

团 体 标 准

T/CPMA ×××—××××

病原微生物菌（毒）种标准株 艾滋病病毒 毒株建立技术规范

Standard strains of pathogenic microorganism—technical specification for
establishment of HIV strains

（征求意见稿）

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华预防医学会 发布

目 次

前言	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 样本要求.....	3
5 分离培养和滴定要求.....	3
6 鉴定要求.....	3
7 评价要求.....	4
8 信息要求.....	4
9 保藏要求.....	5
10 质量控制和生物安全要求.....	5
附录 A（规范性）HIV 毒株分离鉴定技术.....	6
附录 B（资料性）HIV 标准株信息描述示例.....	9
参考文献.....	11

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。

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。

本文件由中华预防医学会归口。

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微生物流行病学研究所、中国医科大学、首都医科大学附属北京佑安医院、中国疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：。

征求意见稿

病原微生物菌（毒）种标准株 艾滋病病毒 毒株建立技术规范

1 范围

本文件规定了艾滋病病毒标准株分离培养、滴定、鉴定、评价、保藏、信息，以及质量控制和生物安全的要求。

本文件适用于全国各级病原微生物菌（毒）种保藏机构，以及使用艾滋病病毒株开展相关检测和研究活动的疾控、临床、科研、教学、生产研发等机构。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是标注日期的引用文件，仅所标注日期的版本适用于本文件。凡是不标注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改版本）适用于本文件。

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T37864-2019/ISO 20387:2018 生物样本库质量和能力通用要求

WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

WS 315 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术规范

T/CPMA 011-2020 病原微生物菌（毒）种保藏数据描述通则

3 术语与定义

WS 293 和 WS315 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

艾滋病病毒 human immunodeficiency virus; HIV

导致艾滋病的病原体，即人免疫缺陷病毒。

[来源：WS 293-2019，2.1]

3.2

毒株 virus strains

可在体外培养、具有保存价值、经鉴定和分类并给予固定编号的病毒。

3.3

HIV标准株 HIV standard strains

具有HIV典型生物学特征，遗传学特性得到确认和保证、可追溯，且具有HIV型及亚型的代表性，由保藏机构复核、鉴定，并给予固定编号的HIV毒株。以下简称标准株。

3.4

HIV耐药株 HIV drug resistant strains

携带HIV耐药基因突变、对抗反转录病毒药物具有耐受性的HIV毒株。以下简称耐药株。

3.5

病毒滴度 virus titer

病毒的毒力,以病毒的50%组织培养感染剂量(50% Tissue Culture Infectious Dose, TCID₅₀)表示,指在一定时间内能够使50%细胞感染的病毒剂量。

3.6

病毒载量 viral load

血浆(清)中HIV RNA的数量,是HIV核酸定量检测的指标,用每毫升(mL)血浆(清)中HIV RNA的拷贝数(copies, CPs)或国际单位(IUs)来表示(CPs/mL或IUs/mL)。

3.7

p24抗原 p24 antigen

HIV-1的核心蛋白。在HIV-1分离培养和体外扩增时,检测培养上清液中p24抗原的浓度可监测病毒复制情况。

3.8

全长基因序列 full-length genome sequence

约9700bp的HIV全长核苷酸序列。

3.9

保藏 preservation

保藏机构依法以适当的方式收集、检定、编目、储存菌(毒)种或样本,维持其活性和生物学特性,并向合法从事病原微生物相关实验活动的实验室提供菌(毒)种或样本的活动。

[来源: WS315, 3.2]

3.10

保藏机构 preservation organization

按照规定接收、集中储存与管理毒株,并能向合法从事病原微生物相关实验活动的实验室供应菌(毒)种或样本的机构。

3.11

病毒嗜性 virus tropism

HIV与宿主CD4⁺T细胞表面的辅助受体选择性结合的生物学特性，HIV可与CCR5辅助受体(R5嗜性)、或CXCR4辅助受体(X4嗜性)、或这两种辅助受体(双嗜性)结合。

3.12

融合诱导 syncytia inducing

HIV感染过程中，被感染的数个细胞可融合在一起形成大的合胞体。根据是否出现合胞体，将HIV分为融合诱导型(SI)和非融合诱导型(non syncytia inducing, NSI)。

