

团 体 标 准

T/SZAS 96—2025

基于聚合酶基因序列的人免疫缺陷病毒 1 型基因型耐药检测技术规范

Technical specification for testing of human immunodeficiency virus
type 1 genotypic drug resistance based on polymerase gene sequence

2025-08-15 发布

2025-09-01 实施

深圳市标准化协会 发 布

目 次

前 言	II
引 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	3
5 样本要求	3
6 核酸提取	3
7 基因扩增	4
8 序列测定	4
9 耐药性分析	5
10 结果解释	5
11 质量控制	5
12 生物安全	6
附录 A（资料性） HIV pol 基因区常用扩增引物	7
附录 B（资料性） Sanger 序列拼接和编辑方法	10
附录 C（资料性） 高通量测序数据分析方法	11
附录 D（资料性） HIV 耐药分析数据库	12
附录 E（资料性） 室内质控品的制备和使用	13
参考文献	14

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心提出。

本文件由粤港澳大湾区标准创新联盟归口。

本文件授权粤港澳大湾区标准创新联盟组织伙伴和所有成员单位使用，联盟组织伙伴需等同采用转化为自身团体标准，并在全国团体标准信息平台上公开标准基本信息。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院、中国科学院微生物研究所、中国医科大学附属第一医院、浙江省疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心、广西壮族自治区疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、湖南省疾病预防控制中心、广州医科大学附属市八医院、香港大学艾滋病研究所、澳门仁伯爵综合医院、澳门卫生局公共卫生化验所、深圳华大智造科技股份有限公司。

本文件主要起草人：邢辉、廖玲洁、李敬云、李林、吴林寰、曹丕、韩晓旭、赵彬、柴程良、张佳峰、辛若雷、梁姝、袁丹、林怡、王绪琴、梁淑家、庞贤武、徐晓琴、贺健梅、邹潇白、兰芸、周润宏、刘利、官建泳、黄江虹、王逸丛、毛宛司、阮玉华、冯毅、郝静静。

本文件为首次发布。

引 言

随着抗逆转录病毒治疗(Antiretroviral Therapy, ART)的推广,接受ART治疗的人免疫缺陷病毒1型(Human Immunodeficiency Virus type 1, HIV-1)感染者人数不断增加。HIV-1具有高度的变异性,在药物压力下易产生耐药基因突变而出现耐药毒株,长期服药难以保持良好的依从性,增加了耐药毒株产生的风险。耐药毒株不仅威胁个体治疗,还可能通过传播削弱公共卫生防控的效果。因此,建立准确、规范的耐药检测技术,是优化治疗方案、遏制耐药毒株扩散的核心环节。基于聚合酶基因序列的基因型耐药检测是目前主要使用的HIV耐药检测方法,检测流程包括样本采集及处理、核酸提取纯化、聚合酶基因片段扩增、测序、序列编辑、耐药突变判读及耐药程度分析等,操作复杂、影响因素多。为了得到准确的检测结果,检测方法、步骤和流程均应规范化和标准化,并采取覆盖检测全过程的质量保证和质量控制措施。本文件旨在规范基于聚合酶基因序列的HIV基因型耐药检测及质量控制方法,以指导相关实验室获得准确的检测结果,为保障ART的效果、药物研发及公共卫生政策制定提供可靠依据,助力实现我国艾滋病预防控制目标。

基于聚合酶基因序列的人免疫缺陷病毒 1 型 基因型耐药检测技术规范

1 范围

本文件规定了基于聚合酶基因序列的HIV-1基因型耐药检测的技术要求，包括样本采集及处理、核酸提取纯化、聚合酶基因片段扩增、测序、序列编辑、耐药突变判读及耐药程度分析、质量控制以及生物安全的要求。

本文件适用于全国各级各类开展基于聚合酶基因序列的HIV-1基因型耐药检测的实验室。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求
GB/T 34265 Sanger法测序技术指南
GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人免疫缺陷病毒 human immunodeficiency virus, HIV

导致艾滋病的病原体。

[来源：WS 293-2019，2.1]

