

SARS-CoV-2 实验室检测技术的应用及展望

肖斌, 周泉, 雷婷, 何咏茵, 李林海

中国人民解放军南部战区总医院检验科, 广东 广州 510010

摘要:新型冠状病毒肺炎疫情爆发以来,我国的病毒检测能力不断提高,检测技术也在不断地发展和创新。以实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和宏基因组测序为代表的病毒检测技术在辅助疾病确诊、监测病毒变异等方面发挥了关键作用;基于血清/血浆IgM/IgG抗体的检测技术是辅助确诊的重要方法;高特异性的逆转录环介导等温扩增技术、能够核酸定量的数字PCR和灵敏度更高的SHERLOCK技术也极具特色与发展潜力。以上检测技术代表了病原微生物检测技术的现在及未来发展方向。本文对新型冠状病毒检测技术的基本原理、技术特点及应用现状进行探讨。

关键词:新型冠状病毒;qRT-PCR;抗体;数字PCR;SHERLOCK

Application of laboratory diagnostic technologies for SARS-CoV-2: current progress and prospect

XIAO Bin, ZHOU Quan, LEI Ting, HE Yongyin, LI Linhai

Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Southern Theatre Command of PLA, Guangzhou 510010, China

Abstract: Since the outbreak of COVID-19 pandemic, the detection capability has been improving and the detection techniques have been evolving with innovations. qRT-PCR and mNGS, which represent the current mainstay diagnostic technologies, play key roles in disease diagnosis and monitoring of virus variation. The detection technologies based on serum and plasma IgM and IgG antibodies are important for auxiliary diagnosis. RT-LAMP is highly specific for a diagnostic purpose. Digital PCR could quantitatively detect nucleic acid and SHERLOCK has a higher sensitivity. These techniques all have great potential for future development and application for pathogen detection. In this review the authors summarize the basic rationales, technical characteristics and the current application of the SARS-CoV-2 detection techniques.

Keywords: SARS-Cov-2; qRT-PCR; antibody; digital PCR; SHERLOCK

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)肺炎(COVID-19)疫情正在全球各国蔓延。高效、快速、准确的实验室诊断技术是确保患者尽早收治、阻止疫情发展的关键环节。qRT-PCR检测核酸阳性一直是COVID-19临床确诊的最主要的指标。但随着人们对qRT-PCR法局限性认识的逐渐提高,确诊标准已经从最初单一的病原学证据^[1]转变为病原学结合血清学证据^[2]。qRT-PCR法的假阴性率高、重复性差、通量低,而数字PCR、RT-LAMP、SHERLOCK等技术各具优势,有望对qRT-PCR进行有效的补充。本文拟从基本原理、技术特点、应用现状等角度对SARS-CoV-2检测技术进行探讨。

1 qRT-PCR

qRT-PCR技术是从组织、细胞、体液等多种类型样本中分离病毒RNA,通过逆转录结合聚合酶链反应

(RT-PCR),将样本中微量的病毒信息成倍放大,最后以荧光信号的强弱对RNA进行相对定量。根据SARS-CoV-2的全基因组序列,国家卫健委推荐新冠病毒的三个特异性区域(ORF1ab基因、N基因和E基因)适合作为PCR扩增区域^[3-4]。截止笔者撰稿时,国家药品监督管理局已应急批准8种SARS-CoV-2荧光PCR法检测试剂盒,大多数以ORF1ab+N双基因作为扩增靶标。

qRT-PCR法具有高灵敏度、高特异性、适用样本类型广泛等优点,但qRT-PCR结果的影响因素很多,如在磁珠法或柱层析法分离纯化病毒核酸过程中,重复的洗涤、离心、纯化等步骤均可造成相当数量的核酸损失,且增加了核酸断裂水解的可能性;在SARS-CoV-2感染早期,病毒复制数量达不到qRT-PCR检测阈值也会出现假阴性情况^[5];而最容易被忽视的是,由于扩增反应缺少质控,阴性结果无法排除鼻咽拭子采样未取到呼吸道上皮细胞的可能。针对qRT-PCR技术容易出现假阴性的缺点,实验室可以采用数字PCR等技术来对qRT-PCR进行补充;而开发更简单快速的分子POCT诊断程序,实现疑似患者的快速诊断和密切接触人群的现场筛查,是解决目前世界多国临床诊断能力不足的优先选项;同

收稿日期:2020-03-23

基金项目:国家自然科学基金(81802634)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81802634).

作者简介:肖斌,博士,主管技师,E-mail: xiaobin2518@163.com

通信作者:李林海,主任技师,博士生导师,E-mail: mature303@126.com

时,对新冠病毒抗原和抗体进行动态定量检测也可以帮助识别是否感染的问题^[6]。

一体化和即时检测(POCT)是qRT-PCR技术未来的发展方向。赛沛公司的GeneXpert技术是全自动一体化的核酸检测系统,整合样品制备、扩增及检测等3个步骤于一个独立的试剂盒中,并将其自动化。标本处理可在2 min内完成。受过基础培训的人员均可在30 min完成整个测试。所有的稀释及提取步骤均在试剂盒的不同通道中完成,最大程度地减少了污染的发生。GeneXpert作为一种快速、简单、去中心化的分子POCT检测技术,能够突破现有检测技术对人员和场地的限制,实现疑似患者的快速诊断和密切接触人群的快速筛查。