4 样本要求

新鲜全血、血浆、外周血单核细胞(PBMCs)、脑脊液等用于HIV分离培养，应无菌采集。病毒分离培养上清液用于病毒扩增、滴定及基因型、表型、耐药位点等检测。

5 分离培养和滴定要求

5.1 分离培养

应采用HIV阴性健康人的PBMCs与HIV感染者的PBMCs或其他类型样本共培养的方法分离毒株。检测培养上清液的p24抗原浓度，判断分离培养是否成功。检测方法见附录A.1。

5.2 扩增培养

应使用待扩增的培养上清液接种健康人PBMCs扩大培养，培养上清液的p24抗原浓度达到1ng/mL以上时，扩增培养成功。也可采用T细胞系扩增培养。

5.3 病毒滴定

应采用终点稀释法测定HIV的感染性滴度。

6 鉴定要求

6.1 基因型鉴定

6.1.1 应对HIV的3个基因片段(*gag*、*pol*和*env*)或近似全长基因组进行扩增测序。检测方法见附录A.2。

6.1.2 测得的病毒基因序列与参考序列比对，判断基因型和基因重组。

6.1.3 测得的病毒基因序列与耐药株参考序列比对，确定耐药位点。

6.2 表型鉴定

6.2.1 嗜性鉴定

病毒培养上清液接种表达CCR5和/或CXCR4的细胞, 监测病毒感染和复制, 判断病毒嗜性。检测方法见附录A.3.3.1。

6.2.2 SI表型鉴定

病毒培养上清液接种MT2细胞, 观察合胞体的形成, 判断是否为SI表型。检测方法见附录A.3.3.2。

6.2.3 耐药表型鉴定

含有耐药位点的病毒培养上清液接种易感细胞, 培养基中加入系列稀释的抗反转录病毒药物, 通过测定药物对病毒的50%抑制浓度及其与野生型病毒相比增加的倍数, 判断耐药表型。

7 评价要求

7.1 活性

7.1.1 经两家独立实验室验证, 至少连续传3代, 可稳定复制。

7.1.2 病毒滴度应不低于 10^5 TCID₅₀/mL。

7.2 稳定性

7.2.1 传代培养过程中应保持培养条件不变。培养细胞应使用HIV易感的原代细胞或细胞系; 培养基应包括胎牛血清、抗生素等, 支持易感细胞或细胞系的高效生长; 培养环境应保持温度 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, CO₂浓度 $5\% \pm 0.1\%$, 相对湿度 $93\% \pm 2.5\%$ 。

7.2.2 不同代次间的基因型应稳定, 至少测定*gag*、*pol*和*env* 3个基因区或全长基因序列。

7.2.3 耐药株的耐药位点和耐药表型应稳定。

7.2.4 病毒嗜性和融合诱导表型应稳定。

8 信息要求

8.1 信息应完整, 包括基本信息、基物信息、特征信息、保存单位联系信息等。

8.2 特征信息应明确, 包含p24抗原浓度、病毒滴度、基因型、耐药基因型、病毒嗜性表型等。可附全长基因序列。

8.3 传代信息应明确, 包括培养代次、周期和各代次收集时间等。

8.4 如曾使用该毒株进行研究，宜提供包括目的、方法和结果等信息。

8.5 信息描述应符合T/CPMA 011-2020。HIV标准株信息描述示例参见附录B。

9 保藏要求

9.1 应备份保藏。宜在不同地点、设备或以不同方法保存。

9.2 应在液氮或-150℃超低温冷冻保藏，对保藏设备及环境条件进行温度监控和记录。

9.3 标准株应有唯一编码，保藏位置明确。样本管标签应在长期超低温保藏条件下保持牢固和清晰。

9.4 转移标准株应执行保藏转移程序。宜减少转移次数，避免反复冻融。

9.5 应建立保藏信息系统，保藏、使用、库存、销毁等信息应清晰、可追溯。

10 质量控制和生物安全要求

10.1 分离培养、滴定、表型鉴定等活病毒操作应在生物安全三级实验室开展；抗原检测、病毒载量测定、基因序列测定等在生物安全二级实验室开展。所有操作应符合 GB 19489-2008。

