

团 体 标 准

T/CPMA 027—2023

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

2023 - 02 - 02 发布

2023 - 02 - 02 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	2
5 分离培养和滴定要求	2
5.1 分离培养	2
5.2 扩增培养	2
5.3 病毒滴定	2
6 鉴定要求	2
6.1 基因型鉴定	2
6.2 表型鉴定	3
7 评价要求	3
7.1 基本要求	3
7.2 活性	3
7.3 稳定性	3
8 信息要求	3
9 保藏要求	3
10 质量控制和生物安全要求	4
附录 A（规范性） HIV 毒株分离鉴定技术	5
A.1 HIV 毒株分离培养与滴定	5
A.2 HIV 毒株基因型鉴定	5
A.3 HIV 毒株嗜性和合胞体诱导特性鉴定	6
附录 B（规范性） HIV 标准株信息描述	7
参考文献	9

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、中国医科大学附属第一医院、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：马春涛、金聪、李敬云、耿文清、马丽英、任莉、崔华露、黄晓婕、魏强、蒋岩、吴昊。

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

本文件规定了建立艾滋病病毒标准株的样本、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，其他艾滋病病毒株研究、教学、检测、诊断等相关活动的机构可参照执行。

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—2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 37864—2019 生物样本库质量和能力通用要求（ISO 20387：2018，IDT）

WS 293—2019 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

WS 315—2010 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术规范

WS/T 812—2022 病原微生物菌（毒）种国家标准株评价技术标准

T/CPMA 011—2020 病原微生物菌（毒）种保藏数据描述通则

3 术语和定义

WS 293—2019和WS 315—2010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

人免疫缺陷病毒

导致艾滋病的病原体。

[来源：WS 293—2019，2.1]

3.2

毒株 virus strains

可在体外培养、具有保藏价值、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 titres

单位体积中感染性病毒的数量。

注：以病毒的50%组织培养感染剂量（50% Tissue Culture Infectious Dose, TCID₅₀）表示。

3.6

病毒载量 viral load

血浆（清）中HIV RNA的数量。

注：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。

注：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 genomic sequence

约9700bp的HIV全长核苷酸序列。

3.9

保藏 preservation

保藏机构（3.10）以适当的方式收集、鉴定、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单位提供菌（毒）种或样本的活动。

[来源：WS 315—2010，3.2，有修改]

3.10

保藏机构 preservation organization

由国家卫生健康委员会指定的，承担人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏任务的国家病原微生物保藏中心、国家病原微生物保藏中心分中心和专业实验室。

[来源：WS 315—2010，3.3，有修改]

3.11

病毒嗜性 virus tropism

HIV与宿主CD4+T细胞表面的CCR5或CXCR4辅助受体选择性结合的生物学特性。

3.12

合胞体诱导 syncytia inducing; SI

HIV感染导致细胞融合形成合胞体的过程。

4 样本要求

新鲜抗凝全血、血浆、外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells, PBMC）、脑脊液、精液等用于HIV分离培养，应无菌采集。病毒分离培养上清液用于HIV扩增、滴定、基因型及重组、表型、耐药表型鉴定等检测。

5 分离培养和滴定要求

5.1 分离培养

分离毒株应采用HIV阴性健康人的PBMC与HIV感染者的PBMC或其他类型样本共培养的方法。检测培养上清液的p24抗原浓度，判断分离培养是否成功。检测应符合A.1的规定。

5.2 扩增培养

扩增培养应使用待扩增的培养上清液接种健康人PBMC，培养上清液的p24抗原浓度达到1ng/mL以上时，为扩增培养成功。

5.3 病毒滴定

测定HIV的感染性滴度应采用终点稀释法。

6 鉴定要求

6.1 基因型鉴定

6.1.1 鉴定基因型应对HIV的3个基因片段（*gag*、*pol*和*env*）或近似全长基因进行扩增测序。检测应符合A.2的规定。

6.1.2 根据病毒基因序列判断基因型、基因重组和耐药位点。

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。检测应符合A.3.3.1的规定。

6.2.2 合胞体诱导鉴定

病毒培养上清液接种MT-2细胞，观察合胞体的形成，判断是否为SI表型。检测应符合A.3.3.2的规定。

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 基本要求

7.1.1 标准株的评价基本要求应符合 WS/T 812—2022。

7.1.2 标准株的活性和稳定性评价应经至少两家独立实验室验证。

7.2 活性

7.2.1 至少连续传3代，可稳定复制。

7.2.2 病毒滴度应不低于 10^5 TCID₅₀/mL。

7.3 稳定性

7.3.1 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，CO₂浓度 $5\% \pm 0.1\%$ ，相对湿度 $93\% \pm 2.5\%$ 。

7.3.2 不同代次间的基因型应稳定，经测定和分析 *gag*、*pol* 和 *env3* 个基因区或全长基因序列，基因型结果一致。

7.3.3 不同代次间耐药株的耐药位点和耐药表型应稳定，耐药位点稳定存在，药物对病毒的50%抑制浓度无显著统计学差异。

7.3.4 不同代次间的病毒嗜性和合胞体诱导表型应稳定，鉴定结果一致。

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。

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，应提供包括目的、方法和结果等信息。

8.5 信息描述应符合 T/CPMA 011—2020。HIV 标准株信息描述按照附录 B 执行。

9 保藏要求

9.1 标准株应在不同地点、设备或以不同方法备份保藏。

9.2 应在液氮或 -140°C 以下深低温冷冻保藏，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深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机构的转移程序。应减少转移次数和冻融次数。

