

感染性疾病相关
个体化医学分子检测技术指南

前言

感染性疾病是当今世界严重威胁人类健康的重大疾病，快速、准确的诊断是有效治疗、病情监测和控制疾病蔓延的重要前提。随着分子检测技术的不断发展和完善，分子检测在病原微生物感染诊断及治疗监测上的临床应用日益广泛，已成为一些重要的感染性疾病的诊断和疗效评价中不可缺少的重要工具。

为使我国的感染性疾病分子检测临床应用健康有序发展，更好的为医患提供高质量的服务，有必要制订感染性疾病相关的分子检测技术指南，规范临床实验室相关分子检测操作程序，指导从事感染性疾病分子诊断的医务人员正确开展工作。

本指南以大量、丰富的临床实践为基础，同时消化吸收了大量国内外文献的精华，广泛征求相关学科专家的意见，遵循科学性、实用性、可行性的原则，反复修改而成。

我们衷心希望《感染性疾病相关个体化医学分子检测技术指南》能够对广大检验人员起到很好的帮助和指导作用，从而为提高感染性疾病临床诊治水平发挥积极的作用

本指南起草单位：中国医科大学附属第一医院、国家卫生计生委临床检验中心

本指南起草人：尚红、李金明、郭晓临、代娣、程仕彤

目录

1. 本指南适用范围.....	3
2. 标准术语.....	3
3. 感染性疾病相关的个体化医学分子检测概述.....	9
4. 感染性疾病相关的个体化医学分子检测分析前质量控制.....	12
4.1 标本采集.....	13
4.2 标本的转运.....	16
4.3 标本的接收.....	17
4.4 标本的保存.....	18
4.5 检验项目的选择.....	19
5. 感染性疾病相关的个体化医学分子检测分析中质量控制.....	20
5.1 实验室的设计要求.....	20
5.2 常用的分子检测方法.....	21
5.3 试剂和方法的选择.....	29
5.4 设备维护和校准.....	36
5.5 人员培训.....	36
5.6 试剂性能验证.....	37
6. 感染性疾病相关的个体化医学分子检测分析后质量控制.....	40
6.1 结果报告.....	40
6.2 结果的解释及医患的沟通.....	41
6.3 检测后标本的保存及处理.....	42

7. 质量保证.....	42
7.1 标准操作程序.....	42
7.2 质控品.....	42
7.3 室内质量控制.....	43
7.4 室间质量评价.....	47
8. 感染性疾病相关的个体化医学分子检测应用.....	48
8.1 乙型肝炎病毒感染诊疗的个体化分子检测.....	48
8.2 丙型肝炎病毒感染诊疗的个体化分子检测.....	52
8.3 结核分枝杆菌感染诊疗的个体化分子检测.....	56
8.4 人获得性免疫缺陷病毒感染诊疗的个体化分子检测.....	57
附录.....	65
参考文献.....	66

1. 本指南适用范围

本指南由国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会编订,是国家卫生计生委个体化医学检测技术系列指南之一,旨为临床实验室进行感染性疾病相关的个体化医学分子检测提供参考和指导。

本指南介绍了感染性疾病相关的个体化医学分子检测应注意的相关问题、技术方法、结果报告与解释、质量保证及临床应用等内容。

本指南主要适用于开展个体化医学分子检测的医疗机构临床检验实验室,同时供从事感染性疾病诊治的临床医师参考。

2. 标准术语

2.1 感染性疾病 (infectious disease)

即由病原微生物引起的疾病的统称。

2.2 病原微生物 (pathogen)

指侵犯人体,引起感染的微生物,或称病原体。病原微生物包括病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体、寄生虫和朊毒体。

2.3 宿主 (host)

为病原体提供生存环境的生物,本指南中的“宿主”仅指人体。

2.4 窗口期 (window period)

宿主感染病原体,需要一段时间之后才能产生抗体。从感染病原体到能检测到抗体的时间就叫做窗口期。

2.5 扩增子 / 扩增产物 (amplicon/amplification product)

由目标扩增反应产生的相对低分子量的产物。

2.6 质控品 (control)

为质量控制目的而制备的标本称为质控品。质控品不能用于校准。质控品的性能指标有:稳定性、瓶间差、定值和非定值、分析物水平、预处理的要求等。

2.7 标准品 (standard)

用于定标,即标准曲线的绘制。

2.8 校准品 (calibrator)

指定用来校准某检测系统(仪器+试剂+方法程序)的,是在考虑到基质效应的情况下,人为赋予校准品的校准值。因此,校准品必须专用于某一检测系统。

2.9 抑制作用 (inhibition)

临床标本中的某些成分或者标本采集和处理过程中引入的某些外源性物质可能对扩增反应或者识别过程产生的削弱作用。

2.10 内部质控 (internal control)

在同一个反应管中存在的一段非目标序列,将与目标序列一同被扩增,用于识别由温控故障、不合格的试剂或聚合酶活性等造成的抑制作用,以及识别相同的基质内是否存在抑制性物质。

2.11 核酸酶 (nuclease)

能够水解核酸的多种酶中的任何一种,比如内切酶和外切酶。

2.12 核酸提取 (nucleic acid extraction)

将核酸(RNA, DNA)从生物物质中分离出来的过程,以备进行核酸的扩增和分析。

2.13 检验 (examination)

以确定一个特性的值或特征为目的的一组操作。实验室检验也常称为检测或试验。确定一个特性的值的实验室检验称为定量检验,确定一个特性的特征的实

实验室检验称定性检验。

2.14 原始样品 (primary sample) / 标本 (specimen)

为检验、研究或分析一种或多种量或特性而取出的认为可代表整体的一独立部分的体液、呼出气、毛发或组织等。

2.15 样品 (sample)

取自原始样品的一部分或多部分。

2.16 寡核苷酸 (Oligonucleotide)

一种短分子单链 DNA，通常为 6-100 个核苷酸，由化学方式合成。

2.17 引物 (Primer)

一个寡核苷酸，可以与目标 DNA 的互补链杂交。在 DNA 聚合酶和核苷酸的参与下，启动 DNA 的合成过程（从 3'-OH 端开始）。

2.18 探针 (Probe)

已定义的单链核酸片段，用于识别特定的包含其互补序列的 DNA 或者 RNA 分子。探针通常都附带一个标记（放射性标记或者化学性标记），使探针在杂交后能被检测到。

2.19 淬灭剂 (Quencher)

能够从荧光基团接收能量并且通过近端淬灭或者 FRET 淬灭来消耗该能量的分子。

2.20 野生型 (wild type)

基因或生物体在自然界中常见的或非突变型的形式。

2.21 突变 (mutation)

基因的结构发生改变而导致细胞、病毒或微生物的基因型发生稳定的、可遗

传的变化过程。

2.22 点突变 (point mutation)

基因内单个核苷酸置换所造成的结构改变。

2.23 缺失突变 (deletion mutation)

由于相邻的多个核苷酸或片段丢失所造成的突变。

2.24 杂合子 (heterozygote)

又称“杂合体”。在二倍体生物中，一对同源染色体上特定的基因座上有两个不同的等位基因的个体或细胞。

2.25 纯合子 (homozygote)

又称“纯合体”。在二倍体生物中，一对同源染色体上特定的基因座上有两个相同的等位基因的个体或细胞。

2.26 表型 (phenotype)

一个生物体（或细胞）可以观察到的性状或特征，是特定的基因型和环境相互作用的结果。

2.27 基因型 (genotype)

一个生物体或细胞的特定基因组成。

2.28 单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)

是指由单个核苷酸—A、T、C 或 G 的改变而引起的 DNA 序列的改变，造成包括人类在内的物种之间染色体基因组的多样性。

2.29 随机误差 (random error)

在重复测量中按不可预见方式变化的测量误差的分量。通常随机误差的参考量值是对同一被测量多次重复测量得到的均值。

2.30 系统误差 (systematic error)

在重复测量中保持不变或按可预见方式变化的测量误差的分量。系统误差的参考量值是真值,或者是测量不确定度可忽略不计的测量标准测得的值,还可以约定量值。

2.31 验证 (verification)

通过提供客观证据证实对规定要求已得到满足的认定。验证过程证实的检验程序的性能指标,应与检验结果的预期用途相关。

2.32 确认 (validation)

通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定。性能确认应尽可能全面,并通过客观的证据(以性能特征形式) 证实满足检验预期用途的特定要求。

2.33 精密度 (precision)

在规定条件下,对同一或类似被测对象重复测量所得示值或测得值间的一致程度。规定条件可以是重复性测量条件、期间精密度测量条件或复现性测量条件。精密度通常无法衡量,而以不精密度表达,常用标准差、方差或变异系数表示,是对随机误差的衡量。

2.34 正确度 (trueness)

多次重复检测所得量值的平均值与一个参考量值间的一致程度。通常用“偏倚”表达,是对系统误差的衡量。选择一个合适的参考对正确度评价很重要,最好采用参考方法。

2.35 可报告范围 (reportable range)

指测量仪器的误差在预期规定范围内的被测量值的集合。

2.36 测量范围 (measurement range)

检测方法可直接对未经稀释、浓缩或其他非常规检测流程预处理的标本进行检测，得到的分析物浓度范围。

2.37 临床可报告范围 (clinically reportable range)

通过采用标本的稀释、浓缩或其他预期处理，用于延长直接的分析测量范围下的分析物值的范围，其范围一般较测量范围宽，是考虑方法检测限和预处理流程后的测量范围的延伸。

2.38 参考区间 (reference interval)

又称为参考范围、正常范围等，通常采用参考值分布的中间 95% 区间。

2.39 检测限 (limit of detection, LoD)

指某一分析方法在给定的可靠程度内可以从样品中检测待测物质的最小浓度或最小量。

2.40 干扰 (interference)

指被测物质浓度因样品特性或其他成分的影响而出现的临床显著性偏差，评价的是由样品引起的特异性偏差。

2.41 敏感性 (sensitivity)

指金标准诊断有病的全部病例中，被评价方法结果为阳性的病例占全部有病病例的比例，即敏感性= $[\text{真阳性}/(\text{真阳性}+\text{假阴性})] \times 100\%$ 。

2.42 特异性 (specificity)

指金标准诊断全部无病病例中，被评价检验方法结果为阴性的病例所占全部无病病例的比例，即特异性= $[\text{真阴性}/(\text{假阳性}+\text{真阴性})] \times 100\%$ 。

2.43 生物学变异 (biological variation)

指在机体稳定状态下，排除已知可能影响因素（例如，疾病、用药、禁食、运动等），除外已知节律性变化（例如，对于某些检验项目，昼夜或季节性变化等），依然存在的随机变异。

2.44 分析前变异（pre-analytical variation）

从患者准备开始至样品分析启动前各环节造成的变异，包括抽血及有关条件、运输、离心、保存等环节或因素造成的变异。

2.45 检验前过程（pre-examination processes） / 分析前阶段（preanalytical phase）

按时间顺序从医生申请至分析检验启动前的过程，包括检验申请、患者准备和识别、原始样品采集、运送和实验室内运送等。

2.46 检验后过程（post-examination processes） / 分析后阶段（postanalytical phase）

包括结果复核、临床材料保留和储存、样品和废物处理，以及检验结果的格式化、发布、报告和留存等。

3. 感染性疾病相关的个体化医学分子检测概述

感染性疾病是由病原微生物（细菌、病毒、真菌、寄生虫等）引起的疾病的统称。据统计感染性疾病死因占全部死因的 25% 以上，是当今世界严重威胁人类健康的重大疾病。

3.1 分子检测与感染性疾病的个体化医疗

个体化医疗（personalized medicine）是以每个患者的信息为基础来决定治疗方案，从基因组成或表达变化的差异来把握治疗效果或毒副作用等应答特异性，对每个患者进行最适宜的治疗。个体化医疗目前在个体化用药、疾病诊断、治疗

监测以及预后判断中都发挥着重要作用。

长期以来感染性疾病的诊断和疗效监测一直依靠形态学、免疫学以及病原体分离培养和药敏试验等方法，但形态学检验受检测人员经验影响较大，易误诊；而免疫学、药敏试验和病原体分离培养的窗口期或检测实验周期较长，易错过最佳治疗时机。分子检测在病原体检测中优势明显，灵敏度高、特异性强、快速准确。因此近年来发展较快，已成为病原体诊治中不可或缺的重要工具，而且已经广泛应用于感染性疾病的个体化诊断和治疗中。例如利用分子检测技术可以帮助明确乙型肝炎患者体内 HBV DNA 的病毒载量、基因型和基因突变情况，而这些正是判断患者何时开始治疗、采用何种治疗方案、发生肝硬化等不良预后风险的决定性因素。

3.2 个体化医学分子检测在感染性疾病中的应用

本指南中涉及的感染性疾病个体化医学分子检测主要包括病原体核酸定量检测、分子分型检测、耐药基因检测及与疗效相关宿主基因型检测。

3.2.1 病原体核酸定量（载量）检测

病原体核酸定量检测有助于评估疾病阶段及严重程度，指导临床合理用药，观察疗效，监测疾病进程以及判断疾病预后。例如 HCV RNA 检测是判断 HCV 有无现症感染的证据；其病毒载量的高低与患者的长期预后如肝硬化和肝癌的发生相关，是进行抗病毒治疗的基础，同时还是应用抗病毒治疗过程中耐药监测的最重要指标。应根据抗病毒治疗的早期病毒学应答情况来调整治疗方案，以提高疗效，降低耐药发生率。

3.2.2 病原体分子分型检测

由于不同型别病原体具有迥异的致病性和药物敏感性，因此病原体分子分型

检测有助于指导临床合理治疗以及判断疾病预后。例如 HCV 分为 6 个基因型和 80 多种基因亚型，不同基因型患者的病毒学应答率差距明显，如 2、3 及 6 型患者较易获得持续病毒学应答（SVR），而 1 和 4 型应答较差，属于难治性丙型肝炎，其利巴韦林的用药剂量和用药时间有显著差别。因此在采用传统方法治疗前须进行 HCV 基因型检测，以便决定治疗方案。目前，丙肝的临床治疗已取得重大进展，一些小分子药物对丙肝病毒无基因型要求，并且临床治愈率很高。

宫颈癌早期症状不明显，发展过程中存在较长的、可逆转的癌前病变期。从一般的宫颈癌前病变发展为宫颈癌大约需要 10 年时间。如能在癌前病变阶段进行医学干预，宫颈癌治愈率可达 98%。多中心研究表明，我国宫颈癌及宫颈高危病变以感染 HPV16 和 18 型为主，约 85% 左右的宫颈癌确诊病例属于这两种类型，且 HPV16/18 型的感染率和致癌率都明显高于其他高危 HPV 型别。因此对高风险人群进行 HPV16/18 等高危型筛查有助于宫颈癌的防治。

3.2.3 病原体耐药基因检测

所有产生耐药的病原体，不论其产生的机制如何，均与病原体基因位点突变有关，因此进行病原体耐药基因检测有助于早期指导临床合理用药，控制耐药病原体的流行。例如结核分枝杆菌对利福平耐药与 *ropB* 位点突变有关；肠球菌对糖肽类抗生素的耐药基因由 *Van A*、*Van B*、*Van C* 等介导，测定这些基因可以预测对万古霉素和壁霉素的耐药性。因此，应根据耐药基因突变情况来调整治疗方案，以提高疗效，避免耐药发生。