10.2 标准株的建立、制备、保存、运输、分发等环节应可溯源，参照 GB/T37864-2019 执行。实验室安全防护和质量保证参照《全国艾滋病检测技术规范（2020年修订版）》执行。

10.3 分离培养、鉴定等关键技术方法应经过确认和验证，并制定标准操作程序。

10.4 相关的检测方法宜参加能力验证或室间比对。

附录 A
(规范性)
HIV 毒株分离鉴定技术

A. 1 HIV 毒株分离培养与滴定

A. 1.1 样本

分离培养首选 HIV 感染者的 PBMCs，也可使用新鲜抗凝全血、血浆、脑脊液、精液以及其他体液。滴定一般使用病毒培养上清液。

A. 1.2 试剂

主要包括淋巴细胞分离液、细胞培养液 RPMI1640、胎牛血清、青霉素和链霉素、白细胞介素 2、植物血凝素、HIV-1 p24 抗原检测试剂等。

A. 1.3 实验方法

分离培养 HIV 毒株采用健康人 PBMCs 作为培养细胞，也可使用其他易感细胞系。将感染者样本与培养细胞共培养 2 周~4 周后，采用酶联免疫吸附实验检测 HIV-1 p24 抗原浓度，终点稀释法测定 HIV 的感染性滴度。

A. 1.4 结果判定

A. 1.4.1 病毒培养上清液的 HIV-1 p24 抗原连续 2 次呈阳性反应，且 p24 抗原浓度升高，可判断为分离培养成功。

A. 1.4.2 病毒培养上清液的 HIV-1 p24 抗原浓度达到 1ng/mL 以上，可进行分装、编号、冻存。

A. 1.4.3 将样本系列稀释后感染健康人 PBMCs 或其他易感细胞系，培养并观察细胞病变，测定 HIV-1 p24 抗原浓度，计算病毒滴度。

A. 1.5 质量控制

应设立不加入感染性样本的阴性对照和加入已知毒株的阳性对照。

A. 2 HIV 毒株基因型鉴定

A. 2.1 样本

HIV 病毒培养上清液。

A. 2. 2 试剂和设备

主要试剂包括核酸提取试剂、PCR 扩增试剂、HIV 3 个基因片段 (*gag*、*pol* 和 *env*) 的引物和探针、DNA 测序试剂等。主要设备包括 PCR 扩增设备、电泳设备、测序设备等。

A. 2. 3 实验方法

A. 2. 3. 1 提取病毒RNA, 进行逆转录反应合成cDNA, 对三个基因片段 *gag*、*pol* 和 *env* 进行PCR扩增。

A. 2. 3. 2 对PCR扩增产物进行DNA测序, 将测得的病毒基因序列进行清理和拼接。

A. 2. 3. 3 分析近似全长基因序列发现可能存在的基因重组。

A. 2. 3. 4 对 *pol* 基因序列分析时可关注耐药位点。

A. 2. 4 结果判定

使用权威机构数据库进行基因序列比对, 通过基因遗传距离分析鉴定毒株的基因型。

A. 2. 5 质量控制

应使用已知基因亚型的毒株作为阳性对照。

A. 3 HIV 毒株嗜性和融合诱导特性鉴定

A. 3. 1 样本

HIV 病毒培养上清液 (HIV-1 p24 抗原浓度在 1ng/mL 以上)。

A. 3. 2 细胞、试剂和设备

主要包括 GHOST 细胞、MT2 细胞、细胞培养液、胎牛血清、青霉素和链霉素、L-谷氨酰胺、胰酶等。设备主要使用倒置显微镜、二氧化碳孵箱和流式细胞仪。

A. 3. 3 实验方法

A. 3. 3. 1 嗜性测定

病毒培养上清液加入表达 CCR5 和/或 CXCR4 的 GHOST 细胞, 培养 48 小时后, 检测细胞的绿色荧光蛋白 (GFP)。

A. 3. 3. 2 融合诱导表型测定

病毒培养上清液加入 MT2 细胞培养，连续 2 周~3 周显微镜下观察 MT2 细胞融合现象。

A. 3. 4 结果判定

A. 3. 4. 1. 嗜性测定

病毒感染的 GHOST 细胞与阴性对照相比，GFP 荧光变化大于 5 倍时，可判定为阳性。感染 CCR5 细胞阳性的病毒是 CCR5 嗜性，感染 CXCR4 细胞阳性的病毒是 CXCR4 嗜性，两种细胞均为阳性，则为双嗜性病毒。

