA试剂批批检合格，在有效期内；
- 按试剂要求的温度范围保存，特别是快速检测试剂，尤其是在炎热的夏天；
- 推荐使用经临床质量评估敏感性和特异性高的试剂；
- 初筛试剂选择高敏感性的，防止漏检；
- 复检试剂选择高特异性的，排除假阳性。



02 试剂的敏感性和特异性

- **假阳性**：假的阳性，检测结果显示为阳性，但实际为阴性。
- **假阴性**：假的阴性，检测结果显示为阴性，但实际为阳性。
- **敏感性**：即**真阳性率**=真阳性/（真阳性+假阴性）
- **特异性**：即**真阴性率**=真阴性/（真阴性+假阳性）
- 一般来说，敏感性越高则特异性越低，同样，特异性越高则敏感性越低。
- 试剂临床质量评估所用血清盘为**血清/血浆**样本。
- 一般来说，**全血/末梢血/尿液/口腔粘膜渗出液**样本检测的敏感性/特异性**低于血清/血浆**样本。



07 试剂使用注意事项

- 严格按照试剂说明书操作；
- 阴阳性对照的数量；
- 有效性判断；
- Cutoff值的计算；
- 试剂的保存。



02 艾滋病检测实验室的设备检定与校准

- 检定：酶标仪、移液器、玻璃液体温度计、电子天平（移液器自校的需要）、压力表（高压灭菌器）
- 校准：移液器、玻璃液体温度计、恒温孵育设备、高压灭菌器的温度
- 温度计的比对注意温度区域：不同温度点的示值修正不同，甚至相反。
- 送检或外校时应与检定或校准机构充分沟通，使检定结果满足检验检测工作的需要。



01 加样及移液器的校准

- 加样的量要**准确**，**移液器**要经常清洗，**定期校准**
- 加样位置在**孔壁1/3以下**，不可溅出，不可产生气泡
- 必须使用**一次性TIP头**，严格控制，防止交叉污染
- 先加稀释液的，加样时可用移液器孔内吹打混匀

- 移液器的检定-**是否合格**的结论
- 移液器的校准（包括自校）-注意要将校准结果（**修正值或校准因子**）**用于测量过程中**
- 自校需有SOP有校准记录



04 恒温孵育设备

- 校准恒温孵育设备或使用经检定/校准/比对的温度计放置于恒温孵育设备中监测反应温度。
- 注意温度计所监测温度的位置（包括空气浴）。
- 水浴注意水位。



05 洗板机

- 洗液的量：试剂不同，板孔的大小差异会导致洗液的量的不同，为保证洗的彻底，原则是**量足够多且不会逸出**。
- **浸泡时间**：严格按照试剂盒说明书操作，一般30-60秒，不设置浸泡时间或时间太短，洗脱不彻底的话会产生“花板”。
- 保持针孔通畅不阻塞：血清中残留的纤维蛋白丝或洗涤液析出的结晶易使洗板机的针孔处于阻塞状态，造成未结合标记酶洗脱不彻底，导致“**花板**”。应做好洗板机的维护工作。
- 关于“花板”
 - 原因：**未结合的酶标记物洗脱不彻底**
 - 注意：排枪（多道移液器）及枪头的使用



06 酶标仪及全自动设备

➤ 必须检定

- 读板前应保证板孔底部干净，无异物，无水气，无气泡，特别是在冬天。
- 酶标仪不应放置在阳光或强光照射下,操作时室温宜在15-30℃,使用前先预热15-30min,测读板结果会更稳定。
- 防止液体溅入仪器，注意仪器的防尘，不用时罩上罩子。
- 一般是厂家定期校准和维护
- 校准和维护后厂家需出具证书
- 加液系统、滤光片（发光检测）、加热模块？