3.2

HIV 耐药 HIV drug resistance

是HIV对抗病毒药物的敏感性降低或消失，导致药物疗效明显下降或失效的现象。

3.3

HIV 耐药基因突变 HIV drug resistance mutation

是导致HIV对药物敏感性降低或消失的基因突变。

3.4

聚合酶基因 polymerase gene

是HIV-1基因组中编码蛋白酶、逆转录酶和整合酶等的基因区，简称*pol*基因区。

3.5

基因型耐药检测 genotypic drug resistance test

通过分析HIV-1基因序列，确定其中是否存在导致耐药的基因突变。

3.6

逆转录聚合酶链反应 reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR

一种分子生物学技术，以RNA为模板逆转录合成DNA，再进行PCR，以扩增特定的基因片段。

3.7

密码子 codon

是存在于信使RNA(mRNA)中的三个连续的核苷酸顺序，是特定氨基酸的编码单位。

3.8

Sanger 法测序 Sanger sequencing

又称双脱氧链末端终止法测序，是一种DNA测序方法，通过在DNA聚合反应中引入荧光标记的四种双脱氧核苷酸(ddNTP)，导致延伸的DNA链被阻断，产生以不同ddNTP结束的四组不同长度的DNA链，电泳分离并测定DNA链末端ddNTP的荧光信号，实现对碱基序列的测定。

3.9

高通量基因测序 high-throughput gene sequencing

区别于Sanger测序，通常指二代测序，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通常一次测序反应能产出不低于100Mb的测序数据。

[来源：GB/T 30989-2014 术语和定义3.19，有修改]

3.10

质量控制 quality control

为确保检测过程符合规定的质量要求而采取的一系列措施和开展的活动。

3.11

质量评价 quality assessment

对检测过程的质量进行评估，以判断其是否满足预期的质量标准或要求。

3.12

质控品 quality control material

用于质量控制的标准物质或样品，通常具有已知的特性或含量，用于验证实验结果的准确性和可靠性。

3.13

混合碱基 mixed base

指基因序列中某个位点同时存在两个或以上不同碱基。

3.14

碱基质量值 base quality score

碱基识别出错的概率的整数映射，用来衡量碱基正确识别的概率。

注：通常以数字值直接表示。

[来源：GB/T 33767.14-2023 术语和定义3.8]

3.15

Q30

指测序数据中,对碱基质量值为30的碱基识别准确率为99.9%,或错误率为0.1%。

[来源: GB/T 40226-2021 术语和定义3.6]

3.16

病毒载量 viral load

血浆(清)中 HIV-1 RNA 的浓度,一般用每毫升血浆(清)中 HIV-1 RNA 的拷贝数或国际单位来表示(copies/ml 或 IUs/ml)。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HIV-1: 人免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus type 1)

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

RT-PCR: 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

PR: 蛋白酶(protease)

RT: 逆转录酶(reverse transcriptase)

IN: 整合酶(integrase)

5 样本要求

5.1 样本类型

常用的样本是血浆,也可使用血清、干血斑、全血或外周血单个核细胞。

5.2 血液样本采集、处理和保存

按照WS 293的规定执行。推荐使用新采集样本,避免反复冻融。

5.2.1 血清

采集静脉血,使用促凝剂,分离血清, -70℃保存。

5.2.2 血浆

采集静脉血,使用乙二胺四乙酸(EDTA)或枸橼酸钠抗凝剂,分离血浆, -70℃保存。

5.2.3 全血

采集静脉血,使用EDTA或枸橼酸钠抗凝, -70℃保存。

5.2.4 外周血单个核细胞

采用密度梯度离心法从全血中分离, -70℃保存。

5.2.5 干血斑

采集指尖血或静脉血,滴于滤纸片上,室温干燥后密封保存。

6 核酸提取纯化

6.1 提取纯化方法

根据样本和核酸类型，选择适宜的方法提取和纯化样本中的病毒核酸，严格按照说明书操作。对于病毒载量 <1000 copies (IUs) /ml的血浆样本，可采用高速低温（2-8℃）离心或其他适宜的方法富集病毒，也可增加平行孔检测，以提高检出率。