A. 3. 4. 2. 融合诱导表型测定

每个培养孔出现 6 个~10 个“空泡”或细胞融合体时，毒株为融合诱导型；培养孔中未观测到细胞融合现象，毒株为非融合诱导型。

A. 3. 5 质量控制

应使用已知嗜性和融合诱导表型的毒株作为阳性对照。

附录 B

(资料性)

HIV 标准株信息描述示例

HIV 标准株信息描述示例见表 B. 1。

表 B. 1 HIV 标准株信息描述示例

信息		说明或示例	
基本信息	中文名称 ^a	艾滋病病毒标准株	
	英文名称 ^a	HIV standard strain	
	资源库编号	NPRC 2021.01001	
	毒株保藏编号	CHPC 2021.01001	
	原始编号 ^a	304379	
	数量和体积 ^a	1mL/支, 2支	
	毒株来源历史 ^a	←中国疾病预防控制中心病原微生物菌(毒)种保藏中心← 中国医科大学艾滋病研究所	
	保藏时间	2021-06-01	
	分离时间 ^a	2020-08-17	
	分离地址 ^a	中国辽宁省沈阳市和平区	
	分离基物 ^a	HIV 感染者 PBMCs	
基物信息	样本描述 ^a	HIV 感染者全血	
	样本采集时间 ^a	2020-5-19	
	样本采集地址 ^a	中国辽宁省沈阳市和平区	
	HIV 感染者 / 艾滋病患 者信息	性别 ^a	男
		年龄 ^a	30
		临床分期	I 期(无症状期)
		感染途径 ^a	男男同性传播
		诊断时间 ^a	2020-5-19
		治疗情况 ^a	样本采集时未治疗
检测情况		CD4 绝对计数: 377 个/ μ L 病毒载量: 66900CPs/mL	
特征 信息		p24 抗原浓度 ^a	10000pg/mL
	病毒滴度 ^a	10^5 TCID ₅₀ /mL	
	传代信息 ^a	第 2 代, 培养第 11 天收集	
	基因型 ^a	CRF01_AE	
	用于基因型鉴定的 基因片段 ^a	3 个基因片段 (<i>env</i> , <i>gag</i> 和 <i>pol</i>)	
	全长基因序列	无	
	耐药基因型 ^a	无耐药位点(参考斯坦福耐药数据库)	

		https://hivdb.stanford.edu/, 2020 年)
	耐药表型	对 AZT、d4T、ddI 、3TC 和 EFV 均敏感
	融合诱导表型	非融合诱导型 (NSI)
	病毒嗜性表型 ^a	CCR5
保存单位 联系信息 ^a	联系人	张 XX
	联系电话	024-XXXXXXXX
	联系人邮箱	XXXX
	联系人所在单位	中国医科大学艾滋病研究所
^a 必要信息，其余为非必要信息。		

征求意见稿

参考文献

- [1] 中华人民共和国生物安全法（中华人民共和国主席令第 56 号）.
- [2] 病原微生物实验室生物安全管理条例（中华人民共和国国务院令第 424 号）.
- [3] 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构管理办法（中华人民共和国卫生部令第 68 号）.
- [4] 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（中华人民共和国卫生部卫计委令第 45 号）.
- [5] 人间传染的病原微生物名录（卫科教发 [2006] 15 号）.
- [6] 中国艾滋病诊疗指南(2018 版).
- [7] 全国艾滋病检测技术规范(2020 年修订版)
- [8] Berg MG, Yamaguchi J, Alessandri-Gradt E, et al. A pan-HIV strategy for complete genome sequencing[J].Journal of clinical microbiology,2016, 54(4):868–882.
- [9] Li G, Piampongsant S, Faria NR, et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective[J]. Retrovirology 2015,12: 1-18.