07 高压灭菌器

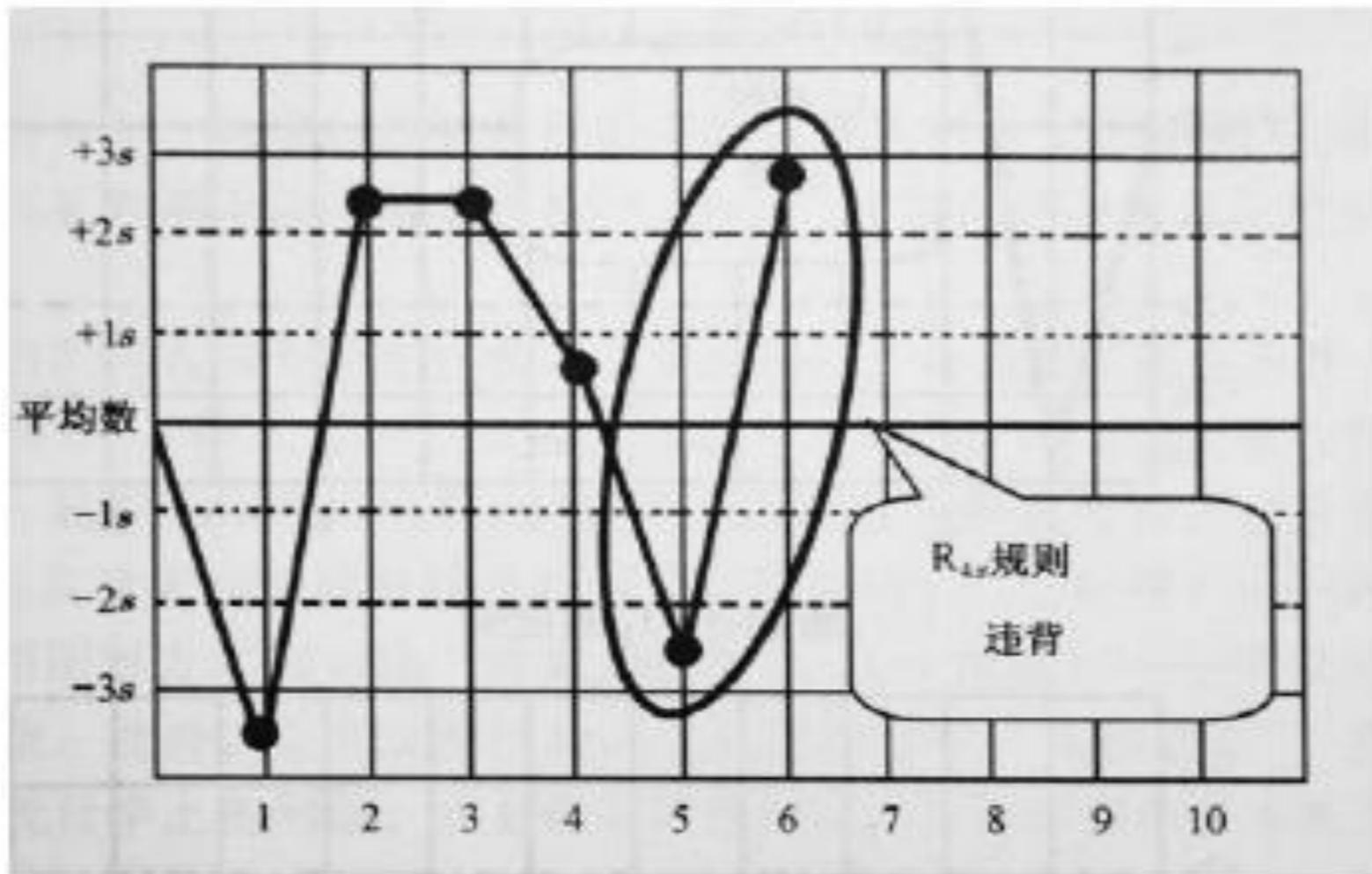
- 高压灭菌器检定：压力（半年一次，特种设备检定）
- 高压灭菌器校准：温度（计量，建议一年一次）
- 高压灭菌器使用效果监测：生物监测（嗜热脂肪杆菌芽孢）
- 高压灭菌器使用效果监测：化学指示卡
 - 注意**化学指示卡**与**高压胶带**的区别



08 生物安全柜

- 依据：中华人民共和国医药行业标准YY0569-2011《Ⅱ级生物安全柜》、中华人民共和国建筑工业行业标准JG170-2005《生物安全柜》
- 洁净度（尘埃粒子）
- 流入气流流速
- 气流烟雾模式
- 下降气流流速
- 等