3.2.4 与疗效相关的宿主基因型检测

宿主基因多态性可能对病原体的清除和治疗产生影响。研究发现，*IL28B* 的单核苷酸多态性（single-nucleotide polymorphism, SNP）与抗 HCV 疗效密切相关，

IL28B的基因型有助于临床疗效预测，确定慢性丙型肝炎患者的个体化治疗方案，使病人获得最大的收益。

3.3 分子检测在感染性疾病个体化医疗应用中的局限性

综上所述，个体化医学分子检测已日益广泛地应用于感染性疾病的诊治过程，并取得了显著成效。然而，在目前的临床实验室应用中，应注意以下几点：

①影响分子检测准确性的因素很多，如实验室污染或是标本间交叉污染可导致假阳性结果，扩增抑制物或是标本处理不充分可能导致假阴性的结果等。因此，必须建立规范化实验室质量控制体系和标准操作程序，并严格按照要求进行检测。

②尽管其具有敏感性高、特异性好等优点，但其本身还有许多方面有待进一步完善。如单次的分子检测不能判断是否为活的病原体；受多种因素影响，基因型耐药和表型耐药可能存在差异等。因此当我们选择分子检测方法时，必须基于该种检测结果的临床价值，需考虑结合其他检测项目或检测方法综合判断结果。③感染性疾病的临床诊治常是极其错综复杂的，仅依靠一项或几项实验室检查还不够，详细的病史询问，细致的体格检查等综合分析是极为重要的。

4. 分析前质量控制

分子检测分析前质量控制包括填写正确完整的检验申请单，合理规范的标本采集，适当的标本转运周期和转运条件，以及适宜的标本预处理和分析前标本保存等。感染性疾病个体化分子检测通常检测的是病原体的核酸，其浓度、稳定性和完整性对检验结果有决定性影响，因此为得到可靠和准确的检验结果，有必要规范分析前质量控制的各项程序。病原微生物核酸检测不同于其他分子检测，有其自身的特点，在分析前阶段主要包括：①病原微生物核酸不仅存在于血液、脑脊液等体液中，还存在于尿液、粪便等排泄物中，因此影响核酸纯化的干扰物质

(如血红素、尿素、pH 值等)较多。②病原微生物核酸受病原微生物生命周期、复制环境和患者用药等情况的影响,所以要根据检验目的正确选择检验项目、标本采集时间和标本采集类型等。③标本采集和转运容器、标本转运和储存条件以及标本处理方法等都会直接影响病原微生物核酸检测。④标本采集、转运及储存需按照《血源性病原体职业接触防护导则》、《病原微生物实验室管理条例》和《实验室生物安全通用要求》等相关生物安全要求进行操作。鉴于病原微生物分子检测的特殊性,有如下建议:

4.1 正确、规范的标本采集

感染性疾病是临床的常见病,重症感染有较高的病死率。正确的标本采集对感染的早期诊断和有效治疗等有重要的临床意义。

4.1.1 标本采集原则

详见《个体化医学检测质量保证指南》,但在感染性疾病个体化医学检测中尤其需注意以下几点:①采集标本时应使用严格的无菌技术,将污染的可能性降至最低;②标本采集时间由检测目的决定,如在感染的急性期,应在使用抗生素或伤口局部治疗前采集标本进行基线检测,再根据治疗时间和循环病原微生物半衰期等确定再次采样时间;在患者使用抗感染治疗前,应在发热初期或高峰期或发热前半小时采集标本,对已使用抗感染治疗而又不能停药的患者,应重复采集标本数次以提高检出率;③采取适当的解剖位置和技术,防止标本溶血等影响检测结果的准确性;④正确选择采集/储存容器,例如检测的病原微生物为 RNA 病毒(如 HCV、HIV 等),由于 RNA 易受 RNA 酶的降解,须使用经高压灭菌或经 RNase 酶清除处理过的无 RNase 酶的一次性耗材。

4.1.2 确定正确的标本量

为避免因病原体核酸浓度过低造成假阴性结果，应根据检验目的和检验方法的要求采集足够量的标本。例如利用支气管肺泡灌洗液进行结核分枝杆菌核酸检测时，至少要留取 1ml 支气管肺泡灌洗液。

4.1.3 常用标本类型

常用标本包括血浆、血清、全血、支气管肺泡灌洗液、骨髓、脑脊液、培养的细胞、培养的菌株、尿液、痰液、拭子、乳汁等。为避免标本中核酸的降解，保证核酸的完整性和检测的准确性，对每种标本的采集有以下建议，但具体要求由临床需求和检测目的决定：

4.1.3.1 血液标本

肝素是 Taq 酶的强抑制剂，全血和血浆标本宜选择乙二胺四乙酸（EDTA）或枸橼酸（ACD）盐作为抗凝剂。鉴于注射器采血易导致溶血，建议采用真空负压采血管采集血液标本；采用带有促凝剂的真空负压采血管采集血清标本。

4.1.3.2 呼吸系统标本

痰液标本应以清晨第一口痰为宜，患者晨起用清水漱口数次，用力咳出深部痰液，混有血液为不合格样品。留取至少 1ml 于无菌可密封标本盒中。痰量少者可采用加温 45℃左右的 10%氯化钠溶液雾化吸入，使痰液容易排出。咽拭子应用棉拭子采集患者咽后壁或悬雍垂的后侧，反复涂抹数次。鼻咽拭子应经鼻腔进入鼻咽部采集标本，置于运送培养基中送检；鼻咽管应用细鼻饲管从鼻腔进入到鼻咽部，用负压吸引器吸取鼻咽部分泌物并放入无菌容器内送检。支气管肺泡灌洗液应留取至少 1ml 于无菌可密封试管中。

4.1.3.3 泌尿生殖系统标本

尿液标本：建议采集浓缩晨尿，至少 10ml 于无菌可密封试管中。应考虑尿

量、距上次排尿的时间、感染等因素对结果的影响。在应用抗感染治疗前或停药 1-2 天后采集标本，最好采集清晨第一次尿液或者采集在膀胱内贮留 6-8 小时的尿液。可采用中段尿液采集法、导尿采集法、膀胱穿刺法。宫颈和尿道拭子标本：男性尿道标本采用涤纶拭子，女性宫颈和阴道标本采用人造纤维或涤纶拭子，并放入适当的基质液中。用于支原体分子检测，取材时一定要取到上皮细胞（沙眼衣原体在活细胞内才能增殖复制），而只取分泌物会降低检出率。宿主细胞 DNA 比例、其他微生物、分泌物的量等可能会直接影响分子检测结果。

4.1.3.4 其他体液标本

胸腹水标本：首次穿刺抽到积液后，应弃掉第一管标本及所用注射器，然后更换新的一次性注射器抽取。穿刺采集后留取中段液体于带盖的无菌试管内，因积液易凝集，应采用 EDTA 抗凝，同时注意防止外伤性血液的进入。乳汁标本：留取至少 10ml。粪便标本：留取有粘液或其他特征性粪便标本于无菌可密封标本盒中，不能混有尿液。脑脊液标本：建议在留取化学和免疫学、细菌学、以及一般性状等检查标本后，留取至少 1ml 脑脊液于无菌可密封试管中，以避免皮肤病菌污染和混入血液致溶血而影响检测结果。组织标本：浅表、开放性脓疱和创口应清创后，使用拭子涂抹创口；蜂窝织炎和丹毒应使用穿刺针抽吸组织取样；复杂性皮肤软组织感染使用组织活检、穿刺针抽吸、外科手术等方法取深层组织进行检测。

4.1.3.5 培养的细胞或菌株/毒株

在提取前最好放在 37℃ 或其适宜生长的温度或环境中；并严格按照相关生物安全要求进行操作。

4.2 标本的转运

4.2.1 标本转运原则

详见《个体化医学检测质量保证指南》，但在感染性疾病个体化医学检测中尤其需注意以下几点：①按照国家《病原微生物实验室生物安全管理条例》进行相应病原微生物标本的运输，如已知为 HIV 阳性标本需由经过相关培训并具有相应资质的人员使用 WHO 三级包装系统的容器运输。②如条件允许，建议尽快将标本转运至实验室进行预处理或保存。③根据检验的靶基因和处理前时间决定转运条件，如脑脊液标本用于 DNA 检测时应 2-8℃ 转运，用于 RNA 检测时应立即冰上转运。④采用适当的转运方式和容器，以避免标本污染，如采血管可采用气动传送转运，但粪便标本建议采用人工转运。⑤实验室应评估标本容器，确保其不会对所进行的分析造成任何干扰。

4.2.2 常见类型标本转运要求

4.2.2.1 血液标本

全血标本：如转运时间在 24 小时内可室温转运，在 24~72 小时内则 2-8℃ 转运；冻存样本需用干冰转运。血浆、血清标本：建议 2-8℃ 转运；冻存样本需用干冰转运。

4.2.2.2 脑脊液、胸腹水、支气管肺泡灌洗液标本

用于 DNA 检测的样本，应 2-8℃ 转运；用于 RNA 检测的样本，应立即冰上转运；冻存样本需用干冰转运。

4.2.2.3 尿液、乳汁、粪便、宫颈和尿道拭子标本

应尽快转运，如环境温度 $\geq 25^{\circ}\text{C}$ ，建议 2-8℃ 转运。

4.2.2.4 痰液标本

用于 DNA 检测的标本，如在 30 分钟内不能转运至实验室，建议 2-8℃ 转运。

4.2.2.5 培养的细胞或菌株/毒株

最好放在 37℃或其适宜生长的温度或环境中转运；注意按照相关生物安全要求进行操作。

4.3 标本的接收

4.3.1 不合格标本判断标准

4.3.1.1 通用标准

标本信息不正确、不完整（必要时应包括详尽的临床信息和采集部位，以便于准确地进行临床解释）、标本类型或标本容器与检验目的不符、标本量过少/过多、无采集时间、标本有明显的污染迹象（如已溢洒）、标本采集后超过预处理时间送检等。

4.3.1.2 不合格标本判断标准

血液标本溶血、乳糜、严重黄疸等；体液标本混有血液；痰标本为褐色血痰或含有少量新鲜血液的血痰、唾液标本（透明或半透明水样、粘度较低、有时伴有气泡）；固体培养物培养在非适当的固体培养基、菌苔较少；液体培养物菌液浓度小于 1 个麦氏浊度等。

4.3.2 让步检验标本的接收标准

对于样本量较少，能满足检验用量但不足样本保存量的，且患者重新采样存在困难的，与临床科室沟通后予以接收。

对于样本有轻微乳糜或溶血，患者重新采样存在困难或由于药物等影响再次采样仍会存在乳糜或溶血的，经与临床科室沟通坚持检验的，予以接收，记录至当日的工作日志，并在发送的检验报告的备注中注明样本情况。

当标本标识不清或不全，但标本再获取困难或原始标本中需检测的核酸不稳

定，可先接收标本，待项目申请医师或标本采集人员识别了标本信息，提供适当的信息并确定标本所对应的患者后再发送检验结果报告。

4.4 标本的保存

4.4.1 标本保存的原则

详见《个体化医学检测质量保证指南》，但在感染性疾病个体化医学检测中尤其需注意以下几点：①为保证核酸的完整性和稳定性，选择适宜的温度保存。②不能使用无霜冰箱保存标本，要记录冰箱温度，如有条件可安装冷链系统监测冰箱温度。③使用适宜的容器保存标本和预处理后的样本，如血浆在有分离胶的采血管中冻存后会使 HIV-1 病毒载量检测值假性升高，因此需离心分离出血浆后，转移至无 RNase 酶的可密封容器中保存。④反复冻融会降解核酸，因此避免反复冻融。⑤如果有条件，在用于 RNA 检测的标本采样器中加入 RNA 稳定剂冻存。⑥DNA 在 TE (Tris-EDTA) 中会更稳定，室温可保存 26 周， $2-8^{\circ}\text{C} \geq 1$ 年， $-20^{\circ}\text{C} \leq 7$ 年， $\leq -70^{\circ}\text{C} \geq 7$ 年。⑦保存病原微生物标本的冰箱需双人双锁，取用具有高致病性病原微生物标本需申报，经审批后按相应生物安全要求操作。

4.4.2 常见类型标本保存条件

4.4.2.1 血液标本

全血标本：室温可保存 24 小时，保存 $2-8^{\circ}\text{C}$ 时应在 72 小时内提取 DNA；建议在去除红细胞后， -20°C 或 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 长期保存。血浆、血清标本：如果 4 小时内不能提取 RNA，应 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 保存血浆。建议 -20°C 或 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

4.4.2.2 呼吸系统标本

痰液标本：如不能立即检测应在 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 保存。用于分枝杆菌分子检测需液化后保存。支气管肺泡灌洗液标本：如果 24 小时内不能检测， $2-8^{\circ}\text{C}$ 可保存 72 小

时，如近期不能检测应在 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 保存。如进行分枝杆菌检测，应在液化后保存。

4.4.2.3 其他体液标本

脑脊液、胸腹水标本：用于 DNA 检测的样本，如不能立即检测应在 -20°C 或 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 保存。用于 RNA 检测的样本，应在 1-4 小时内提取；如近期不能检测，应在去除红细胞后立即冻存。宫颈和尿道拭子标本：用于 DNA 检测的样本 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存 ≤ 10 天。尿液、乳汁、粪便标本：建议采集后保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，并尽快提取核酸。

4.4.2.4 培养的细胞或菌株/毒株

在检测前最好放在 37°C 或其适宜生长的温度或环境中，注意按照相关生物安全要求进行操作。

4.5 正确选择检验项目

根据检验目的合理选择，包括根据患者的诊治情况正确选择各检验项目的检测时机和频次，根据临床意义选择正确的标本类型，根据不同标本情况正确选择检测方法、判断检测结果等。

4.5.1 正确选择检测时机和频次

一般情况下，病原体核酸定量检测应根据病原体感染的自然史，在进行用药指导、治疗或者疗效预测时进行检测。例如 HBV DNA 定量检测应在抗病毒治疗前进行基线检测，再根据治疗效果的不同，每 3 个月或 6 个月进行随访检测。病原体基因型和耐药基因检测，通常在进行用药指导、治疗或者病原体核酸数量反弹时进行检测，一般检测一次即可，但如果存在再次感染或更换治疗方案时，可能需要再次进行检测。与疗效相关的宿主基因型检测，通常在进行用药指导或治疗时进行，检测一次即可。

4.5.2 根据临床意义选择正确的标本类型

不同标本类型中的病原体可能是处在不同生命周期中的病原体，其分子检测的临床意义可能不同。例如外周血单个核细胞（PBMC）可用于检测 HIV 整合入宿主基因组的前病毒 DNA（即潜伏病毒），而血浆用于检测 HIV 的病毒 RNA（即游离病毒），在对 HIV 感染产妇所生的未满 18 个月的婴幼儿进行早期诊断时，应选择 HIV DNA 检测，以免受到母亲以及婴幼儿预防性抗病毒治疗的干扰而影响诊断。