6.2 质量评估

可检测核酸浓度和纯度评估核酸质量，使用紫外光光度法检测核酸纯度，A260/280在1.8~2.0纯度较高，能满足后续操作需要的一般认为核酸质量满意。

7 基因扩增

7.1 扩增方法

以提取纯化的病毒核酸为模板，采用RT-PCR或者直接PCR方法扩增HIV-1 *pol*区基因片段，一般结合巢式PCR提高扩增产物量。通过琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。

7.2 引物设计

扩增的目标区域一般应包括蛋白酶区第10至第93位密码子和逆转录酶区第41至第238位密码子，及整合酶区第51至第263位密码子。根据扩增片段两端的碱基序列设计特异性引物。可参照附录A。

7.3 扩增体系和反应

应按照试剂盒说明书或实验室自建方法的标准操作程序配制扩增体系、设置扩增程序，扩增HIV-1 *pol*区基因片段。可参照附录A，扩增程序是根据ABI 9700扩增仪设置，其他仪器可做相应调整。

7.4 质量控制

每批样本扩增均应设置阳性对照、阴性对照和空白对照，与样本同步进行扩增反应，对扩增产物进行电泳检测，确认扩增片段大小。阳性对照扩增出大小正确的目的片段、阴性对照和空白对照无扩增产物，说明扩增反应质量在控。

8 序列测定

8.1 测序方法

8.1.1 Sanger法测序

采用切胶纯化或其他方法纯化扩增产物，使用Sanger法对扩增产物直接测序。

8.1.2 高通量基因测序

将扩增产物进行文库制备，通常包含添加接头、文库扩增（可选）、文库产物纯化和核酸定量、文库产物均一化混合等步骤。然后进行平行循环测序。

8.2 测序区域

应覆盖扩增的目标区域，见7.2。

8.3 序列质量评价

8.3.1 Sanger法测序

根据测序色谱图评价测序质量，合格的序列碱基峰的质量分数应 ≥ 20 ，且长度 ≥ 500 bp。

8.3.2 高通量基因测序

目标序列覆盖度 $\geq 98\%$ ，待测耐药位点应全部覆盖；目标区域平均测序深度 $\geq 200\times$ ，待测耐药位点的测序深度 $\geq 200\times$ ；Q30 $\geq 85\%$ 。

9 耐药性分析

9.1 序列拼接和编辑

9.1.1 Sanger 法测序

将测序序列导入序列拼接软件中,加入标准参考株(HXB2)或其他参考序列,以便序列定位和比对,利用重叠序列进行序列组装和拼接。通过末端剪切、次级峰搜索、混合碱基判读、终止密码子核实等,对序列进行编辑。通过与同批次或同时间段序列的比对并构建系统进化树,分析是否发生了污染。参见附录B。

9.1.2 高通量基因测序

将测序序列进行数据质控,获得高质量的序列,与标准参考株(HXB2)基因组或其他参考序列进行比对,使用生物信息学工具对病毒基因组进行变异检测、组装,获得一致性序列,对检出的变异位点进行注释。参见附录C。

9.2 耐药突变判读

将拼接编辑好的序列提交给特定的HIV耐药分析数据库或者软件,通过与参考序列比对,判读耐药突变。参见附录D。

9.3 耐药程度判读

通过HIV耐药分析数据库判断突变对药物耐受性的影响以及耐药程度。参见附录D。

9.4 结果复核

9.4.1 耐药突变复核

由两名技术人员分别判读耐药突变,如结果不一致,需查看原始数据文件,如Sanger测序的峰图文件、高通量测序的突变位点测序深度及质量文件等,分析差异原因并予以校准。