室内质控





01 试剂盒内部对照

- **试剂盒内部对照**：试剂盒内部对照质控品即为试剂盒内提供的**阳性和阴性对照**。试剂盒内部对照用于判断每次实验的有效性，不能作为室内质控品使用。每一次检测临床样品时，必须有试剂盒内部对照，而且只能在同批号的试剂盒中使用。**如内部对照结果无效，必须重新试验。**
- 种类及数量应符合试剂盒说明书的要求。



02 室内质控品及选择

- 室内质控品：为非试剂盒组份的外部质控品，是为了监控检测的重复性而设置的，质控品定值必须为弱阳性。外部质控品的作用是判断该批临床样品检测的可信性。因此，每次实验必须包含室内质控品，出现失控时，必须重新试验。室内质控品可以购买或实验室自行制备。质控品应稳定、无菌、且不含有影响试剂反应的防腐剂。
- 在选择商品化的质控品时务必注意浓度值是否符合弱阳性的要求，尤其是化学发光方法。



03 室内质控品的来源

- 商品化的室内质控品
- 实验室自己制备（比较经济）
 - 混合试剂盒内部对照血清，通过做实验确定阴阳性对照的混合比例，混合，分装保存。（仅用于该品牌试剂盒）
 - 混合HIV抗体阳性人血清、HIV抗体阴性人血清，3000转/分钟离心15分钟，0.2 μ m生物滤膜过滤除菌，56 $^{\circ}$ C30分钟加热灭活处理。通过做实验确定阴阳性血清的混合比例，混合，分装保存。
- 高浓度商品化室内质控品再稀释



03 室内质控品的保存

- 一次购买或制备量应该足够本实验室至少一年使用
- 等量分装，可以按单次使用、单日使用、最长一周使用的量确定每个分装的量
- 不同室内质控品应做好标记，最好使用不同颜色的标签，以防止混用
- 应存放于 -70°C 以下，如无条件则存放于非自动除霜的 -20°C 冰箱
- 一旦融解后应存放于 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，一周后必须弃去，不能重新冻存使用