4.5.3 根据标本类型正确判断检测结果

不同的标本类型可能导致检测结果有显著差异，这些差异将影响临床决策，因此要依据临床需要选择正确的标本类型，如 EBV 在全血中的病毒载量比血浆高 1 个 log。

5. 感染性疾病相关个体化医学分子检测的分析中质量控制

5.1 实验室设计要求

参见《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》等相关要求，同时需根据《病原微生物实验室生物安全管理条例》和《人间传染的病原微生物名录》对所检测的病原微生物进行风险评估，然后在相应生物安全级别的实验室按照《实验室生物安全通用要求》和《血源性病原体职业接触防护导则》等卫生法律法规和各项生物安全管理规范开展检测工作。例如结核分枝杆菌分子检测，如仅涉及少量活菌可在 BSL-2 级实验室开展，但如果需要先进行培养，则需要 BSL-3 级实验室开展。

5.2 常用的分子检测方法

5.2.1 聚合酶链反应（PCR）

5.2.1.1 基本原理

PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成：

①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 95℃左右一定时间后，模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离成为单链，它与引物结合，为下轮反应作准备。②模板 DNA 与引物的退火：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至最佳退火温度，引物与模板 DNA 单链以互补序列配对结合。③引物的延伸：DNA 模板—引物结合物在 72℃条件下、利用 DNA 聚合酶（如 TaqDNA 聚合酶）的作用，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基互补配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链，重复循环变性—退火—延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增大几百万倍。

5.2.1.2 主要类型及临床应用

5.2.1.2.1 定性检测

定性检测包括病原体分子分型、耐药基因突变及宿主基因型检测。

(1) 等位基因特异性 PCR (allele specific-PCR, ASO-PCR)：又称作 ARMS (amplification refractory mutation system) 或 PASA (PCR amplification)。

基本原理：根据基因变异位点设计特异引物，其中一条链（特异链）的 3' 末端与突变位点的碱基互补，另一条链（通用链）按常规方法设计。因为特异引物在变异基因型中有扩增产物，在野生型中没有扩增产物，用凝胶电泳能够很容易地分辨出扩增产物的有无，从而确定有无突变基因型。

常用的结果分析方法：a)琼脂糖凝胶电泳。b)聚丙烯酰胺凝胶电泳。

主要特点：对实验条件要求较低，操作简单易行，成本低，重复性好，所需DNA的量较少且对DNA质量要求较低；但对引物设计要求较高，且仅能进行已知突变检测。

(2) 多重PCR (multiplex PCR)

基本原理：多重PCR在同一PCR反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多个核酸片段的PCR。

常用的结果分析方法：①毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE) 又称高效毛细管电泳 (high performance capillary electrophoresis, HPCE)：是利用离子的电泳迁移率不同，在电场中移动的速度不同，从而将不同的离子分离。②高效液相色谱层析 (high performance liquid chromatography, HPLC)：溶于流动相的各组分在经过固定相时，与固定相发生作用 (吸附、分配、离子吸引、排阻、亲和) 的大小、强弱不同，导致在固定相中滞留的时间不同，由此判断待测物。③单链构型多态性分析 (single-strand conformational polymorphism, SSCP)：是利用不同空间构型的DNA分子，在凝胶电泳中的泳动速率不同，从而区分变异的DNA分子。

主要特点：多重PCR经济简便，多种病原体在同一反应管内同时检出，将大大地节省时间，且节约开支；但特异性会有所降低，且仅能进行已知突变检测。

(3) 长距离反向PCR (long distance inverse PCR, LD-IPCR)

基本原理：根据已知的核心DNA去末端序列设计两条引物，使两引物3'端相互反向。扩增前先用限制性内切酶酶切样品DNA，然后用DNA连接酶连接成

一个环状DNA分子，通过反向PCR扩增引物的上游片段和下游片段，从而获得引物外侧的DNA片段。

常用的结果分析方法：①脉冲场凝胶电泳（PFGE）：利用定时改变电场方向的交变电源以分离大分子DNA。②标记寡核苷酸探针：针对待测基因设计相应的特异性标记寡核苷酸探针，使其在固相或液相中与扩增产物反应，检测相应的荧光信号即可判断待测样本的基因型。

主要特点：LD-IPCR适用于较长序列的分析，且不需预知待分析序列的具体结构；但方法较为复杂，需要特殊仪器。

(4) 实时荧光定量PCR（qPCR或real-time PCR）

基本原理：实时荧光定量PCR是指在PCR反应中引入一种荧光化学物质，随着PCR反应的进行，反应产物不断累积，荧光信号强度也等比例增加。基于检测PCR扩增周期每个时间点上扩增产物的量，通过荧光强度变化监测产物量，从而实现起始模板定性或定量检测。

根据使用的荧光标记类型可分为探针类和非探针两大类。非探针类是利用非特异性的插入双链DNA的荧光结合染料或者特殊设计的引物来指示扩增的增加。探针类则是利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加。前者简便易行，而后者由于增加了探针的互补识别步骤，特异性更高。

常用的特异性荧光探针及其特点：①TaqMan 探针：是目前临床应用最广泛的探针之一。TaqMan 是一类寡核苷酸探针，依据目标 DNA 序列的上游引物和下游引物之间的序列配对来设计。探针的 5'-端用报告荧光染料（reporter fluorescence dye, R）标记，3'-端则标记淬灭染料（quencher dye, Q）。当完整的探针与目标序列配对时，5'-端报告荧光基团发射的荧光因与3'-端的淬灭剂接

近而被淬灭。但随着 PCR 延伸，DNA 聚合酶的 5'-端外切酶活性将探针切开，使得荧光基团与淬灭剂分离，报告基团的荧光得以释放而被检测。

②**TaqMan MGB 探针**：是在 TaqMan 探针基础上改进而来的，其 3'端不是淬灭基团而是一种非荧光淬灭剂，另外 3'端还增加了一个小沟结合分子 MGB，该分子能够结合在双链 DNA 小沟部位，从而使探针与模板紧密结合。MGB 的存在提高了探针的 T_m 值，一般 12-17bp 的探针在 MGB 的作用下 T_m 值可升高 15-30℃，从而使它能够分辨单个碱基的差别；而且连在 MGB 分子后的是非荧光物质的淬灭基团，因此这种探针具备更好的淬灭效果，且具有无背景荧光、荧光标记灵活、提高荧光信号的信噪比等优点。

③**分子信标 (molecular beacon)**：是一种茎环结构的双标记寡核苷酸探针，位于分子一端的荧光基团与分子另一端的淬灭基团靠近。不存在模板时，探针呈茎环结构；存在模板时，茎环结构打开与模板配对，构象改变使得荧光基团与淬灭基团分开，释放荧光。分子信标也有缺点，即探针匹配的是基因内部序列，不一定在每个基因上都能找到长短适中且带有末端回文结构的序列，所以分子信标的探针设计要求较高。该方法检测的特异性高于 TaqMan 等线性探针，较适用于基因点突变的鉴定。

④**蝎形探针**：是一种双分子实时荧光检测体系，具有反应迅速、荧光强度高、特异性好等优点。该方法中引物与探针的功能被综合到同一段寡核苷酸序列上。

⑤**双杂交探针**：该方法的特点是淬灭效率高，特异性强，但由于两个探针结合于模板上，故影响了扩增效率。此外，探针合成成本也相对较高。

常用的非探针类荧光标记及其特点双链 DNA 交联荧光染料，通常指 SYBR Green I 或 LC Green TM I 染料，SYBR Green I 能结合到 DNA 双螺旋到小沟。在加入过量到 SYBR 荧光染料到 PCR 体系中，SYBR 荧光染料特异性地掺入到

产物的 DNA 双链，发射荧光信号，而未掺入 DNA 链中的染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。由于它与所有的双链 DNA 相结合，不必因为模板不同而特别定制，因此设计的程序通用性好，且价格相对较低。但是，内嵌染料没有序列特异性，可以结合到包括非特异产物、引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物上，造成假阳性而影响定量的精确性。

高分辨熔解曲线分析（high resolution melting, HRM）及其特点是根据 DNA 序列的长度、GC 含量以及碱基互补性差异，应用高分辨率的熔解曲线对样品进行分析。高分辨熔解对 DNA 序列的识别能力主要由三个因素所决定：检测仪器的分辨率、双链 DNA 嵌入型染料的种类和 PCR 产物的纯度。其优点是高通量、快速、高灵敏度、闭管检测以防止污染造成的假阳性，但此方法对仪器要求较高。

(5) PCR-限制性片段长度多态性分析（PCR-RFLP）

基本原理:根据 DNA 在限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小，判断待测样品的基因特征。

主要特点:简便易行，但仅能识别位于酶切位置内的突变，而且凝胶电泳的结果仅能判断产物的大概长度，是非特异性的方法。目前对同一病原体检测时应用哪一种限制内切酶仍没有一致意见，因此质量控制比较难实现。

(6) PCR-核酸序列分析技术

Sanger 测序技术（双脱氧链终止法）:是广泛应用的第一代 DNA 测序技术的典型代表。通常情况下，要测序的 DNA 先进行核酸扩增，之后进行测序反应。测序反应中除了加入 4 种正常的脱氧核苷三磷酸（dNTP）外，还加入一种少量的 2',3'-双脱氧核苷三磷酸（ddNTP），当 ddNTP 位于链延伸末端时，由于它没

有 3'-OH, 不能再与其它的脱氧核苷酸形成 3',5'-磷酸二酯键, DNA 合成便在此处终止, 如果此处掺入的是一个 ddATP, 则新生链的末端就是 A, 依次类推可以通过掺入 ddTTP、 ddCTP、 ddGTP , 则新生链的末端为 T、 C 或 G。

Sanger 测序技术可以获得未知待分析序列的具体结构, 是确定基因序列的金标准, 但它的准确率仍然无法达到 100%, 大约<2%的碱基无法被 Sanger 法测序所识别。因为通量的缘故, 它在大基因和多基因的检测方面效率很低。

焦磷酸测序技术 (pyrosequencing): 是由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应。当引物与模板 DNA 退火后, 在 DNA 聚合酶(DNA polymerase)、ATP 硫酸化酶 (ATP sulfurytase)、荧光素酶 (luciferase) 和三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase) 4 种酶的协同作用下, 将引物上每一个 dNTP 的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来, 通过检测荧光的释放和强度, 达到实时测定 DNA 序列的目的。

焦磷酸测序技术是一种新型的酶联级联测序技术, 其重复性和精确性可与 Sanger 测序相媲美, 而测序速度则大大提高, 非常适合对已知的短序列进行测序分析; 但对未知序列分析上, 该方法的测序长度明显短于 Sanger 法。

高通量测序技术: 又称“下一代”测序技术 ("Next-generation" sequencing technology, NGS), 以能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定和一般读长较短等为标志。不同厂家的产品测序原理不同, 主要分为边合成边测序 (Sequencing by synthesis, SBS)、基于“DNA 簇”和“可逆性末端终结 (Reversible Terminator) 大规模平行测序、4 色荧光标记寡核苷酸的连续连接反应测序和半导体芯片测序。

与 Sanger 测序技术相比, 新一代测序平台最大的变化是无需克隆这一繁琐

的过程，而是使用接头进行高通量的并行 PCR、测序反应，并结合微流体技术，利用高性能的计算机对大规模的测序数据进行拼接和分析。接头的运用，使得高通量测序技术不再局限于单纯的基因组测序，而是作为一个平台，可以开展全基因表达图谱分析、SNP、小 RNA、ChIP、DNA 甲基化等诸多研究。目前尚未在临床广泛应用。

(7) PCR-基因芯片技术

基本原理：又称微列阵技术，是一种大规模集成的固相杂交（反向点杂交），即依据 DNA 双链碱基互补配对、变性和复性的原理，以大量已知序列的寡核苷酸、cDNA 或基因片段作探针，检测样品中哪些核酸序列与其互补，分析得出待测样品的基因信息。

主要特点：一张芯片可同时对多名患者进行多种疾病的检测，通量较高；待测样品用量少；灵敏度高，特异性好。

5.2.1.2.2 定量检测

定量检测包括病原体核酸定量检测。

(1) 实时荧光定量 PCR（qPCR 或 real-time PCR）

基本原理：基于检测 PCR 扩增周期每个时间点上扩增产物的量，通过荧光强度变化监测产物量从而实现对起始模板进行定量。

外标法定量：参考基因或标准物与待测标本在不同的反应管里平行扩增，则这样的参考基因或标准物称为外标。利用外标进行 PCR 反应的方法叫外标法。外标法操作简便，检测范围广泛；但管间扩增效率的差异会可能影响结果的准确性，且难以排除假阴性结果。

内标法定量：参考基因或标准物与待测标本在同一个反应管里扩增，则这

样的参考基因或标准物称为内标。利用内标进行 PCR 反应的方法叫内标法。内标法可以监控整个反应过程，但使 PCR 反应变为双重 PCR，可能会出现竞争现象。

(2) 数字 PCR (digital PCR, dPCR)

数字 PCR 是一种基于单分子 PCR 方法来进行计数的核酸绝对定量的方法。主要采用微流控或微滴化方法，将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或微滴中，每个反应器的核酸模板数少于或者等于 1 个。经过 PCR 循环之后，有一个核酸分子模板的反应器就会给出荧光信号，没有模板的反应器就没有荧光信号。根据相对比例和反应器的体积，推算出原始溶液的核酸浓度。

5.2.2 转录介导的扩增系统 (TMA)

转录介导的扩增系统是一种利用 Money 鼠白血病病毒 (MMLV) 逆转录酶和 T7 RNA 多聚酶 2 种酶的共同作用，在等温条件下来扩增 RNA 或 DNA 的反应系统，主要扩增原理为目标序列在逆转录酶作用下，以引物为引导进行逆转录，逆转录酶的 RNA 酶 H 活性将杂合链上的 RNA 降解以后，合成双链的 DNA，并在 T7 RNA 多聚酶作用下，转录出成千上万个目标 RNA 序列，这些 RNA 又可以作为模板进行下一个循环，整个反应是一个自催化过程。具有特异性强，灵敏度高，反应条件简单，扩增效率高等特点，且整个反应在 1 个反应管中进行，减少了污染。目前主要应用于病原体核酸定量及与感染性疾病易感性相关的人类白细胞抗原等位基因分型等检测。

5.2.3 环介导等温扩增技术 (LAMP)

环介导等温扩增技术是使用一种具有自动链置换活性的 Bst DNA 聚合酶，通过两条特异的外部引物和两条特异的内部引物，在等温 (60~65℃) 的条件下

进行靶序列特异性扩增。LAMP 具有很高的扩增效率，在 1 小时内可以将几拷贝的靶序列扩增到 $10^9 \sim 10^{10}$ 拷贝。同时，LAMP 因为其 4 条特异性引物可识别靶序列上 6 个不同的区域，扩增的特异性非常高。LAMP 方法的扩增产物可根据反应中产生的白色焦磷酸镁沉淀的有无直接检测，或通过加入染料进行实时检测，也可以通过扩增产物的混浊度对初始靶序列进行定量分析。具有简单、快速、特异性强、灵敏度高的特点。但由于 LAMP 扩增是链置换合成，故不能进行长链 DNA 的扩增。此外，由于灵敏度高，极易受到污染而产生假阳性结果，故要特别注意严谨操作。目前主要应用于如疟疾、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌等病原体的检测。