9.4.2 耐药程度复核

由两名技术人员分别判读,如果结果不一致,需要分析判读结果产生差异的原因,重新判读。

10 结果解释

10.1 报告内容

检测报告应包括以下内容:患者基本信息、样本类型、检测方法、耐药突变、耐药程度、备注与签名、检测日期、检测机构。

10.2 结果解释

检测结果应由经过培训的专业人员解释,并结合患者的临床情况综合判断。

11 质量控制

11.1 预防和消除污染

11.1.1 实验室应合理分区

实验室应设置试剂储存和准备区、样本制备区、扩增区和扩增产物分析区,各区应设置在不同的房间或区域,分别从事特定的操作,物品不能混用,人员和物品应单向流动,即试剂储存和准备区→样本制备区→扩增区→扩增产物分析区。

11.1.2 设置空白对照

设置不含模板的对照，与待测样本同步扩增，如出现扩增条带，说明实验环境或试剂可能已被阳性模板污染，应暂停检测，查找污染来源并消除污染。

11.1.3 发生污染后及时有效处理

可使用去污染试剂擦拭或浸泡、紫外线照射等方法消除污染。在确认污染已彻底清除且所有预防措施已得到有效执行后，方可重新检测。

11.2 使用室内质控品

制备含耐药突变或不含耐药突变的、不同病毒载量的HIV-1阳性质控品，以及HIV阴性质控品，与待测样本同步检测，根据质控品的检测结果，判断检测是否在控，对失控结果及时处理。

11.3 能力验证

可定期参加省级及以上专业机构组织的HIV-1耐药检测室间质量评价或能力验证。

12 生物安全

HIV-1基因型耐药检测（样本处理、核酸提取和扩增）应在卫生主管部门备案的生物安全二级（BSL-2）实验室进行。

实验操作人员应接受生物安全培训，并严格遵守相应的生物安全操作规程。

附 录 A
(资料性)
HIV-1 *pol* 基因区常用扩增引物和 Sanger 测序引物

表 A.1 PR-RT 基因片段扩增和测序引物 1

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对 HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途 及方向
PR-RT 基因 扩增和测序 引物	第一轮 RT-PCR	F1a*	5'- TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT -3'	29	2057-2085	1303	正向
		F1b	5'- ACTGARAGRCAGGCTAATTTTTTAG -3'	25	2068-2092		正向
		RT-R1	5'- ATCCCTGCATAAATCTGACTTGC -3'	23	3370-3348		反向
	第二轮 PCR	PRT-F2	5'- CTTTARCTTCCCTCARATCACTCT -3'	24	2243-2266	1084	正向/测序#
		RT-R2	5'- CTCTGTATGTCATTGACAGTCC -3'	23	3326-3304		反向/测序
	Sanger 测序	SeqF3	5'- AGTCCTATTGARACTGTRCCAG -3'	22	2556-2577		正向
		SeqR4	5'- TACTAGGTATGGTAAATGCAGT -3'	22	2952-2931		反向
		SeqR3	5'-TTTYTCTTCTGTCAATGGCCA-3'	21	2639-2619		反向
		SeqF4	5'-CAGTACTGGATGTGGGRGAYG-3'	21	2869-2889		正向

注：适合HIV-1毒株PR-RT区的扩增和测序。*F1a和F1b混合1:1使用；#用于扩增和测序。

扩增程序：第一轮：50℃ 45分钟；94℃ 2分钟；94℃ 15秒，50℃ 20秒，72℃ 2分钟，35个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温。第二轮：94℃ 4分钟；94℃ 15秒，55℃ 20秒，72℃ 2分钟，30个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温。

表A.2 PR-RT基因片段扩增和测序引物2

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对 HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途 及方向
PR-RT 基因 扩增和测序 引物	第一轮 RT-PCR	MAW26	5'- TTGAAATGTGGAAAGGAAGGAC -3'	23	2028-2050	1512	正向
		RT21	5'- CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG -3'	31	3539-3509		反向
	第二轮 PCR	PRO1	5'- CAGAGCCAACAGCCCCACCA -3'	20	2147-2166	1316	正向
		RT20	5'- CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC -3'	22	3462-3441		反向
	Sanger 测序	PROS3	5'- GCCAACAGCCCCACCA -3'	16	2151-2166		正向
		PRO1*	5'- CAGAGCCAACAGCCCCACCA -3'	20	2147-2166		正向
		RTAS	5'-CTCAGATTGGTTGCAC -3'	16	2524-2539		正向
		RTAS-qian#	5'- GGACCTACACCTGTCAAC -3'	18	2484-2501		正向