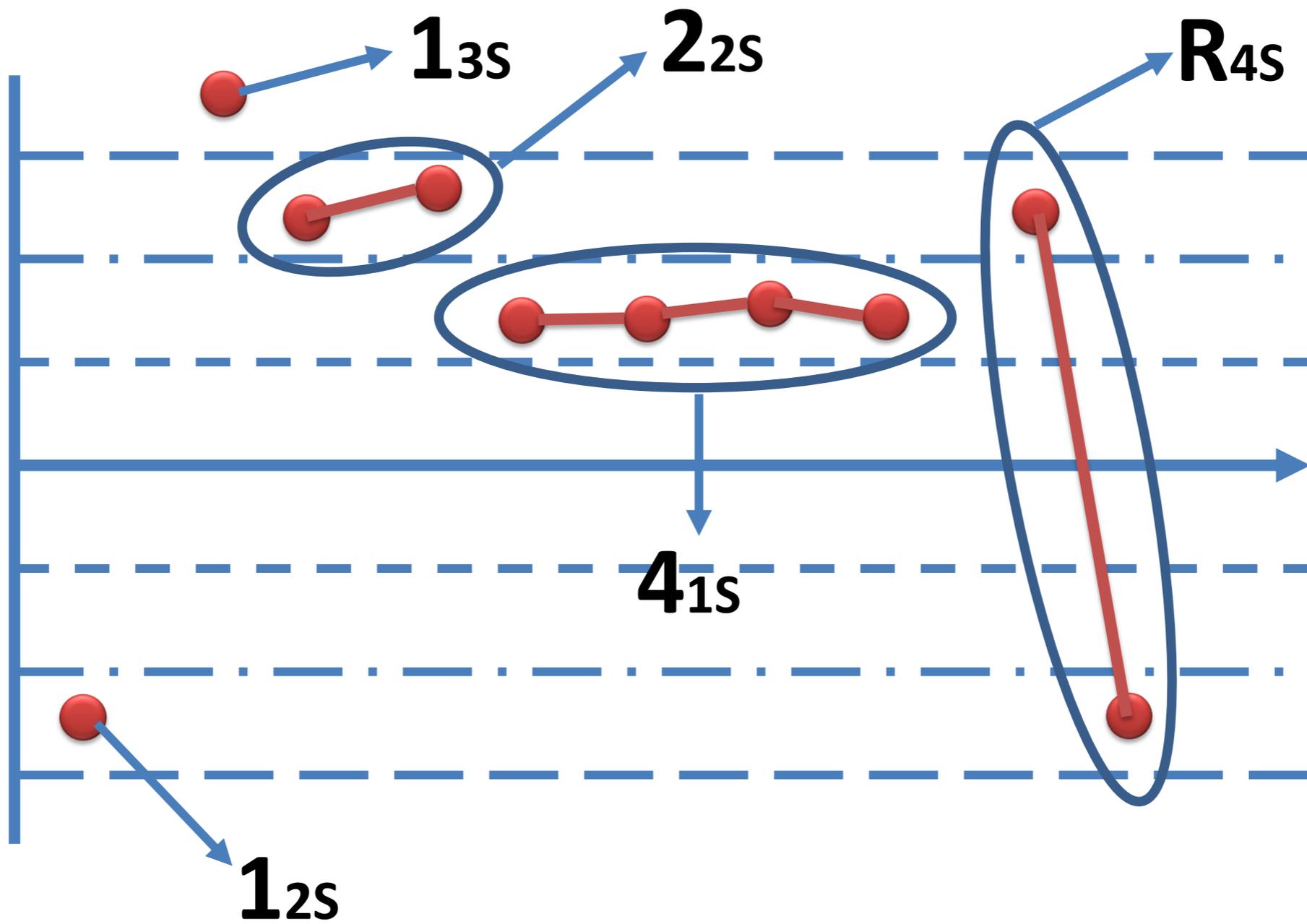
04 Levey-Jennings质控图-质控图参数

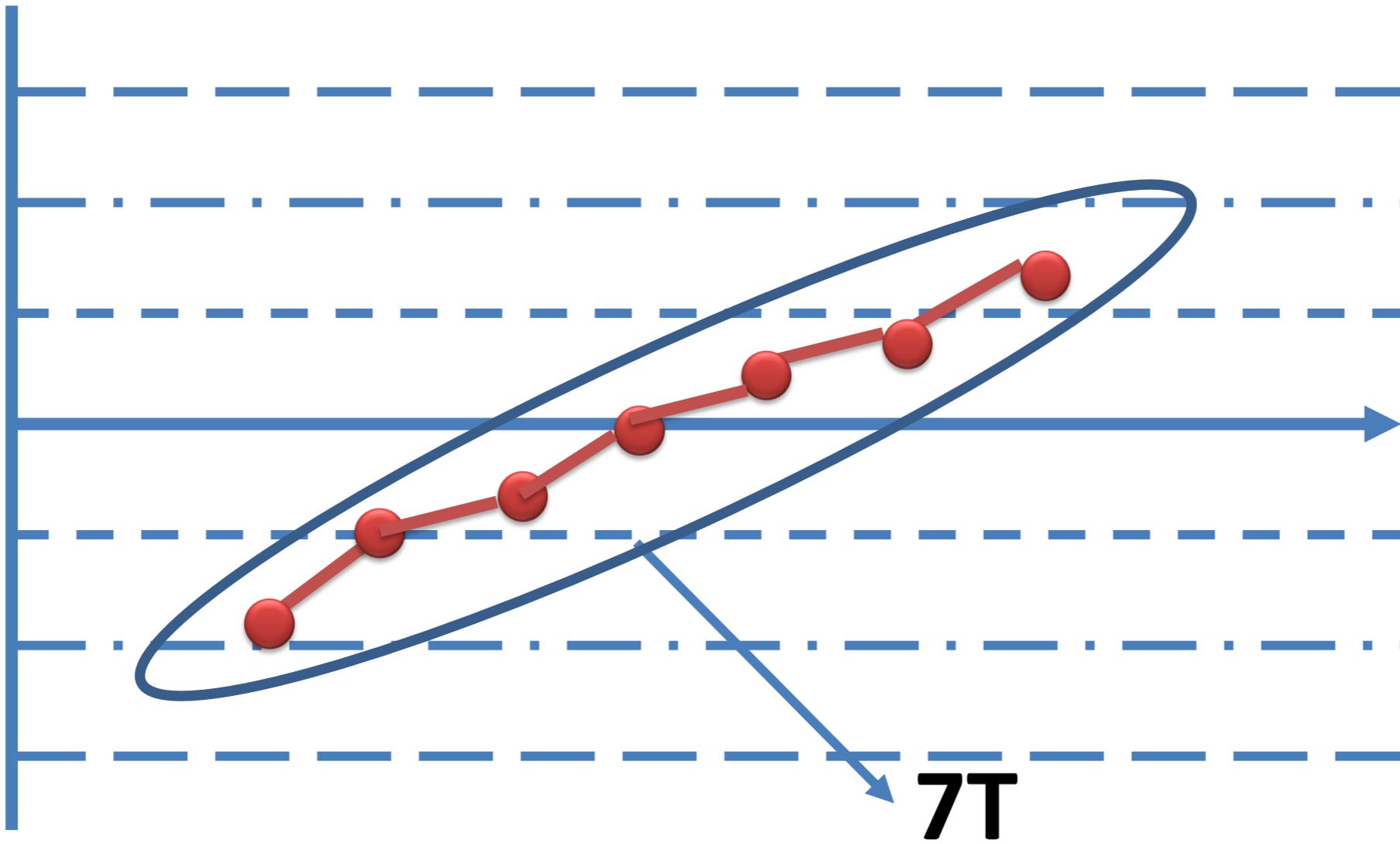
- 外部质控品的均值和标准差应建立在实验室常规使用方法对外部质控品重复测定的基础上。一般采用在不同批次检测取得至少20个数据；如果仅做少量批次的检测，也至少做5个批次的检测，每个批次中不少于4个质控血清测定结果，以建立一个临时性的均值和标准差，当达到20批次数据后，替代临时性的均值和标准差。
- 质控图参数：算数平均值（ \bar{x} ）、标准差（ s ）、变异系数（ cv ）、控制限