5.2.4 其他定量检测方法

分支 DNA 信号放大技术 (bDNA) 和核酸依赖性扩增检测技术 (NASBA) 主要应用于病原体核酸定量检测，在国内主要在疾病预防控制中心 (CDC) 系统用于 HIV 的核酸定量检测，临床检验实验室尚未进行应用。具体介绍见“8.4 人获得性免疫缺陷病毒感染诊疗的个体化分子检测”部分内容。

5.3 核酸提取和检测方法比较

感染性疾病分子检测可分定性和定量检测两大类，前者包括病原体基因型、耐药基因和与疗效相关宿主基因检测等，后者主要是病原体核酸的定量检测。

5.3.1 病原体核酸提取

核酸提取是导致分子检测结果不准确和分析变异的重要环节。核酸提取的方法有很多，如有机提取、二氧化硅技术、玻璃纤维技术以及阴离子交换等。以前核酸提取是人工进行的，目前已有越来越多的自动化平台应用于提取。此处仅就目前临床上常用的核酸提取方法进行介绍，建议依据检验目的及患者实际情况选

择合适的核酸提取试剂，如进行高精度病毒载量检测时建议选择提取效率较高、核酸丢失较少的提取方法和试剂。

表 1. 目前临床常用 DNA 提取方法

	煮沸法	提取柱法	磁珠法
裂解方法	煮沸	化学裂解	化学裂解
分离方法	离心	亲和吸附	吸附或杂交
抗干扰能力	较差	较好	好
提取物	与核酸相似分子量的混合物	全核酸	待测病原体的核酸
自动化程度	手工	手工或自动	半自动或全自动

表 2. 目前临床常用 RNA 提取方法

	酚-氯仿提取	提取柱法	磁珠法
原理	液相萃取	亲和吸附	吸附或杂交
抗干扰能力	较差	较好	好
缺点	操作繁琐、核酸丢失率高、核酸特异性差	核酸丢失率较高、核酸特异性较差	核酸丢失率低、核酸特异性好
自动化程度	手工	手工或自动	半自动或全自动

5.3.2 病原体核酸定量检测

病原体核酸定量检测可用于病情评估、疗效预测、预后判断等，在感染性疾病的个体化治疗中具有重要的临床应用价值。qPCR、bDNA、NASBA、TMA 和 LAMP 等技术都可以用于病原体核酸定量检测，但不同的检测方法和不同的检测试剂在检测限、可报告范围及特异性等方面都有差别，建议依据检验目的及患者的实际情况进行合理的选择，如在治疗前可以选择检测限较高的方法或试剂，而

在接近治疗终点时建议选择检测限较低的方法或试剂。

表 3. 病原体核酸定量检测方法比较

	qPCR	bDNA	LAMP	TMA	NASBA
灵敏度	高	较低	极高	高	较高
(LoD)	(12-15 IU/ml)	(600 IU/ml)		(10IU/ml)	(50IU/ml)
特异性	好	好	极好	好	好
线性范围	宽 (10^1 - 10^{7-8})	窄 (10^2 - 10^{5-6})	—	—	较宽 (10^1 - 10^6)
临床应用	多种病原体定量和 定性检测	定量和定性检测	仅用于 定性检测	仅用于 定性检测	定量和定性检测
缺点	—	—	灵敏度高易受污 染致假阳性;不能 扩增长片段	灵敏度高易受污 染致假阳性	—

以现有的 HCV RNA 检测为例进行介绍，RNA 定量检测技术有 bDNA 和 qPCR 等，TMA 目前仅用于定性检测。bDNA 不涉及核酸扩增反应，因此污染的可能性小，对实验室的要求较低，检测重复性好，受基因型影响小，但其灵敏度较低，不适合低水平 HCV RNA 的定量。近年来实时荧光定量 PCR 技术日趋成熟，HCV RNA 灵敏度逐渐提高，最低检测限可达 12-15 IU/ml，线性范围也不断拓宽，且无需对 PCR 产物进行后续操作，减少了气溶胶的污染。基于这些优势，其已成为目前定量检测的主流技术。灵敏度高有利于对低浓度样本准确检出，更准确地反映应答情况；宽泛的线性范围，可以覆盖大部分临床标本，减少二次检测；内标法定量可避免 PCR 反应管间差异，确保定量准确；自动化操作可有效

提高检测重复性，避免污染和假阳性；采用国际标准浓度单位可以确保不同方法间的可比性。

表 4. 目前常用的 HCV RNA 定量检测试剂比较

	Versant HCV RNA1.0	Abbot Real-time HCV	Cobas Taqman HCV	Versant HCV RNA 3.0	LCx HCV RNA Assay	SuperQuant RT-PCR	Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0	国产试剂 RT-PCR
检测方法	kPCR	Real-time PCR	Real-time PCR	bDNA	Real-time PCR	RT-PCR	RT-PCR	RT-PCR
检测限	15	12	15	615	25	30	600	500
线性范围	15-1.0×10 ⁸	12-1.0×10 ⁸	43-6.9×10 ⁷	615-7.7×10 ⁶	25-2.63×10 ⁶	30-1.47×10 ⁶	600-5.0×10 ⁵	1000-5.0×10 ⁷
定量方法	非竞争性 内标	内标	内标	外标	竞争性 内标	竞争性 内标	竞争性内标	外标
自动化	全自动	全自动	全自动	半自动	半自动	半自动	半自动	手工
浓度单位	IU/mL	IU/mL	IU/mL	IU/mL	IU/mL	cp/ml	IU/mL	IU/mL 或 cp/mL
基因型	1-6 型	1-6 型	1-6 型	1-6 型	1-6 型	—	1-6 型	不确定
FDA	N	Y	Y	Y	N	N	Y	N
CFDA	N	Y	Y	N	N	N	Y	Y

5.3.3 病原体核酸定性检测

上述介绍的 PCR 技术、DNA 序列分析技术、基因芯片技术、dHPLC 技术

以及能用于病原体核酸定量检测的技术都可应用于病原体核酸定性分子检测中。

5.3.3.1 病原体基因分型检测

许多病原体具有不同的基因型，它们的致病性差异很大，对药物的反应也不尽相同。因此基因分型在患者的治疗和疾病预后判定方面有非常重要的意义。目前检测基因型的方法主要包括 PCR 法、测序法（sanger 测序和焦磷酸测序）、RFLP、实时荧光 PCR—序列特异性引物（SSP）、HRM 法、基因芯片、DHPLC 及反相线性探针杂交法（LiPA）等。RFLP 由于较难进行质量控制，现在已少用于临床检测。而高分辨溶解曲线法、基因芯片和 DHPLC 等高灵敏度、高通量的基因分型方法日益受到重视。其中 DHPLC 技术能利用通用 PCR 引物从多种细菌的 16S 核糖体 RNA 基因中扩增含有高度变异序列的片段，将这些来自不同种类细菌的扩增产物与参照菌株的扩增产物混和后进行 DHPLC 检测，会产生一个独特的色谱峰图，可以作为鉴定细菌种类的分子指纹。HRM 方法不受突变碱基位点与类型局限，在进行针对已知位点的基因分型工作时，无需序列特异性探针，只需要合成低成本的非标记探针或者直接使用小片段扩增的方案，在 PCR 结束后直接运行高分辨溶解，即可完成对样品的分析。

以现有的 HCV 基因型检测为例进行介绍：HCV 分为 1-6 型及其 15 亚型（1a、1b、1c、2a、2b、2c、2i、2k、3a、3b、4a、5a、6a、6b 和 6k）。不同基因型感染的慢性丙型肝炎患者抗病毒治疗药物选择和疗程不同，病毒学应答也有差异。因此，对于慢性丙型肝炎患者，基因型检测有利于制定抗病毒治疗的个体化的方案。

表 5. 目前常用的 HCV 基因分型检测试剂比较

	Versant HCV Genotype	Abbot Real-time HCV Genotype	Trugene HCV genotyping
	2.0	II	
检测原理	LiPA	实时 PCR-SSP	直接测序和序列比对
分型区域	5'-UTR 和 core	5'-UTR 和 NS5B	5'-UTR
能否区分亚型	可区分主要亚型	可区分主要亚型	区分 1a 和 1b
自动化	半自动或手工	全自动	半自动

利用测序法检测时，在获得 HCV 序列后，经过分析获得基因型结果。分析序列时，要选择有代表性的 HCV 比对序列，避免主观选择导致的分型偏差。全球较权威的 HCV 序列数据库分别由日本 (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>)，欧洲 (<http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb>) 和美国 (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>) 所设立。应该注意确保靶序列尽可能多的代表株或类型内序列的多样性，再使用工具如 BLAST 等进行序列比对，构建系统进化树，用来分析基因型。

此外，目前也有很多在线的 HCV 基因分型工具，如 NIH 提供的分型工具 genotyping (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi)，以及 phyloplace (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/phyloplace/PhyloPlace.html>) 等，这些在线的分型工具使用简单，提交序列即可获得基因型结果，但需谨慎判断分型结果，最终的分型结果仍需要通过分子进化分析来确认。

5.3.3.2 病原体耐药基因检测

耐药性分为原发性耐药和继发性耐药，因此应选择治疗前和治疗中检测。治疗前检测，可以指导临床医生合理选择药物，不盲目用药、不过度用药；治疗中检测，可监测治疗过程中的药物疗效，预测疾病进展，为及时调整治疗方案提供客观依据。病原体耐药基因检测有助于临床医生分析患者的个体差异、病情进展

趋势和药物耐受性，制订个性化治疗方案。上述病原体定性分子检测的方法都可用于病原体耐药基因检测，常用技术特点见下表。目前普遍采用荧光定量 PCR 技术结合 DNA 直接测序技术，对耐药基因进行突变检测。采用测序法检测时，建议对突变位点所在的基因片段至少要进行正、反双向序列结果，得到不少于 2 段靶序列，仔细核对突变位点。关于序列拼接、手工编辑及比对等原则请参见《测序技术的个体化医学检测应用技术指南》。此外，目前也有很多在线的耐药基因突变工具，但需谨慎判断结果。

表 6. 常用病原体耐药基因检测技术特点

性能	DNA 测序	qPCR	基因芯片	DHPLC	HRM	RFLP
通量	高	低	高	高	高	低
灵敏度	高	高	高	很高	高	一般
重复性	好	好	好	好	好	好
局限性	耐药株要占 20%以上	仅检测已知位点、对靶基因要求较高	仅检测已知位点、对靶基因要求较高	杂合突变检测稍显困难	适于已知位点检测、仪器要求高	仅检测已知位点、操作繁琐、质控难
技术可靠性	金标准	--	--	--	--	--

需注意在没有选择压力的情况下，耐药突变基因的出现频率可能会低于野生型基因，而低频率的突变检测可能会存在一定的假阴性风险。此外，基因型检测和表型检测的耐药结果也可能存在差异。

5.3.3.3 与疗效相关的宿主基因检测

目前用于与疗效相关的宿主基因检测主要是人基因组 SNP 和基因型检测。虽然一些经典的定性分子检测技术，如 RFLP 和 SSCP 等技术仍在实践中广泛使

用,但一些高灵敏度、高通量的基因分型方法日益受到重视,这些技术包括:荧光定量 PCR、SNPlex 基因分型、焦磷酸测序、基因芯片以及 DHPLC 法等,可以满足大样本及多 SNP 位点的基因分型要求。目前普遍采用荧光定量 PCR 技术结合 DNA 直接测序技术对基因进行突变检测。

5.4 设备维护和校准

应按国家法规要求对强检设备(如生物安全柜等)进行检定。应进行外部校准的设备,如果符合检测目的和要求,可按制造商校准程序进行。应至少对分析设备的加样系统(如加样器等)、检测系统和温控系统(如基因扩增仪、温度计、恒温设备等)进行校准。具体的检定、校准频次和要求请参见《个体化医学检测质量保证指南》。

设备故障后,应首先分析故障原因,如果设备故障可能影响了方法学性能,可通过以下合适的方式进行相关的检测、验证:(1)可校准的项目实施校准验证,必要时实施校准;(2)质控物检验;(3)与其他仪器或方法比对,取5份覆盖测量区间的样品检测,至少4份样品测量结果偏倚 $\leq \pm 7.5\%$;(4)以前检验过的样品再检验,按照项目稳定性要求选取最长期限的覆盖测量区间的5个样品,至少4个样品测量结果偏倚 $\leq \pm 7.5\%$ 。当实验室使用两套及以上检测系统检测同一项目时,应有比对数据表明其检测结果的一致性,比对频次每年至少1次,样品数量不少于20个(可根据实验室情况酌情增减),浓度水平应覆盖测量区间。

5.5 人员培训

检验人员应具备良好的责任感和职业操守,掌握相应专业知识、熟练的检验操作技术,必须持证上岗。必须遵守各项实验室规章制度,定期进行专业知识和实验室安全的培训、考核。相应的具体要求请参见《个体化医学检测质量保证指

南》。

5.6 试剂性能验证

5.6.1 验证 (verification)

验证就是通过提供客观证据对规定要求已得到满足的认定,即指在临床实验室常规地使用已批准的方法和试剂之前进行的性能验证实验。定量检测项目的验证内容至少应包括精密度,正确度,线性和/或可报告范围,抗干扰能力等。定性检测项目的验证内容至少应包括检测限,准确度(方法学比较或与金标准比较),抗干扰能力等。性能验证是新的试剂或检测系统在临床应用前或试剂(检测系统)发生大的改变时进行。性能验证的通用要求请参见《个体化医学检测质量保证指南》,本文仅提供在感染性疾病个体化医学检测中的建议。

5.6.2 性能验证的内容

5.6.2.1 精密度或重复性

(1) 定量检测:

连续5天,每天检测1个分析批次,包括2个浓度水平,分别对每个浓度水平的样品重复检测4次,数据通过 \log_{10} 转换后使用,经过离群值检验,收集 $2 \times 20 = 40$ 个有效数据,并通过统计分析评价方法计算室内精密度(总精密度)和批内精密度,与试剂说明书上的允许范围进行比较,判断结果是否接受。

建议至少两个浓度水平的检测物质用于整个精密度试验,应尽可能地选择浓度范围跨越测量范围有意义的部分,以及接近医疗决定水平的浓度。

重复性指的是当在同一分析批中,对相同标本进行重复性检测时变异性的测量。

批间的精密度是当同一天对不同批次相同标本进行分析时的变异性的测量。日间

精密度指的是当对相同的材料或患者标本在一段时间(超过一天)进行分析时的

变异性的测量。

(2) 定性检测:

要包括足够的可重复分析的标本和合理的标本类型分布,计算并分析变异系数或阳性和阴性符合情况。采用阴性和阳性样本(如适合,增加临界浓度样本即C50 样本<重复多次测定各得到 50%阳性和 50%阴性结果的浓度>)或各基因型样本,每份样本重复检测 3 次,与允许范围进行比较,判断结果是否接受。