表A.2 PR-RT基因片段扩增和测序引物2（续）

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对 HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途 及方向
		RTB	5'-CCTAGTATAAACAATGAGACAC -3'	22	2946-2967		正向
		PROC1S	5'-GCTGGGTGTGGTATTCC -3'	17	2842-2826		反向
		RT20S3	5'-GTTCTAGCTCTGCTTC -3'	16	3456-3441		反向
		RT20-07BC**	5'-CTGCCAATTCTAATTCTGCTTC -3'	22	3462-3441		反向

注：适合HIV-1毒株PR-RT区的扩增和测序。*备用测序引物，替代PROS3，用于CRF07_BC毒株测序；#备用测序引物，替代RTAS，用于B和CRF07_BC毒株测序；**备用测序引物，替代RT20S3，用于CRF07_BC毒株测序。

扩增程序：第一轮：50℃ 30分钟；94℃ 5分钟；94℃ 30秒，55℃ 30秒，72℃ 2.5分钟，35个循环，72℃ 10分钟，4℃ 保温。第二轮：94℃ 5分钟；94℃ 30秒，63℃ 30秒，72℃ 2.5分钟，35个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温。

表A.3 整合酶基因扩增和测序引物1

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对 HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途 及方向
整合酶基因 扩增和测序 引物	第一轮	INF12-1	5'-GGRATYATTCARGCACAACCAG-3'	22	4059 - 4080		正向
	RT-PCR	INF12-2	5'-GCATTAGGRATYATTCARGCAC-3'	22	4053 - 4074	1162	正向
		INR15-1	5'-TGGGATRTGTACTTCYGARCTTA-3'	23	5214-5192		反向
	第二轮	INF09	5'-TCTAYCTGKCATGGGTRCCAGCAC-3'	24	4141 - 4164	948	正向/测序
	PCR	INR18	5'-CATCCTGTCTACYTGCCACAC-3'	21	5088-5068		反向/测序
	Sanger 测序	KVL082	5'-GGVATTCCCTACAATCCCCAAAG-3'	23	4647 - 4669		正向
		KVL083	5'-GAATACTGCCATTGTACTGCTG-3'	23	4772 - 4750		反向

注：适合HIV-1不同亚型毒株的整合酶区扩增和测序。仅供研究使用，如投入商业化用途，需事先取得全体权益方的书面同意。

扩增程序：第一轮：50℃ 45分钟；95℃ 2分钟；95℃ 20秒，50℃ 30秒，72℃ 2分30秒，3个循环；95℃ 15秒，50℃ 20秒，72℃ 2分钟，35个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温。第二轮：95℃ 4分钟；95℃ 20秒，55℃ 30秒，72℃ 2分30秒，3个循环；95℃ 15秒，55℃ 20秒，72℃ 2分钟，35个循环；72℃ 10分钟，4℃ 保温。

表A.4 整合酶基因扩增和测序引物2

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对 HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途 及方向
整合酶基因 扩增和测序 引物	第一轮	F1-IN	5'-TTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGT-3'	31	4174~4204	921	正向
	RT-PCR	R1-IN	5'-AATCCTCATCCTGTCTACTTGCCACACAATC -3'	31	5094-5064		反向

表A.4 整合酶基因扩增和测序引物2（续）

目的 基因	方案 使用	引物 名称	引物序列	引物 长度	相对 HXB2 位置	目的片 段长度	引物用途 及方向
	第二轮	F2-IN	5'- TTTTAGATGGAATAGATAAGGCYCAAGA -3'	28	4231~4258	844	正向/测序
	PCR	R2-IN	5'- GCCACACAATCATCACCTGCCATCTGTTTT-3'	30	5074-5045		反向/测序
Sanger 测序		F2s	5'- TAAGACAGCAGTACAAATGGCAG-3'	23	4745~4767		正向
		F3as	5'- GCTGTCCCTGTAATAAACCCG-3'	21	4919-4899		反向