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、病毒载量测定等在生物安全二级实验室开展。实验操作应符合 GB 19489—2008，实验活动所需生物安全实验室级别和运输包装分类见《人间传染的病原微生物名录》。

注：2006 版中的艾滋病毒即本文件中的艾滋病病毒。

10.2 标准株的建立、制备、保存、运输、分发等环节应可溯源，按照 GB/T 37864—2019 执行。实验室安全防护和质量保证见《全国艾滋病检测技术规范（2020 年修订版）》。

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 相关的检测方法应参加权威机构组织的能力验证或实验室间比对。

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PBMC，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 试剂和设备

主要试剂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。主要设备包括CO₂培养箱、离心机、酶标仪、显微镜、生物安全柜等。

A.1.3 实验方法

分离培养HIV毒株采用健康人PBMC作为培养细胞。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 1 ng/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 PBMC 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

病毒分离培养过程中应设立阴性对照，宜设立阳性对照。

A.2 HIV 毒株基因型鉴定

A.2.1 样本

HIV病毒培养上清液（见A.1.4.2）。

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扩增仪、电泳仪、测序仪等。

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毒株的序列作为参考序列。

A.3 HIV 毒株嗜性和合胞体诱导特性鉴定

A.3.1 样本

HIV病毒培养上清液（见A.1.4.2）。

A.3.2 试剂和设备

主要试剂包括细胞培养液、胎牛血清、青霉素和链霉素、L-谷氨酰胺、胰酶等。主要设备包括倒置显微镜、CO₂培养箱和流式细胞仪。

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 h后，检测细胞的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）。

A.3.3.2 合胞体诱导测定

病毒培养上清液加入MT-2细胞培养，连续2周~3周显微镜下观察MT-2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 合胞体诱导测定

在每个培养孔观测到“空泡”或细胞融合体，为合胞体诱导型毒株；培养孔中未观测到细胞融合现象，为非合胞体诱导（non syncytia inducing, NSI）型毒株。

A.3.5 质量控制

应使用已知嗜性和合胞体诱导表型的毒株作为阳性对照。

附 录 B
(规范性)
HIV 标准株信息描述

HIV标准株信息描述见表B.1。

表 B.1 HIV 标准株信息描述

信息		内容	示例 ^a	
基本信息	中文名称 ^b		艾滋病病毒标准株	
	英文名称 ^b		HIV standard strain	
	资源库编号		NPRC 2021.01001	
	毒株保藏编号		CHPC 2021.01001	
	原始编号 ^b		304379	
	数量和体积 ^b		1mL/支, 2支	
	毒株来源历史 ^b		←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 ^b		2020-08-17	
	分离地址 ^b		中国辽宁省沈阳市和平区	
分离基物 ^b		HIV 感染者 PBMC		
基物信息	样本描述 ^b		HIV 感染者全血	
	样本采集时间 ^b		2020-5-19	
	样本采集地址 ^b		中国辽宁省沈阳市和平区	
	HIV 感 染者/ 艾滋病 患者信 息	性别 ^b		男
		年龄 ^b		30
		临床分期		I 期(无症状期)
		感染途径 ^b		男男同性传播
		诊断时间 ^b		2020-5-19
治疗情况 ^b		样本采集时未治疗		
检测情况		CD4+T 细胞绝对计数: 377 个/ μ L 病毒载量: 66900CPs/mL		
特征信息	p24 抗原浓度 ^b		10000pg/mL	

	病毒滴度 ^b		10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
	传代信息 ^b		第2代, 培养周期28天, 培养第11天收集
	基因型 ^b		CRF01_AE
	用于基因型鉴定的基因片段 ^b		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 ^b		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
	合胞体诱导表型		非合胞体诱导型 (NSI)
	病毒嗜性表型 ^b		CCR5
保存单位 联系信息	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 示例供参考, 使用填写时表格仅有信息和内容。			
^b 必要信息, 其余为非必要信息。			

参 考 文 献

- [1] WHO-UNAIDS Guidelines for Standard HIV Isolation and Characterization Procedures (Second Edition, 2002), WHO-UNAIDS HIV Vaccine Initiative, Initiative for Vaccine Research, Health Technology and Pharmaceuticals, World Health Organization. ISBN 92 4 159021 1
- [2] 人间传染的病原微生物名录（卫科教发〔2006〕15号）。中华人民共和国卫生部，2006
- [3] WS 315—2010人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术规范。中华人民共和国卫生部，2010
- [4] WS 293—2019艾滋病和艾滋病病毒感染诊断。中华人民共和国国家卫生健康委员会，2019
- [5] 中国艾滋病诊疗指南(2021年版)。中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组，中国疾病预防控制中心。协和医学杂志，2022，13（2）：203-226
- [6] 全国艾滋病检测技术规范(2020年修订版)。中国疾病预防控制中心，2020
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 李凡, 徐志凯. 卫生部“十二五”规划教材·全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材: 医学微生物学(第8版)[M]. 人民卫生出版社, 2013
-