5.6.2.2 正确度

(1) 定量检测:

一种方法是采用参考材料(可来源于室间质量评价正确度验证计划、厂家提供的正确度验证计划的质控品、其他第三方供应商提供等),至少选择两个浓度水平的参考材料,对每个参考材料分别在 3~5 个不同批次中重复测量 3 次,比较均值与标定浓度值,计算偏倚。另一种方法是采用患者标本,收集临床标本 20 例,标本浓度尽量涵盖线性范围。收集后的标本在一周内集中检测,每个标本重复检测 2 次。取均值与医院检测系统结果进行比对。计算两者线性相关系数(R),并进一步计算两个项目各自的回归曲线。分别计算当检测值 $\log_{10}=3、4、5、6、7$ 时的允许总误差(total error, TE)。计算 $TE = \text{偏倚 (Bias)} + 3CV$ (这里的 CV 采用精密度性能评估中两个浓度的精密度均值),与目标 TE 比较(目标 TE 为厂商允许的总误差 10%), $TE < 10\%$ 表示可接受。

(2) 定性检测:

收集临床标本,标本要包括阴性和阳性样本(如适合,增加临界浓度样本)或各基因型样本。收集后的标本在一周内集中检测,结果与医院检测系统结果进行比对。根据阴性和阳性的符合程度,判断结果是否可以接受。

5.6.2.3 分析测量范围（可报告范围）

(1) 定量检测：

常用方法为选取一份结果接近线性范围上限的患者标本，用正常人阴性标本按1:10，1:100，1:1000，1:10000，1:100000系列稀释（比制造商声明的分析测量范围低一个数量级），以稀释计算值作为理论值，各稀释样品的实测值与理论值进行回归分析，对每个样本进行3次检测，经统计后拟合回归线 $y=bx+a$ 。将拟合回归线的相关系数 $r \geq 0.975$ ($r^2 \geq 0.95$)，b值在 1 ± 0.05 范围作为判断标准。

用于可报告范围验证的物质可以选择：基质相当的商品化线性验证物质，能力验证物质，稳定的患者样本，定值的混合患者样本，一级或二级标准物质，系统配套的不同批号的校准品，涵盖分析测量范围的定值质控品。

(2) 定性检测：

尽可能包括报告范围内的所有结果的样本，如阴性和阳性样本（如适合，增加临界浓度样本）或各基因型样本。用于可报告范围验证的物质可以选择：基质相当的商品化验证物质，能力验证物质，稳定的患者样本，系统配套的不同批号的校准品，涵盖包括范围的质控品。

5.6.2.4 参考区间

定量检测：建议采用20个患者样品来验证参考区间。

5.6.2.5 检测限

参照《个体化医学检测质量保证指南》。

5.6.2.6 抗干扰能力

(1) 干扰反应

干扰物是患者标本中存在的，并且能够改变被测量的检测结果准确性的物

质。干扰物可来自外源性和内源性。外源性干扰物可能是药物、抗凝剂或核酸提取试剂的残留物（如 EDTA、洗涤剂、乙醇、离液剂等）等。内源性干扰物可能由于疾病因素所致（比如胆红素、血红蛋白或脂类），更常见的是标本固有因素，如非靶核苷酸可能会干扰引物退火，大量核苷酸会非特异性干扰酶的作用。

常用识别干扰物的方法是在特定已知患者标本中添加纯的假定干扰物质。例如，在 CSF 中添加模拟外伤污染的物质如全血、血红蛋白和血红素（在 $0.8 \mu\text{mol/L}$ 时能够抑制扩增）。干扰物的浓度水平应该能代表患者标本中的水平，最好高于患者标本中可能出现的水平。

(2) 交叉反应

产生交叉反应的靶物质可能包括：人类基因组 DNA、含菌标本中的定植群、其它导致类似临床表现的病原以及遗传相关物质。例如，对于上呼吸道腺病毒的定量检测，上呼吸道常见的定植群就会造成交叉反应。

为了评估潜在交叉反应，可以在特定的已知患者标本中加入一组有密切相关性的核酸序列，其浓度水平能代表或超出患者标本中可能出现的水平。

6. 分析后质量保证

6.1 结果的报告

实验室应记录并保存关于每个标本检测情况的充分信息，并应根据相关的法律法规和相应的管理规定对具有重要意义的传染病（如人类免疫缺陷综合征、肺结核等）的诊断及时与负责的临床医师沟通并备案，同时注意保护患者的医疗信息。关于结果报告的通用要求请详见《个体化医学检测质量保证指南》。

感染性疾病个体化医学检测结果报告须注意以下要点：

(1) 对于定量检测，不同检测方案的检测限和可报告范围差异较大，如在 HCV

病毒载量检测中,bDNA 方法的线性范围为 $1.0 \times 10^3 \sim 8 \times 10^6$ IU/ml (Versant bDNA assay)、检测限为 1.0×10^3 IU/ml, 而实时定量 PCR 方法的线性范围为 $15 \sim 1.7 \times 10^8$ IU/ml (Roche CAP/CTM) 或 $12 \sim 10^7$ IU/ml (Abbott RealTime HCV)、检测限为 15 IU/ml 或 10.5 IU/ml。因此, 应根据患者实际情况选择合适的检验项目。对于定量检测的结果报告须注明项目的参考区间或检测方法的检测限和可报告范围。

(2) 由于个体内生物变异的存在, 病原体核酸定量检测结果可能在一定的范围内波动, 但对患者病情判断无影响。如果可能, 应在定量检测的结果报告中加入变异范围, 如 HIV-1 病毒载量的变异容许限为 $<0.5\text{Log}$, HCV 病毒载量的变异容许限为 $<1\text{Log}$ 。

(3) 必要时需标注检测可能的局限性, 以及可能会影响结果判读和应用的因素, 如①由于现有的分子生物学方法仅检测病原体核酸片段, 并不意味着一定是有感染性的病原体; ②病原微生物基因变异, 即不同基因型、亚型、准种, 可能引起检测差异; ③患者有其他并发症时 (如 HDV 感染会抑制 HBV 复制) 或产生某些免疫反应时 (接种、感染时间、免疫抑制治疗等) 可能对检测有影响等。

6.2 结果的解释与医患的沟通

检测结果的解释既要具有专业性, 又要清晰明了, 使临床医生和患者能够正确理解检测结果。对实验室检测结果的解释提出以下建议: ①实验室应遵循相关专业组织的建议和指南进行检测结果的解释; ②对于所检测的基因, 在其野生型、所报告的突变型和多态性方面, 应具备充分的信息 (来源于文献、基因数据库等); ③检验的临床性能特征与其诊断的灵敏度和特异性、(各种) 目标人群中其阳性和阴性预测值或似然比以及临床应用有关; ④实验室如遇到检测结果与检验临床

目的无关的偶然性遗传学发现，应及时与申请医生、患者和患者家人进行沟通并说明情况。

6.3 检测后标本的保存和处理

应根据样品的类型、检验方法或其他适用要求来确定保存时间和保存条件。建议保存原始样品，便于复查；对于病原体核酸在原始样品中稳定性较差的，建议保存经适当处理过的样品（如经液化处理的痰液标本）、核酸提取物（如体液标本中提取的病原体核酸）和/或核酸扩增产物。为便于追溯，凝胶图像应通过扫描、拍照等方式留作技术记录保存，保存期限及废物处理等要求请参见《个体化医学检测质量保证指南》、《临床实验室废物处理原则》等相关行业要求。

7. 质量保证

7.1 标准操作程序（SOP）

建立 SOP 文件体系，以保证检测各环节标准、有序地进行，确保检测结果的真实性、准确性和可重复性。SOP 文件及其相关记录表单的编写，应确保其准确性和可操作性，内容须包括检测的所有环节。实验过程中应严格执行 SOP，不能擅自修改。具体编写要求和内容请参见《个体化医学检测质量保证指南》。

7.2 质控品

直接检测病原体核酸，其检测结果的准确性易受到标本类型、检测方法等多种因素的影响，因此应尽可能使用与患者标本接近的质控品，且其检测过程应与患者标本的检测过程保持一致。理想的质控品具有以下特点：容易制备；在贮存和使用过程中具有足够的稳定性；无生物传染危险性；能监测检测的全过程；结果可靠。目前病原体核酸检测中常用的质控品主要包括质粒DNA和阳性患者血清两种。质粒DNA作为质控品无生物传染危险性，易于定量，稳定性相对较好，

但不能参与核酸提取过程，主要用于制备耐药基因突变、基因多态性和基因型等定性检测的质控品，尤其用来制备少见基因突变或基因型的质控品，以及不易保存或稳定性较差标本的定量检测。阳性患者血清作为质控品制备相对简单，但具有传染性，而且其稳定性有限，在反复冻融后病毒载量会明显降低，具有明显的批间变异。

对于病原体核酸的定量检测，每次检测应设置至少一个阴性质控品和两个浓度水平的阳性质控品，其浓度应在检测的线性范围内，尽可能选择与医学决定水平或与其接近的浓度。为保证检测结果的准确性，必要时可向每份标本中加入内部校准品以评估整个检测过程。

对于病原体耐药基因突变、基因型或人基因多态性等定性检测项目，每次检测应设置阴性质控品和最能反映检测情况的突变型或基因型的阳性质控品（接近cut-off值的弱阳性质控品为宜），每批检测的质控至少应有一种基因突变型或基因型，阳性质控品应包括正常和异常或不同常见基因突变或基因型。密切关注相关研究进展及数据库内容更新，订购或制备相应质控品，对于少见突变型或基因型也应定期进行检测。对于人基因多态性检测项目在上述质控品基础上还需增加空白对照质控，以监测实验体系是否存在外源污染。

如果在单个扩增运行中检验多个提取批次的样本，则每个提取批次都需要进行提取对照，必须在单个扩增运行中检验所有提取对照品。定期对内部或外部质控品进行评估，当超出合格范围或出现失控趋势时必须采取纠正措施。

7.3 室内质量控制

7.3.1 定量检测项目的室内质量控制

感染性疾病个体化医学检测的定量检测项目通常采用统计学方法进行室内质量控制，其中以Levey-Jennings质控图结合Westgard多规则质控法最为常用。其具体操作步骤如下：

(1) 设定质控图的靶值和质控限：

在开始室内质控时，首先要建立质控图的靶值和质控限。新批号的质控品的各个测定项目需自行确定均值和标准差，均值必须在实验室内使用现行的测定方法进行确定，质控品的标定值只能作为靶值的参考。

新批号的质控品应与当前使用的质控品一起进行测定。根据20次质控测定结果，对数据进行离群值检验（剔除超过3S的数据），计算出均值作为靶值和标准差。以此暂定靶值和标准差作为下一个月室内质控图的靶值和标准差进行室内质控；一个月结束后，将该月的在控结果与前20个质控测定结果汇集在一起，计算累积均值和标准差（第1个月），以此累积的均值和标准差作为下一个月质控图的靶值和标准差。重复上述操作过程，连续5个月。在以上工作的基础上，以最初20个数据和5个月在控数据汇集的所有数据计算出累积均值和标准差，以此累积均值和标准差作为质控品有效期内的常用靶值和标准差，并以此作为以后室内质控图的均值和标准差。

若项目长期使用（一年以上），检测系统稳定，各月、各季间变异系数相差不大，可采用经验变异系数（采用去年一年的质控结果进行分析，设定该项目的经验变异系数，每项目要分浓度水平进行设定），靶值设定同上。

(2) 室内质控规则：

阳性质控样本： 1_{3S} ， 2_{2S} ， R_{4S} 等。

1_{3S} ：一个质控结果超过均值 $\pm 3s$ ，就判断失控，该规则主要对随机误差敏感。

2_{2S} ：两个连续的质控结果同时超过均值 $+2s$ 或均值 $-2s$ ，就判断失控，该规

则主要对系统误差敏感。

R_{4s} : 一个质控结果超过均值 $+2s$ ，另一个质控结果超过均值 $-2s$ ，就判断失控，该规则主要对随机误差敏感。

4_{1s} : 有连续4次的控制值超出均值 $1s$ ，包括1个水平的质控品连续4次质控结果超出均值 $1s$ ，以及2个水平的质控品同时连续2次的质控结果同方向均值 $1s$ ，该规则主要对系统误差敏感。

10均值失控规则：连续10次质控结果在均值的一侧，包括1个水平的质控品连续10次质控结果在均值的同一侧，以及2个水平的质控品同时连续各有5次的质控结果在均值的同一侧，该规则主要对系统误差敏感。

阴性质控样本：阴性质控样本出现阳性，就判断失控。

将每天的质控结果描绘在质控图上用以监测检测系统的误差趋势，用Westgard规则监测分子诊断，采取改进措施并防止检测故障。

(3) 更换质控品：

使用新批号的质控品时，重复（1）的过程，在“旧”批号质控品使用结束前，将新批号质控品与“旧”批号质控品同时进行测定，设立新质控图的靶值和标准差。

(4) 重建质控图：

1) 更换质控品批号时。

2) 如果发现有靶值显著性的差异：检测系统发生改变，如更换试剂批号，造成月测定均值明显偏离靶值 $1SD$ 以上；同一方向趋势性变异：三月内均值向同一方向偏移 $1SD$ 以上；连续三个月月变异系数增加并出现过多失控时；连续三个月月变异系数减少，95%分布在 $\pm 1SD$ 内，出现上述情况要分析原因及时采取应对措施，若排除检测系统问题则需重建质控图，对质控图的均值、标准差进行修改。

(5) 质控图的内容：

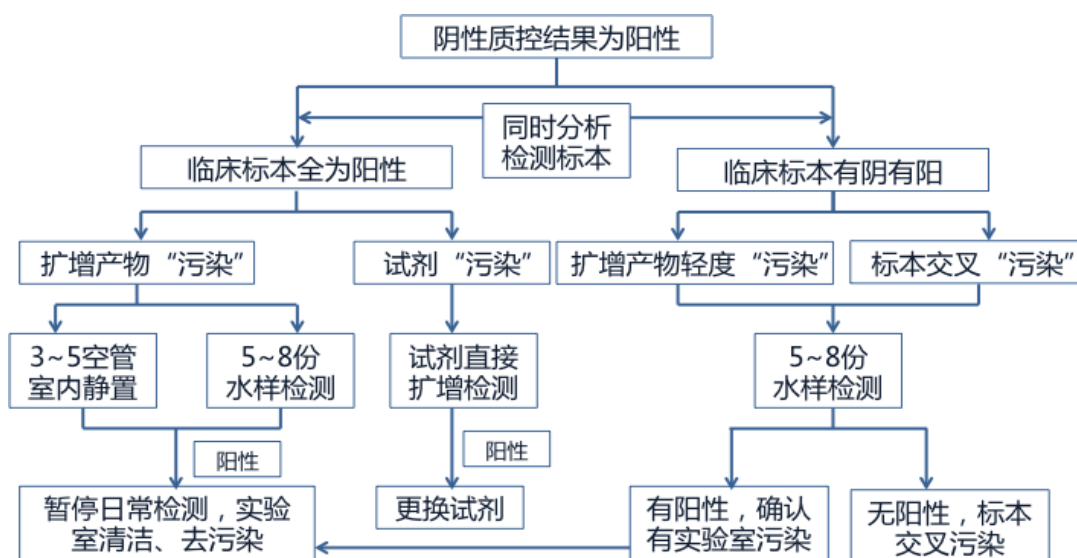
定量检测项目质控图应包括质控结果、质控物名称、浓度、批号和有效期、质控图的中心线和控制界线、分析仪器名称和唯一标识、方法学名称、检验项目名称、试剂和校准物批号、每个数据点的日期和时间、干扰行为的记录、质控人员及审核人员的签字、失控时的分析处理程序和纠正措施等。