注：适合HIV-1不同亚型毒株的整合酶区扩增和测序。

扩增程序：第一轮：50 ℃ 30 min；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，35个循环；72 ℃ 10 min，4 ℃ 保温。第二轮：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1.5 min，10个循环；94 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1.5 min，5 s递增，25个循环；72 ℃ 10 min，4 ℃保温。



附 录 B
(资料性)
Sanger 测序序列拼接和编辑方法

B.1 主要流程

包括序列清理、拼接和混合碱基判断，以及序列处理过程中的质量控制。

B.2 序列清理

对测序片段两端较为集中的混合碱基和可信度较低的碱基信号区域进行剪切。

B.3 序列组装

利用序列的重叠区或与标准参考株（HXB2）的序列比对进行序列组装。

B.4 混合碱基判断

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

B.5 核酸污染判断

将同批次或同时间段的待检样本、阳性对照的序列，以及实验室常用毒株的序列进行比对，计算基因距离，如基因距离小于0.5%，且无法确定是否有传播关系，可判定为疑似污染；将上述序列构建系统进化树，如果处于同一分支，基因距离小于0.5%，且无法确定是否有传播关系，也可判定为疑似污染，应全面调查和分析原因，重新检测。

附 录 C
(资料性)
高通量基因测序的序列处理方法

C.1 数据质控

过滤去除含接头或质量低的序列（如 Q 值 <15 的碱基占比超过 40%，序列中 N 碱基出现次数超过 5 次）和宿主基因组的序列，截取指定长度的序列，获得高质量序列。

C.2 序列比对

将高质量序列与HIV-1标准参考株(HXB2)或其他参考序列进行比对，计算HIV-1序列的占比。

C.3 核苷酸突变检测

根据比对的bam文件提取目标基因区的变异位点，对不符合质控要求的变异位点（测序深度 $<200\times$ ）进行过滤，输出所有频率 $\geq 5\%$ 的突变。其中，频率 $\geq 20\%$ 的突变与sanger测序结果一致，频率5%-20%的突变为高通量基因测序方法检出的低频突变。

C.4 序列组装

包括有参组装和无参组装两种序列组装的策略，分别利用参考基因组指导和自主从头拼接的方式组装，确保基因组序列准确和完整地覆盖主要耐药突变区域。

C.4.1 一致性序列有参组装

基于突变检测中的结果，设定碱基比例20%为检出阈值，将每个位点的碱基按照HIV-1参考基因组上的位置排列，获得一致性序列。

C.4.2 从头 (de novo) 组装

将比对到HIV-1测序区域的序列提取出来，根据序列之间重叠区域对序列片段进行拼接、延伸，最终获得较完整的序列。

附录 D
(资料性)
HIV-1 耐药突变判读和耐药程度分析方法

D.1 HIV耐药分析数据库

目前常用的HIV耐药分析数据库包括中国艾滋病病毒基因序列数据平台耐药分析数据库 (<https://nmhc.cn>)、美国斯坦福大学HIV耐药数据库 (<http://hivdb.stanford.edu>)，以及一些专业化HIV耐药分析软件，均可通过对HIV-1 pol 区基因序列的分析，判断病毒有无耐药基因突变及对主要抗病毒药物的耐药程度。

D.2 HIV-1耐药突变判读

D.2.1 基于Sanger测序的 pol 区序列

在序列拼接和编辑后，将 pol 基因片段的核苷酸序列提交给特定的HIV耐药分析数据库或者软件，根据提示操作，通过与参考序列比对，判读耐药突变。与标准株（通常为HXB2）的氨基酸进行比对，以“标准株的氨基酸-氨基酸位置-突变后氨基酸”来表示突变，如K103N为RT区第103位氨基酸由赖氨酸（K）突变为天冬酰胺（N）。