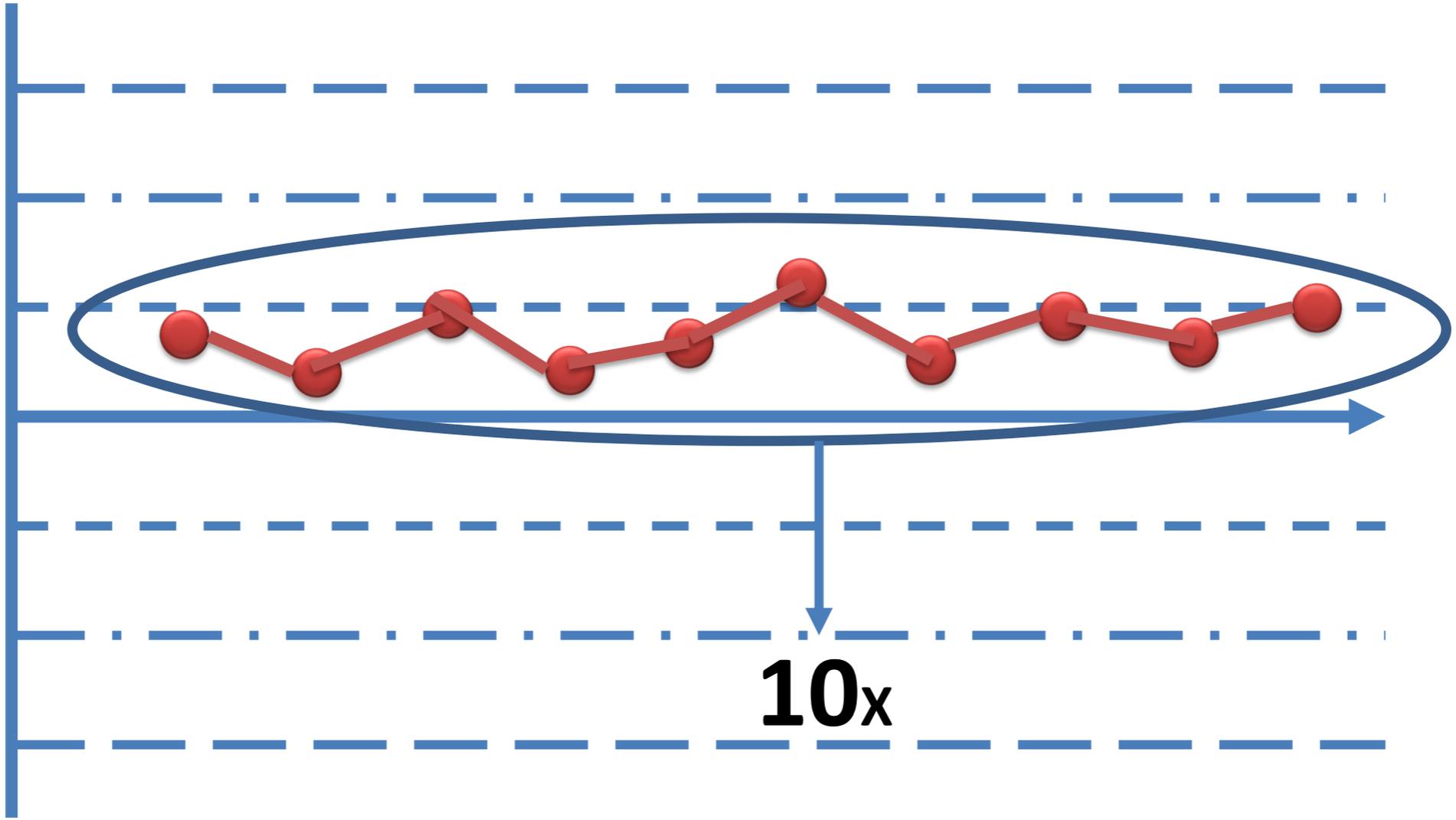


04 Levey-Jennings质控图法-质控规则

- 质控规则：目前有许多质控规则，常用的是 1_{2S} 和 1_{3S} 规则
- 告警（ 1_{2S} ）：当外部质控品的S/CO值超出 $x \pm 2s$ 范围时，系统处于告警状态，应予以注意，是否可以继续检测需要进一步观察。若将 1_{2S} 做失控标准，有较高的假失控概率，所以一般不采用。
- 失控（ 1_{3S} ）：当外部质控品的S/CO值超出 $x \pm 3s$ 范围时，系统处于失控状态，本次实验结果不能被接受，可能是系统误差、随机误差或外部质控品稳定性下降所致。









04 Levey-Jennings质控图法-质控规则

- 12S 提示警告
 - 13S 随机/系统误差
 - 22S 系统误差
 - 41S 系统误差
 - R4S 随机误差
 - 7T 向上或向下的趋势
 - 7x 系统误差
 - 8x 系统误差
 - 9x 系统误差
 - 10x 系统误差
- **位移**：连续几次（7~10次）外部质控品的S/CO值都落在均值的一侧则称为位移，提示实验条件发生了较大的变化。
 - 例如使用新批号的试剂盒、更换实验人员、仪器发生变化或故障（恒温孵育设备、移液器等）
 - **趋势**：连续几次（5~7次）外部质控品的S/CO值几乎按一个方向分布时称为趋势，通常由参数的缓慢改变引起。
 - 例如试剂失效或移液器逐渐不确定



04 Levey-Jennings质控图法-质控规则

- 质控规则的使用应检出随机误差和系统误差，即具有高的检出分析误差的能力，同时应具有较低的假失控概率。考察试验系统的可靠性应采用多规则质控方案，多规则质控方法能提高误差检出，并具有低的假失控概率。其要点为：
 - 出现一次 $2s$ 范围的变化时，系统处于**告警状态**，应予以注意，是否可以继续检测需要进一步观察。
 - 出现下列情况时，应**暂停检测查找原因**：
 - (1) 出现一次超出 $3s$ 范围的变化；
 - (2) 连续两次出现同一方向超出 $2s$ 范围的变化；
 - (3) 连续四次出现同一方向的超出 $1s$ 范围的变化；
 - (4) 连续10次结果都在 $1s$ 范围内，但落在均值线的同一侧。



04 Levey-Jennings质控图法-分析质控图

- 应建立质控图分析及失控情况处理程序。
- 当出现失控时，对原有外部质控品重复测定或更换新的外部质控品进行测定不是最有效的方法，必须找出问题发生的原因，找出解除问题的方法，并消除原因，防止将来出现同样的问题。
- 分析数据时，超过 $2s$ 或 $3s$ 的数据不应删除。
- 由专人负责建立质控图，每月定期召开质控分析会，讨论本月的质控情况。



04 Levey-Jennings质控图法-分析质控图

- 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应重新制作质控图。使用新批号试剂盒必须在质控图上注明。（建议更换批号时对新旧两批试剂盒进行平行试验）
- 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(cv)小于20%，表示外部质控品处于稳定状态

谢 谢 ！