7.3.2 定性检测项目的室内质量控制

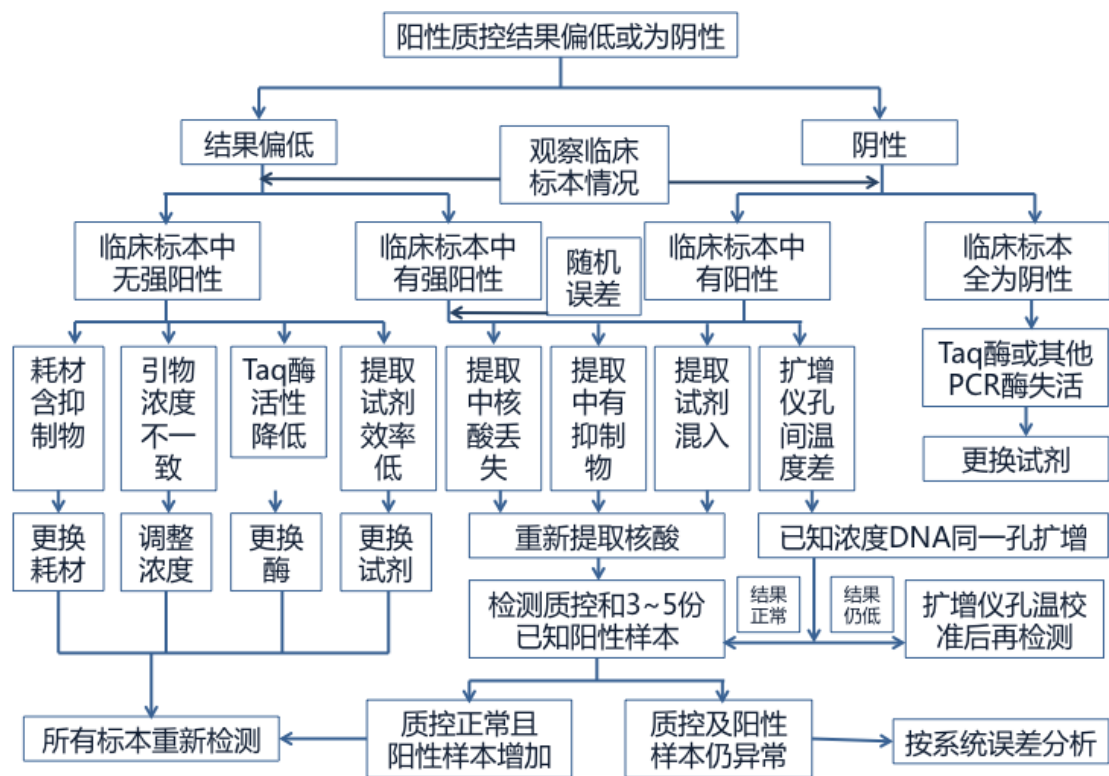
定性检测项目通常采用非统计学方法进行室内质量控制，具体方法请参见《个体化医学检测质量保证指南》。此外，感染性疾病个体化医学检测的定性检测项目还须定期统计阴阳性符合预期，即与本地区耐药基因发生率、基因型分布和人类基因多态性分布频率相符合。如条件允许，应与病原体培养、药敏试验等检测结果进行比对。突然出现的阳性结果，尤其是弱阳性结果，可能提示存在污染，应该引起关注。阳性值的降低可能提示分析灵敏度的降低，原因可能有试剂缺陷、过程差错或者突发的靶序列变异（探针或引物不结合）。

7.3.3 常见的失控情况处理及原因分析

(1) 常见的阴性质控失控原因分析流程（图1）：



(2) 常见的阳性质控失控原因分析流程（图2）：



(3) 造成假阴性或低值的常见原因：

①尿液、粪便、支气管肺泡灌洗液和全血标本中的内源性核酸酶，可能造成核酸降解；②尿液和粪便标本中 pH 值偏低，可能造成核酸完整性下降；③含有分枝杆菌或葡萄球菌的体液和血液标本中的酸性多糖，可能抑制聚合酶的作用；④甲醛固定的组织标本，会引起 DNA 交联，可能造成核酸完整性下降；⑤全血和骨髓标本中，由于 DNA 含量较高，可能抑制 PCR 反应；⑥体液和血液标本中的血红素、甘油三脂和胆盐等，可能会抑制 PCR 反应；⑦抗凝剂肝素可能会抑制 PCR 反应；⑧滑石粉可能会抑制 PCR 反应；⑨外源性核酸酶污染，可能造成核酸降解。

7.4 室间质量评价

应按照《个体化医学检测质量保证指南》等相关要求参加相应的能力验证/室间质评。对于尚未开展能力验证/室间质评的检测项目，可以通过与其他实验

室(如已获认可的实验室、使用相同检测方法的实验室、使用配套系统的实验室)

以比对的方式进行替代评估实验,以评估实验室检测质量。

在进行替代评估实验时,建议满足如下要求:

(1) 比对实验室及检测系统选择原则:为保证检验结果的准确性和检测样本运输的安全性和及时性,优先选择同级或相近的、物流可以尽快到达的医疗机构临床检测实验室进行;使用不同生物参考区间的检测系统间不宜进行比对;

(2) 样品数量:对于定性检测项目,至少5份标本,包括正常和异常水平或不同常见基因突变或基因型;对于定量检测项目,至少5份标本,浓度水平应覆盖测量区间;

(3) 比对频率:每年至少2次;

(4) 判定标准:应有 $\geq 80\%$ 的结果符合要求。

8. 感染性疾病个体化医学分子检测的应用

乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、结核分枝杆菌和人类免疫缺陷病毒是目前个体化医学检测开展最广泛的病原体,分子检测主要包括病毒载量、耐药检测、基因型分型和相关人类基因多态性等。研究发现,病毒的不同基因型对一些抗病毒药物治疗反应有差异,在抗病毒药物治疗过程中,病毒也会产生相应的耐药突变,使得治疗不再有效。因此,抗病毒治疗前的基因型检测,用药过程中耐药突变检测,决定了特定病毒感染个体的治疗用药选择与更换选择。此外,研究发现,在抗病毒治疗过程中,病毒载量的检测对评价患者抗病毒疗效和预后有意义。如果病毒载量随着治疗逐步或迅速下降,说明抗病毒治疗有效;反之,则须重新考虑药物的选择。

8.1 乙型肝炎病毒感染诊疗的个体化分子检测

乙型肝炎病毒（HBV）为乙型肝炎的致病病原体。抗病毒治疗的药物主要分为干扰素和核苷酸类药物。干扰素的主要优点包括有限疗程、e 抗原血清转换率高、部分患者可以获得 s 抗原消失及无耐药。主要缺点包括注射给药，副作用相对较多。核苷（酸）类药物有三类：L-核苷类（拉米夫定、替比夫定和恩曲他滨），脱氧鸟苷类似物（恩替卡韦）和开环磷酸核苷类似物（阿德福韦酯和替诺福韦酯）。HBV DNA 定量是病毒存在和复制最可靠的指标，广泛应用于临床诊断和药物疗效评价；不同基因型感染后的感染过程、病毒清除和对治疗的疗效可能不同，检测基因型可能有助于药物的选择。通过病毒检测有助于建立正确的治疗方案，适时进行病毒的耐药性检测，为及时调整治疗方案提供保证。

8.1.1 HBV DNA 定量检测

HBV DNA 定量检测是慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗及疗效评价的重要指标，是直接反映 HBV 复制状态及传染性的最佳指标，在慢性乙型肝炎治疗的过程中需持续对 HBVDNA 定期检测。

8.1.1.1 检测方法

实时荧光定量 PCR 技术：该方法是目前 HBV DNA 载量检测的主要方法，具有较高的灵敏度和较广的线性范围。

8.1.1.2 检测时间

(1) 干扰素治疗患者：在治疗 12 周和 24 周时评估 HBV DNA 水平以验证初始应答。需监测治疗 24 周、48 周 HBV DNA 和治疗 24 周时 HBeAg 和抗 HBe 抗，至 HBeAg 血清转换，血清 HBV DNA 低于检测下限。

(2) 核苷类似物治疗患者：在治疗 12 周时检测 HBV DNA 水平以确定发生病毒性应答。之后每 12-24 周监测 1 次。HBV DNA 低于检测下限（10-15 IU/ml）

为治疗有效的标志。

8.1.1.3 标本类型

主要是血清或血浆，具体需参照试剂盒说明书对标本类型的要求。所有采集的标本应保存于 2-8℃，如长期保存，则需保存在-70℃或更低温度，避免反复冻融。

8.1.2 HBV 基因突变与耐药

HBV 基因组结构特殊，变异率极高。核苷酸类药物抗病毒的作用靶点为具有逆转录酶活性的 HBV 聚合酶，长期用药患者的 HBV，在药物选择性压力下，多聚酶区产生耐药性突变。因此，对病毒进行基因型耐药检测，有助于医生及时调整治疗方案，提高抗病毒治疗的效果，改善患者预后。

8.1.2.1 HBV 抗病毒治疗的耐药突变

(1) 与拉米夫定耐药相关的变异：

拉米夫定与 HBV DNA 多聚酶 YMDD 序列结合，起到抑制病毒复制、降低 HBV DNA 水平的作用。HBV 对拉米夫定最常见的耐药变异就是 YMDD 变异。病毒出现变异耐药后，应根据患者的个体情况改用其它抗病毒药物治疗，如干扰素及其它核苷类药物。

(2) 与阿德福韦酯耐药相关的变异：

在长期接受阿德福韦酯治疗的病例中发现的耐药变异为 N236T 或 A181V，但其发生率很低。所有拉米夫定耐药株对阿德福韦酯均敏感，而阿德福韦酯耐药株对拉米夫定也敏感。

(3) 与恩替卡韦耐药相关的变异：

恩替卡韦可抑制拉米夫定耐药病毒株的复制，但拉米夫定耐药株对恩替卡韦敏感性低于野毒株，并且容易发生对恩替卡韦的耐药。目前研究结果显示，产生

恩替卡韦耐药性的先决条件是需要有拉米夫定耐药变异。在拉米夫定耐药变异株上，I169T、184A/G/I/S、S202G/I 或 M250V 变异的出现，可形成对恩替卡韦的耐药性。

(4) 与替比夫定耐药相关的变异：

替比夫定的耐药屏障低，在基线病毒水平高和治疗 24 周后仍能检测到病毒的患者中，病毒耐药发生率高。

表 7. 常见的 HBV 基因型耐药与药物敏感性

HBV 基因突变	敏感水平				
	拉米夫定	替比夫定	恩替卡韦	阿德福韦酯	替诺福韦
野生株	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	S	S
L180M+ M204V	R	R	I	S	S
A181T/V	I	S	S	R	S
N236T	S	S	S	R	I
L180M+ M204V [±] I169T [±] V173L [±] M250V	R	R	R	S	S
L180M+ M204V/I [±] T184G [±] S202I/G	R	R	R	S	S

注：S-敏感 I-不敏感 R-抵抗

8.1.2.2 常用的检测方法

(1) DNA 序列分析：

DNA 序列分析是检测基因突变最直接可信的方法，是所有其他检测变异技术的基础。

(2) 实时荧光 PCR 技术:

该方法能计算突变株比例,与测序法符合率非常高,可作为检测慢性乙肝患者拉米夫定耐药的有效手段。

(3) 微阵列技术:

一种高通量的检测新技术,具有大通量、快速、灵敏的优势,但有一定的假阳性和假阴性率,不能检测出新位点的变异。

(4) 质谱技术:

该技术可同时检测目前我国临床使用的四种核苷酸药物的多个耐药位点。

8.1.2.3 检测时间

对于使用核苷(酸)类似物抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者,应在抗病毒治疗中检测到 HBV DNA 的变化,如果 HBV DNA 达到低于检测水平后重新增高或者较最低水平上升 1 个数量级,应该检测耐药基因型。

8.1.2.4 标本类型

同上。

8.2 丙型肝炎病毒感染诊疗的个体化分子检测

大多数 HCV 感染者在急性期及慢性感染早期症状隐匿,伴有高水平的病毒血症,可能伴有 ALT 升高。HCV 急性感染后 HCV RNA 常比抗-HCV 先查出。HCV RNA 最早可于暴露后 2 周检出, HCV 抗原可于 HCV RNA 出现后 1-2 天检出,而抗-HCV 直到 8-12 周才能检出。监测 HCV RNA 的变化来评价机体的病毒学应答。HCV RNA 水平或定性结果可作为 HCV 治疗的预测指标和调整治疗方案的重要依据。持续病毒学应答即治疗结束后 24 周 HCV RNA 检测阴性,是丙型肝炎治疗的理想结果。

HCV 感染宿主后，经过一定时间，在感染者体内形成一个以优势株为主的相关突变株的病毒群，称为准种。根据现有 HCV 分离株的数据，HCV 基因分型原则为：各分离株 HCV 基因组的核苷酸序列的变异>30%时确定为基因型；核苷酸变异 15%-30%为不同的基因亚型；核苷酸变异<15% 为同一亚型；核苷酸变异>10%时称为分离株；HCV 感染者体内同时存在的、不同序列组成的、并具有很高同源性的 HCV 变异株群体，称为准种。在我国，HCV 主要的基因型为 1b，其次为 2a，还有其它较少见的型别。

近年来，针对 HCV 生活周期中病毒蛋白靶向特异性治疗的许多小分子化合物研究进展非常迅速，这些药物被统一命名为直接作用抗病毒药物（directly acting antivirals, DAAs）。含 DAAs 的方案尤其适用于既往聚乙二醇干扰素和利巴韦林治疗后复发或是对聚乙二醇干扰素- α 联合利巴韦林治疗无应答的患者。初治患者也可考虑使用含 DAAs 的方案，以缩短疗程、增加耐受性、提高持续病毒学应答率。目前，各临床指南中不同的 DAAs 治疗方案需要根据患者感染病毒的基因型甚至基因亚型，以及患者肝纤维化程度、肝硬化状态来确定治疗的药物选择和确定疗程。针对所有基因型的泛基因型 DAAs 药物已获得美国 FDA 批准，但尚未在我国上市。DAAs 可能与许多药物存在相互作用，因此，对所有接受 DAAs 治疗的患者，应该考虑药物相互作用的可能性，要求在开始治疗前以及治疗期间开始服用其他用药之前，对药物相互作用的风险进行周密评估。每种 DAAs 的处方信息包含药物相互作用的重要信息。主要的网络资源为 www.hep-druginteractions.org，该网站会定期对推荐意见进行更新。此外，在接受 DAAs 药物治疗 HCV 后，体内的 HBV 发生被激活（一般在用药后 4~8 周 HBV 被激活），在少数患者身上，DAAs 药物相关的被激活甚至导致了死亡，目前尚