D.2.2 基于高通量基因测序

在核苷酸突变检测后，提交给特定的HIV耐药分析数据库或者软件，通过与参考序列比对，判读耐药突变，并提供突变的频率与深度的数据。

D.3 HIV耐药程度分析

D.3.1 基于中国艾滋病病毒基因序列数据平台耐药分析数据库（NMDC）

通过HIV耐药分析系统（HIVdrA）的在线软件提交HIV基因序列，判断是否耐药；也可通过HIV耐药程度评估系统（HIVdrE）在线软件评价耐药程度，分为“敏感”、“中度耐药”和“高度耐药”。

D.3.2 基于美国斯坦福大学HIV耐药分析数据库（HIVDB）

可通过HIVdb在线工具提交HIV基因序列，分析HIV耐药程度，包括敏感、潜在低度耐药、低度耐药、中度耐药和高度耐药。

附录 E (资料性) 室内质控品的制备和使用

E.1 阳性对照制备和要求

E.1.1 制备材料

制备血浆样本阳性对照, 首选HIV感染者血浆, 也可使用HIV阴性人血浆稀释的HIV毒株培养上清液, 或者使用HIV阴性人血浆稀释的人工制备的重组病毒、假病毒或质粒。

制备干血斑样本的阳性对照, 首选HIV感染者的全血, 也可用HIV阴性人全血稀释HIV毒株培养上清液。

E.1.2 主要技术指标

应包括我国主要HIV-1流行亚型(CRF01_AE和CRF07_BC等)或当地流行亚型。

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。

可设定3~4个不同的病毒载量水平, 其中应包括检测限附近的水平(1000 copies(IUs)/ml)。

对这些技术指标应至少检测3次, 准确鉴定HIV-1基因亚型、耐药基因突变和病毒载量。

E.2 阴性对照的制备和要求

E.2.1 制备材料

制备血浆样本的阴性对照, 应使用HIV核酸阴性人血浆。

制备干血斑样本的阴性对照, 应使用HIV核酸阴性人全血。

E.3 质控品的使用

E.3.1 使用时机和数量

从核酸提取纯化开始, 将质控品随机排布到待检样品板中, 每批次均加入阳性对照和阴性对照, 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。质控品与待检样本同步操作, 直到完成耐药突变检测和耐药解释, 从而实现对检测全程的监控。

进行RT-PCR时, 应增加由去离子水代替模板的空白对照, 用于监控实验室污染。

E.3.2 阳性对照的使用

阳性对照应为我 国或当地主要流行基因亚型的毒株, 含有预计在待检人群中流行率较高的耐药突变。预计实验室的技术水平较低时, 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可使用低水平病毒载量的阳性对照; 每批次均应使用阳性对照, 有条件的实验室可适当增加阳性对照的数量。

E.3.3 阴性对照的使用

每批次均加入阴性对照, 预计实验室污染风险较高时, 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, 随机加入待检样本中。

参 考 文 献

- [1] 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)
 - [2] 中国疾病预防控制中心, 全国艾滋病检测实验室质量控制指南 (2024 版)
 - [3] Stanford University HIV Drug Resistance Database. <https://hivdb.stanford.edu/>
 - [4] WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens, third edition. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 - [5] WHO HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework, second edition. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 - [6] HIV drug resistance: brief report 2024. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 - [7] 卫生部. 2010. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法〔卫办医政发 (2010) 194 号〕.
 - [8] Inzaule S, Yang C, Kasembeli A, Nafisa L, Okonji J, Oyaro B, et al. Field evaluation of a broadly sensitive HIV-1 in-house genotyping assay for use with both plasma and dried blood spot specimens in a resource-limited country. J Clin Microbiol. 2013, 51(2):529-539.
 - [9] 宋畅, 周佳佳, 董敖渤, 康瑞华, 阮玉华, 邵一鸣, 冯毅, 廖玲洁, 邢辉. 2018 年我国部分省份抗病毒治疗前 HIV-1 整合酶抑制剂耐药流行情况. 中国艾滋病性病. 2021, 27(4):348-351
 - [10] 王绪琴, 林倩茹, 冯琬清, 董原, 郁晓磊, 刘长河, 宁镇, 沈鑫, 潘启超, 林怡. HIV-1 整合酶基因序列分析方法验证. 检验医学. 2024, 39(4):369-375
-