不清楚 DAAs 药物治疗后发生 HBV 被激活的原因，但是美国 FDA 已要求在相关 DAAs 药物标签中添加黑框警告，以警示 HBV 再活化的风险。

在 HCV 治疗中，需在用药前、用药过程中合理使用不同的个体化分子检测，以期达到治疗效果的优化。如根据治疗前检测 HCV 基因型、患者感染的 HCV 病毒载量、丙型肝炎相关人类基因多态性的检测结果以及在治疗过程中监测 HCV 病毒载量的变化和耐药基因等，合理指导临床选择并及时调整 HCV 慢性感染的治疗方案。

8.2.1 HCV RNA 定量分子检测

无论采用哪一种治疗方案，均需要在治疗前检测基线 HCV RNA 水平、基因型，以确定治疗方案。在治疗过程中监测 HCV RNA 的变化，对于及时估计应答情况、及时调整疗程、治疗药物和剂量尤为重要。治疗后仍需要检测 HCV RNA，如果 HCV RNA 水平转为阳性，即可判断为复发。

8.2.1.1 常用检测方法及试剂选择

(1) HCV RNA 定量检测的方法：

RNA 定量方法有分支 DNA 和实时荧光定量 PCR 等。分支 DNA 优点在于不涉及核酸扩增，污染的可能性小，不足在于灵敏度低，不适合低水平 HCV RNA 的定量。

(2) HCV RNA 定量检测试剂的选择：

评价 HCV RNA 检测试剂的性能，应注意以下方面：试剂盒最低检测限（分析敏感性），定量检测线性范围，定量结果的准确性、精密度、特异性，对不同基因型定量的准确性，对不同基因型样本的检测下限及线性关系是否一致。评价 HCV RNA 检测试剂是否满足个体化治疗的检测要求，最重要的是 HCV RNA 的

最低检测下限和定量结果的准确性。

8.2.1.2 检测的时间

在治疗过程中根据患者的治疗药物、临床表现等对 HCV RNA 水平进行必要的监测。

8.2.1.3 标本类型

主要为血清或血浆，具体需参考试剂盒说明书对标本类型的要求。所有采集的标本应保存于 2-8℃，如长期保存，则需保存在-70℃或更低温度，避免反复冻融。

8.2.2 HCV RNA 基因型检测

在开始治疗前，必须对 HCV 基因型和基因 1 型的亚型（1a 或 1b）进行评估，并且和其他参数一起，用于确定治疗方案

8.2.2.1 常用检测方法的选择

(1) 测序是检测 HCV 基因型最准确的方法，其他的方法有限制性片段长度多态性、实时荧光 PCR-序列特异性引物、基因芯片及反相线性探针杂交法等。在临床实验室比较容易实现标准化同时操作方便的是 HCV 分型试剂。

(2) HCV 基因分型区域的选择：检测 HCV 基因型最准确的方法就是对基因组的某个区进行 PCR 扩增，测序及进化树分析，最基本的基因区是 5'UTR、CE 和 NS5b。

8.2.2.2 检测时间

原则上应在 HCV 慢性感染者治疗前，检测 HCV RNA 基因型以预测治疗效果，并确定治疗方案。

8.2.2.3 标本类型

同上。

8.2.3 HCV 抗病毒治疗的耐药突变

可通过对 HCV NS5A 区氨基酸 24-93 位点进行测序，从而对 HCV 对 NS5A 抑制剂的耐药性进行评估。检测应该基于种群测序。将耐药相关替换（resistance-associated substitutions, RAS）报告为“存在”或“无”，或截断值为 15% 的深度测序（必须 15% 以上的生成序列存在 RAS，才考虑为耐药突变）。

8.2.3.1 检测时间

对于使用 NS5A 抑制剂抗病毒治疗的丙型肝炎患者，在抗病毒治疗中检测到 HCV RNA 的变化，如果 HCV RNA 达到低于检测水平后重新增高或者较最低水平上升 1 个数量级，考虑检测耐药基因型。

8.2.3.2 标本类型

同上。

8.2.4 与丙型肝炎疗效相关的人类基因多态性检测

已发现的与 1 型和 4 型 HCV 感染者的治疗效果密切相关的 IL-28b SNPs 主要有 3 种：SNP rs1297860、SNPrs8099917、SNPrs12980275。

(1) IL28b 基因多态性检测方法：

主要有直接测序法、高分辨率熔解曲线法、杂交探针法、Invader 法、Taqman SNP 基因型检测法和基因芯片法，以前两种方法应用较多。

(2) IL28b 基因多态性检测的标本类型：

为全血，具体需参考试剂盒说明书对标本类型的要求。

8.3 结核分枝杆菌感染诊疗的个体化分子检测

结核病的个体化治疗是根据患者的抗结核治疗史和个体药敏试验结果来确定不同治疗方案。结核耐药基因检测在结核个体化诊疗中具有举足轻重的地位，

快速准确的耐药基因监测是结核病有效治疗的前提保证。

8.3.1 结核分枝杆菌的耐药检测

结核病耐药基因检测是结核病传染控制的关键，也是有效治疗的前提，医生可根据每个患者抗结核治疗史和药敏试验结果来制订个体化治疗方案，以确保治疗顺利完成，同时也提高了耐药结核病痰菌的阴转率。

8.3.1.1 常用检测方法

结核分枝杆菌耐药基因型检测方法的主要特点是试验周期短，免于繁琐的培养步骤。主要方法有线性探针法、实时定量 PCR 法、芯片法和焦磷酸测序法。结核分枝杆菌耐药基因型检测方法主要以检测耐药基因的相关突变来鉴别耐药株。

8.3.1.2 结核分枝杆菌耐药检测的标本收集、处理和运输

(1) 标本收集治疗开始前留取痰标本，最好是晨痰。收集合格的痰标本需要事先对患者说明情况，留取合格标本。

(2) 标本处理必须使用专门容器盛痰标本，以避免泄露和污染。

(3) 标本运输结核病患者特别是耐药结核病可疑者的痰标本和培养物的运输有风险，应该建立确保感染性物质安全包装和运输的专门系统。

8.4 人获得性免疫缺陷病毒感染的个体化分子检测

获得性免疫缺陷综合征是由 HIV 感染引起的一种慢性传染性疾病。病毒核酸定量检测即病毒载量检测，是指检测每毫升血浆中病毒颗粒的数量。病毒载量检测主要用于监测抗病毒治疗疗效，判定疾病的进程和预后，急性期和晚期诊断、婴幼儿早期诊断以及 HIV 抗体不确定的情况下，通过病毒载量检测提供辅助诊断。

8.4.1 HIV-1 RNA 检测

目前 HIV-1 RNA 病毒载量检测有多种方法，主要基于靶核酸扩增和信号放大扩增两种原理。

8.4.1.1 检测方法

(1) 实时荧光定量 RT-PCR 技术：

该技术在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，因此，只要获得未知样品的 Ct 值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。检测过程可分为：抽提和浓缩目标 RNA 分子；利用逆转录酶将病毒 RNA 逆转录为 cDNA，通过 DNA 聚合酶对特定片段进行实时扩增；利用荧光标记的寡核苷酸探针检测 PCR 的产物，检测的原理基于荧光信号增长曲线与循环数相关，基于检测阈值的设定，当病毒载量高时，低循环数即能检测到荧光信号，当病毒载量低时，高循环数时才能检测到荧光。

目前已有多种 HIV-1 病毒载量检测方法采用该原理，包括 Cobas Amplicor Taqman 检测系统、M2000 检测系统和一些国内产品。Cobas Amplicor Taqman v2.0 系统是全自动化的实时荧光定量 PCR 病毒载量平台，以 Taqman 荧光探针为基础。Taqman 荧光探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个荧光发射基团和一个荧光淬灭基团，探针完整时，发射基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR 扩增时，Taq 酶的 5'—3'外切酶活性将探针酶切降解，使荧光发射基团和荧光淬灭基团分离，荧光监测系统可接收到荧光信号，荧光信号的累积与 PCR 产物形成

同步,通过在核酸提取过程中加入的已知浓度的与靶基因同步扩增的内部标准品(QS)实现定量。扩增靶基因位置是 gag 基因区和 LTR 区,样本进样量是 0.85ml,适用于 HIV-1 M 组和 O 组毒株,检测的线性范围为 20~10,000,000 copies/ml。M2000 系统是利用 RT-PCR 法,在开始制备样本时,对每个样本加入与 HIV-1 目标序列无关的 RNA 序列,这种不相关的 RNA 序列通过 RT-PCR 被同时扩增,从而充当内部质控品(IC)。每个扩增循环中存在的 HIV-1 目标序列总量通过含荧光标记的寡核苷酸探针测定,检测到荧光信号的扩增循环与初始样本中存在的 HIV-1 RNA 浓度对数成比例。扩增靶基因位置是 pol 基因区,样本进样量是 0.2ml 或 1.0ml,适用于 HIV-1 M 组 A-H 亚型、CRF01_AE、CRF02_AG、O 组和 N 组毒株,检测的线性范围为 40~10,000,000 copies/ml。

(2) 核酸序列依赖性扩增(NASBA)技术:

该技术是以等温方式直接扩增 HIV-1 RNA,其扩增基础在于系统内的混合酶系统,在体外模拟逆转录病毒体内复制过程。此方法可分为三个步骤:核酸提取、扩增和等温检测。代表产品 NucliSensEasy Q HIV-1 v2.0 系统是利用靶特异的分子信标进行定量检测。分子信标的 DNA 寡核苷酸片段包含一段可特异结合靶 RNA 的序列,当 RNA 互补链不存在时,分子信标维持内部发夹结构,使猝灭基团处于非常接近荧光素的位置,荧光信号被猝灭;当分子信标与互补靶序列结合,发夹打开释放荧光信号,报告靶序列的存在。使用两个不同的分子信标,一个是针对野毒株 HIV-1 RNA 的扩增子,另一个针对内标物 RNA(calibrator)的扩增子,各使用不同荧光染料,从而实现靶序列和内标物 RNA 两个扩增过程的各自跟踪。荧光信号的动力学分析可以显示野毒株和内标物 RNA 的转录速率,因此可以计算出原样本中 HIV-1 RNA 含量。扩增靶基因为 gag 基因区,样本进样量是

0.2-1ml, 适用于 HIV-1M 组 A-J 亚型、CRF01_AE 和 CRF02_AG 亚型毒株, 检测的线性范围为 10-10,000,000 copies/ml。

(4) 分支 DNA 技术 (bDNA):

该技术基于其独特的信号放大系统, 即分支 DNA 信号放大系统, 分支 DNA 的分枝可结合多个酶标记物, 从而将病毒的信号放大, 以便进行检测。此检测系统不涉 RNA 纯化及核酸扩增反应, 对实验室分区要求最低。定量系统中没有内标记物, 每次实验设置一系列外部标记, 通过实验样品反应强度与外部标记样品强度的比较确定实验样品的病毒拷贝数。代表产品 Versant HIV-1 RNA 3.0 bDNA 系统, 靶基因位于 pol 基因区, 适用于 HIV-1M 组的 A-H 亚型毒株, 检测的线性范围是 50-500,000 copies/ml。

8.4.1.2 不同方法检测结果间相互关系

病毒载量的检测单位有拷贝数 (CP) /ml 和国际单位 (IU) /ml, 且同一样本不同方法的病毒载量检测结果不同。另外, 不同方法间检测结果并无固定的转换关系, 与病毒亚型、试剂不同版本有关, 因此评估同一病人的治疗效果需用同一种方法检测, 并且考虑试剂版本的更新情况。

8.4.1.3 标本处理及保存

通常采用 EDTA 或 ACD 抗凝血, 一般要求在采血后 6 小时内进行离心, 分离血浆。根据检测时间保存血浆, 4 天内可在 4℃ 暂时保存, 3 个月以内应冻存于 -20℃ 以下, 3 个月以上应置于 -70℃ 以下, 血浆标本冻融不应超过三次。

8.4.1.4 检测时间

(1) 辅助诊断: HIV 抗体检测结果不能进行明确诊断时, RNA 的测定结果可帮助提供 HIV 感染早期或终末期的证据。如 HIV 感染母亲所生小于 18 个月龄的

婴儿，不同时间的两次 HIV 核酸检测均为阳性即可作出诊断。

(2) 指导抗病毒治疗及疗效判定：如果有条件，在治疗前作基线病毒载量检测是有必要的，便于观察抗病毒治疗后病毒抑制效果。开始治疗 16 周时，所有初次抗病毒治疗患者的病毒载量应低于检测下限，如治疗 6 个月后，病毒载量仍没有低于检测下限，应结合临床仔细寻找原因（依从性、药物相互作用等），以考虑是否治疗失败及调整治疗方案。治疗开始后应每半年检测一次病毒载量，评估治疗效果，如载量出现变化，应结合临床寻找原因及时调整治疗方案。

8.4.2 HIV 耐药基因检测

由于艾滋病病毒本身高度复制及复制过程中缺乏自我校对功能等原因，易发生基因突变产生耐药。同时，在长期抗病毒治疗药物的选择性压力作用下，艾滋病病毒突变的几率大大增加。耐药突变的产生和发展会影响抗病毒治疗的疗效。因此，及时进行耐药检测，对于保证艾滋病抗病毒治疗效果及预防耐药株传播具有重要作用；对于抗病毒治疗前以及抗病毒治疗失败后个体，及时进行耐药检测为指导临床选择合理的治疗方案，保证抗病毒治疗效果，分析治疗失败原因及指导制定补救治疗方案尤为重要。

根据《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册（第三版）》，目前临床上常用的药物有三大类，分别为蛋白酶抑制剂（PIs）、核苷类或核苷酸类逆转录酶抑制剂（NRTIs）和非核苷类逆转录酶抑制剂（NNRTIs）。针对这三类药物，耐药基因型检测需扩增 HIV-1 的 pol 基因区，目的基因片段应覆盖蛋白酶区 4-99 位氨基酸和逆转录酶区 38-320 位氨基酸的基因区域。

8.4.2.1 标本类型

要求 HIV-1 感染者血浆病毒载量 ≥ 1000 拷贝/毫升或国际单位。采用血浆、

滤纸干血斑样本（DBS）。如长期保存血浆样本，应需保存在-70℃或更低温，避免反复冻融。

8.4.2.2 检测方法

通常使用逆转录 PCR（RT-PCR）和测序方法，商品化试剂盒一般采用一轮 RNA 反转录与一轮 PCR 扩增实验，实验室自建（In-house）方法一般使用一轮 RNA 反转录和巢式 PCR 方法两轮扩增实验。实验室自建基因型耐药检测方法应按照实验室认可体系文件中非标方法的确认程序验证或根据 WHO 推荐的检验认证方法认证后使用。

8.4.2.2.1 试剂

引物

应根据所测目的基因的序列设计，包括 RT、PCR 和测序引物。商品化试剂盒已包含上述引物，实验室自建方法可参考发表文献或根据当地 HIV-1 流行毒株的序列自行设计引物。

主要试剂

商品化试剂盒使用其配套的试剂。实验室自建方法需配置病毒核酸提取、逆转录、PCR 扩增，PCR 产物纯化和测序反应等步骤所需的试剂。

8.4.2.2.2 核酸提取

按照核酸提取试剂盒说明书操作。提取 RNA 时应注意防止 RNA 降解。RNA 应在-70℃保存。

8.4.2.2.3 逆转录反应和 PCR 扩增

将 RNA 模板、逆转录引物、dNTP、逆转录酶、RNA 酶抑制剂、缓冲液和适量无 RNA 酶的超纯水加入反应管中，在适宜温度下进行逆转录反应，合成

cDNA。将模板（DNA 或 cDNA）、dNTP、PCR 引物、缓冲液、Taq 酶和适量灭菌纯水加入反应管中，置于扩增仪上，按照设定的程序进行巢式 PCR 扩增。建议使用 RT-PCR 一步法试剂进行第一轮扩增反应。

8.4.2.2.4 序列测定

通常采用 Sanger 法进行 DNA 测序。将扩增产物、dNTP、ddNTP、测序引物、缓冲液、Taq 酶和适量灭菌纯水加入反应管中，置于扩增仪上，按照设定的程序进行测序反应，在测序仪中读取序列数据。

8.4.2.2.5 耐药分析和结果报告

将所测序列与数据库中的参考序列或共享序列进行比较，判断是否出现耐药相关的基因突变，并根据 HIV-1 耐药基因型解释系统的规则来评判对特定药物的耐药程度。

提供 HIV-1 耐药基因型检测数据分析和解释系统（HIVDRDB）的主要机构有：国际艾滋病协会（IAS，<http://www.iasusa.org>），美国斯坦福大学（HIVDB，<http://hivdb.stanford.edu>），法国国家艾滋病研究署（ANRS，<http://www.hivfrenchresistance.org/index.html>），和比利时 Leuven 大学 Rega 医学研究所（REGA，<http://www.kuleuven.ac.be/regacev/>）。实验室自建方法通常使用 HIVDB 系统，商业化试剂盒则使用与试剂盒配套的 HIV-1 耐药基因型检测数据分析和解释系统。

各种 HIV-1 耐药基因型解释系统对耐药程度的划分不同：HIVDB 系统分为敏感（S）、潜在耐药（P）、低度耐药（L）、中度耐药（I）和高度耐药（H）五个水平；Rega、ANRS 和商品化试剂盒所采用的系统则分为敏感（S）、可能耐药（I）和显示耐药（R）三个水平。

当耐药毒株在个体内病毒群体中的比例低于 10~20%时,通常检测不到其存在。因此,当在 HIVDB、Rega 或 ANRS 系统中报告为“S”,只可报告本次实验结果为“未发现耐药”,不可报告为“敏感”。

8.4.2.3 耐药检测的临床应用 (表 8)

临床背景	推荐意见
急性 HIV-1 感染	不论是否立即开始治疗,推荐进行耐药检测,基因型耐药检测最佳;如推迟治疗,应在治疗前重新进行基因型耐药检测
慢性 HIV-1 感染	不论是否开始治疗,推荐进行耐药检测,基因型耐药检测最佳;如推迟治疗,应在治疗前重新进行基因型耐药检测
病毒学失败	强力推荐对病毒载量>1000 拷贝/ml 者进行耐药检测,对病毒载量>500 拷贝/ml 但<1000 拷贝/ml 者尽管耐药检测不易成功但也应考虑进行检测; 初次或二次治疗失败,推荐进行基因型耐药检测。多次治疗失败或明确或怀疑患者存在复杂耐药突变位点,尤其是对蛋白酶抑制剂类药物,推荐基因型和表型耐药分析联合应用; 初始治疗方案病毒抑制不理想推荐进行耐药检测
HIV 感染孕妇	推荐对所有孕妇在抗病毒治疗前进行基因型耐药检测。对已接受抗病毒治疗的孕妇,只要能检测出 HIV RNA 也应进行耐药检测
母婴传播感染的新生儿	推荐对所有母婴传播感染的新生儿在抗病毒治疗前及改变治疗方案前进行耐药检测
暴露后预防用药	如果可能,暴露后预防用药需考虑暴露源的治疗史和耐药情况。 推荐对暴露源进行基因型耐药检测
抗病毒治疗中断 4 周以上	一般不推荐进行耐药检测
血浆 HIV 病毒载量<500 拷贝/ml	一般不推荐进行耐药检测

8.4.2.4 耐药基因检测局限性

①基因型耐药检测属于间接检测耐药;②基因突变与病毒耐药的相关性可能不一致;③不能检测出体内病毒群体中小于 20%的劣势病毒株;④许多突变的临床相关性仍然不清楚,对于某些药物的耐药(如 AZT)与基因突变的相关性较

差；⑤存在大量突变时难以做出正确的结果解释；⑥不能检测突变之间的关联。

附录：常用缩写

ASO: PCR-allele specific oligonucleotide

BSL: biosafety level

cDNA: complementary DNA

CMV: cytomegalovirus

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTPs: deoxyribonucleoside triphosphates

dPCR: digital PCR

EBV: Epstein-Barr virus

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FRET: fluorescent resonance energy transfer

HBV: hepatitis B virus

HCV: hepatitis C virus

HIV: human immunodeficiency virus

HRM: high-resolution melting

LAMP: loop-mediated isothermal amplification

LoD: limit of detection

MGB: minor groove binding

NaOH: sodium hydroxide

NASBA: nucleic acid sequence-based amplification

PAPA: PCR amplification of specific alleles

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR: polymerase chain reaction

PCR-RFLP: PCR restriction fragment length polymorphism

PCR-SSCP: PCR-single strand conformation polymorphism

qPCR: quantitative real-time PCR

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction

SD: standard deviation

SNP: single nucleotide polymorphism

SOP: standard operation procedure

T_m: melting temperature

TMA: transcription mediated amplification

UNG: uracil-N-glycosylase

UV: ultraviolet

参考文献

1. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014.
2. WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: Recommendations for a public health approach. 2013.
3. EASL. Recommendations on treatment of hepatitis C.2014.
4. CLSI. Molecular. Diagnostic Methods for Infectious Diseases, Approved Guideline-Second Edition. CLSI document MM03-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

5. CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. CLSI document MM06-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
6. CLSI. Genotyping for Infectious Diseases Identification and Characterization; Approved Guideline. CLSI document MM10-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
7. CLSI. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
8. CLSI. Use of External RNA Controls in Gene Expression Assays; Approved Guideline. CLSI document MM16-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
9. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document C28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
10. CLSI. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-Sixth Edition. CLSI document H03-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
11. CLSI. Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems; Approved Guideline. CLSI document M50-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
12. CLSI/NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement

- Methods; Approved Guideline-Second Edition. CLSI/NCCLS document EP05-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2004.
13. CLSI/NCCLS. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI/NCCLS document EP06-A. Wayne, PA: NCCLS; 2003.
 14. CLSI. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP15-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
 15. CLSI/NCCLS. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline-second edition EP17-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2012.
 16. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings 2007. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/isolation2007.pdf>. Accessed November 19, 2010.
 17. CNAS-CL02. 医学实验室质量和能力认可准则. 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
 18. 《艾滋病检测技术规范》
 19. CDC. Genetic testing reference materials coordination program. Centers for Disease Control and Prevention, 2007.
 20. NIST. Standard reference materials catalogue. National Institute of Standards and Technology, 2008.

21. WS/T402-2012. 临床实验室检验项目参考区间的制定. 中华人民共和国卫生部, 2012.
22. 王治国. 临床检验方法确认与性能验证. 人民卫生出版社, 2008.
23. ISO 15189. Medical laboratories-Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, 2012.
24. GB/T 22576-2008. 医学实验室质量和能力的专用要求. 中国国家标准化管理委员会, 2010.
25. WS/T420-2013. 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2013.
26. CNAS-CL36. 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明. 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
27. JJF 1001-2011. 通用计量术语及定义. 国家质量监督检验检疫总局, 2011.
28. Bustin SA, Benes V, Garson J, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611-622.
29. Erlich HA. PCR Technology: principles and applications for DNA amplication. New York: Macmillan Publishers, 1989.
30. Lewin B. Gene XI. 11thed. Sudbury: Jones & Bartlett Publishers, 2013.
31. Liew M, Pryor R, Palais R, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin Chem. 2004, 50(7): 1156-1164.
32. Watson JD, Gann A, Baker TA, et al. Molecular biology of the gene. 7thed. New

- York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
33. Wilson K, Waker J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. London: Cambridge Press, 2010.
 34. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977, 74(12): 5463-5467.
 35. Mike May. Clinical Aspirations of Microarrays. *Science*. 2013, 339(6121): 858-860.
 36. Bowtell D, Sambrook J. DNA Microarrays. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
 37. Lester Hui, Terrye DelMonte, Koustubh Ranade. Genotyping Using the TaqMan Assay. *Current Protocols of Human Genetics*. John Wiley & Sons, Inc., 2008.
 38. Abravaya K, Huff J, Marshall R, et al. Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin Chem Lab Med*. 2003, 41(4):468-474.
 39. Euro Gentest. Quality control and reference material producers' websites. Euro Gentest, 2008.
 40. Pasternack R, Vuorinen P, Miettinen A. Evaluation of the Gen-Probe Chlamydia trachomatis transcription-mediated amplification assay with urine specimens from women. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):676-8.
 41. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991; 350(6313):91-2.
 42. WHO. Expert Committee on Biological Standardization. Glossary of Terms for Biological Substances Used for Texts of the Requirements. WHO unpublished

document BS/95.1793. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1995.

43. Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML. Recommended Principles and practices for validating clinical molecular molecular pathology tests. *Arch Pathol Med.* 2009; 133:743-755.
44. FortinaP, Surrey S. Digital mRNA profiling. *Nat Biotechnol.* 2008;26(3):293-294.
45. Salimnia H, Moore EC, Crane LR, Macarthur RD, Fairfax MR. Discordance between viral loads determined by Roche COBAS AMPLICOR human immunodeficiency virus type 1 monitor (version 1.5) standard and ultrasensitive assays caused by freezing patient plasma in centrifuged Becton-Dickinson vacutainer brand plasma preparation tubes. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4635-4639.
46. Rennert H, Leonard DGB. Molecular pathology laboratory management. In: Leonard DGB, ed. *Molecular Pathology in Clinical Practice.* New York: Springer; 2007:553-576.
47. Wan H, Seth A, Rainen L, Fernandes H. Co-amplification of HIV proviral DNA and viral RNA in assays used for quantification of HIV-1 RNA. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2186-2190.
48. Ursi D, Dirven K, Loens K, Ieven M, Goossens H, Detection of *Mycoplasma Pneumoniae* in respiratory samples by real-time PCR using an inhibition control. *J Microbiol Methods.* 2003; 55:149-153.
49. Centers for Medicare and Medicaid Services, US Department of Health and Human Services. *Public Health Laboratory Requirements. Standard: Quality*

System for Nonwaived Testing. 42 CFR 493 Subpart K; 2003.

50. Sherman KE, Rouster SD, Horn PS. Comparison of methodologies for quantification of hepatitis C virus (HVC) RNA in patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus, *Clin Infect Dis.* 2002;35(4):482-487.
51. Zimmermann BG, Holzgreve W, Avent N, et al. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075:347-349.
52. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008;29(Suppl 1): S49-S52.
53. Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS Clinical Trials Group Virology Laboratories. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2695-2701.
54. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:1094-1097
55. Li H, Dummer JS, Estes WR, et al. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):187-191.
56. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA.* 2008;300(4):413-422.
57. Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *The Statistician.* 1983; 32:307-317.

58. Holodiniy M, Mole L, Yen-lieberman B, et al. Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in vacutainer tubes. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1562-1566.
59. Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2886-2893.
60. Trabaud MA, Bailly F, Colucci G, et al. Stability of hepatitis C virus RNA in serum from samples collected in a closed-tube system for serum separation and transport, as measured by a quantitative competitive PCR assay. *J Viral Hepat.* 1996;3(4):4207-4209.
61. Bruisten SM, Oudshoorn P, van Sweiten P, et al. Stability of HIV-1 RNA in blood during specimen handling and storage prior to amplification by NASBA-QT. *J Virol Methods.* 1997;67(2):199-207.
62. Sebire K, McGavinn K, Land S, et al. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):493-498.
63. Krajden M, Comanor L, Rifkin O, et al. Assessment of hepatitis B virus DNA stability in serum by the Chiron Quantiplex branched-DNA assay. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):382-385.
64. Halfon P, Khiri H, Gerolami V, et al. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Hepatol.* 1996;25(3):307-311.

65. Collins ML, Zayati C, Detmer JJ, et al. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. *Anal Biochem.* 1995;226(3):120-129.
66. Kohler T, Rost AK, Remke H. Calibration and storage of DNA competitors used for contamination-protected competitive PCR. *Biotechniques.* 1997;23(4):722-726.
67. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996,6: 986-994.
68. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993,11(9): 1026-1030.
69. Westgard JO. *Basic QC Practices.* 3rd edition, Madison: WI, 2010.
70. 陈佰义、何礼贤、胡必杰等。中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识。 *中华医学杂志.* 2012;92(2):76-85.
71. 中华医学会结核病学分会，《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会。非结核分枝杆菌诊断与治疗专家共识。 *中华结核和呼吸杂志.* 2012; 35 (8) : 572-80.
72. 《甲型H1N1流感诊疗方案》卫办医政发 [2010] 79号.
73. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)[J]. *Clin Infect Dis,* 2013, 57(4):e22-e121.
74. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology* 2014,60392-420.

75. 周华, 李光辉, 陈佰义等。中国产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌科细菌感染应对策略专家共识。中华医学杂志2014; 94 (24) : 1847-56.
76. 周华, 李光辉, 卓超等。中国嗜麦芽窄食单胞菌感染诊治和防控专家共识。中华医学杂志2013; 93 (16) : 1203-13.
77. 丙型病毒性肝炎筛查及管理。中华人民共和国卫生行业标准WS/T 453-2014
78. 乙型肝炎耐药讨论专家组。核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理。临床肝胆病杂志.2013;29(1):10-17.
79. 慢性乙型肝炎核苷(酸)类药物经治患者抗病毒治疗专家委员会。慢性乙型肝炎核苷(酸)类药物经治患者抗病毒治疗专家共识。中华实验和临床感染病杂志(电子版).2013;7(1):145-9.
80. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae--2014. MMWR Recomm Rep. 2014;63(RR-02):1-19.
81. EFNS-ENS guidelines for the use of PCR technology for the diagnosis of infections of the nervous system. Eur J Neurol. 2012;19(10):1278-91.
82. WHO. Guidelines for the screening care and treatment of persons with hepatitis C infection.2016.
83. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. J Hepatol. 2017;66(1):153-194.
84. 2016 CSH-AASLD 及 CSH-EASL 肝病联合学术会议纪要。[C]北京: 中华医学会肝病学会, 2016.
85. 《个体化医疗中的临床分子诊断》 李艳, 李金明. 人民卫生出版社 2013

年8月.