荧光热对流PCR(C-PCR)是近年来发展起来的一种新的核酸检测技术,其利用加热形成温度梯度,造成密度差之后产生对流,使变性、退火、延伸等3个步骤合而为一,在反应管的不同温度区域同步进行。C-PCR直接取样配液,扩增检测和结果判断定的全过程可以控制在30 min以内,与传统PCR相比具有操作简便、检测时间短、对环境要求低等优点,适用于口岸监测现场的SARS-CoV-2快速筛查^[7]。

GeneXpert和C-PCR尚未取得专家共识并在临床普及,相信随着技术的不断优化与完善,这些新兴的核酸检测技术将为SARS-CoV-2的快速筛查提供重要帮助。

2 宏基因组测序

宏基因组测序(mNGS)是指对样品中的微生物群体基因组进行高通量测序,微生物群体的基因组成及功能结构多样性。mNGS检测SARS-CoV-2的基本流程是从患者的下呼吸道分泌物(痰液或支气管肺泡灌洗液)中提取病毒RNA,构建病毒cDNA文库,随后进行高通量测序,通过数据库比对分析,鉴定基因组序列是否与SARS-CoV-2高度同源^[8-10]。

mNGS检测SARS-CoV-2的优势在于:(1)特异性和灵敏度高:mNGS试剂盒中包含一系列SARS-CoV-2特异性引物,mNGS结合qRT-PCR能够更全面的检测SARS-CoV-2的存在及传播过程中发生的变异;(2)自动化程度高:依托一站式建库系统,可在生物安全柜内无人值守地完成核酸提取、建库和纯化的全流程,减少样本间交叉污染和实验人员的感染风险;(3)mNGS能够同时检测细菌、真菌、病毒和寄生虫等多种病原微生物,全面监控感染性疾病的潜在风险^[11-12]。

mNGS的缺点也较为明显:(1)仪器配置要求高:mNGS能够在24 h内单流程产出 $5 \times 10^6 \sim 24 \times 10^6$ (1000万~2400万条测序序列)数据量,对测序仪及分析数据计算系统要求高,推广难度大;(2)检测周期较长:

mNGS最快的检测周期为24 h,平均检测周期约48 h或更长,难以进行快速筛查^[11-12]。

目前,mNGS多用于SARS-CoV-2的起源、传播和演变等方面的研究:中科院团队对世界范围内的93株SARS-CoV-2进行全基因组分析,发现了58种单倍型毒株,并进一步归纳为3个古老超级传播者单倍型(H1,H3和H13)和2个新的超级传播者单倍型(H56和mv2)^[13];柬埔寨通过iSeq100 Illumina平台快速鉴定国内首例COVID-2019的特征^[14];有研究通过mNGS发现欧洲多国COVID-19患者存在nsp2氨基酸中的缺失(Asp268Del),下一步可深入研究Asp268Del对SARS-CoV-2的传播和致病性的影响^[15]。

mNGS结合qRT-PCR能够优势互补,最大化的实现各自的临床诊断价值。张文宏团队首次结合qRT-PCR、CRISPR和mNGS对首个COVID-19输入性病例进行了快速诊断^[16]。对于临床表型高度疑似而qRT-PCR检测阴性的病例,利用mNGS可提高检测准确性,同时能检出其他致病病原体;对于qRT-PCR检测阳性的患者进行mNGS,有利于监测新冠病毒是否发生变异,为疾病的防控与治疗提供宝贵信息。

3 血清/血浆IgM/IgG抗体检测

IgM和IgG是病毒感染后在人体内先后出现的特异性抗体。IgM是免疫系统受病原体刺激后最先产生的抗体,起到“先锋免疫”的作用;IgG在血液和组织中含量丰富,是抗病毒免疫的绝对主力。基于IgM和IgG双抗体的检测方法具有灵敏度高、诊断及时、适用范围灵活广泛等优点。IgM和IgG抗体的检测方法主要包括:胶体金法、Elisa和化学发光法。3种方法均可测定IgM/IgG总抗体或分别检测IgM和IgG抗体两类。

3.1 胶体金法

胶体金法是在硝酸纤维素膜上包被SARS-CoV-2抗原,基于侧向免疫层析原理捕获人血清中的SARS-CoV-2的IgM/IgG抗体,通过胶体金标记的鼠抗人IgM/IgG抗体形成抗原抗体复合物,使得流动相在检测线处聚集为红色反应线。

胶体金法检测的样本来源于患者的指尖血或静脉血,仅需10~15 min免疫反应后便可肉眼观测结果,适合用于企业复工、学校返校、居民等大规模的人群筛查。徐万州等^[17]研究表明COVID-19患者进行血清IgM和IgG抗体检测的灵敏度分别为70.24%和96.10%,特异性分别为96.20%和92.41%;抗体检测的阳性预测值为95.63%,阴性预测值为91.03%,阳性结果与确诊感染的总符合率为88.03%。IgM/IgG抗体检测的临床诊断价值已被临床广泛验证,有望针对qRT-PCR的漏检进行有效的补充^[18-22]。

但IgM/IgG抗体胶体金法作为血清学证据,无法取代qRT-PCR作为病原学证据的地位,可能受到样本溶血、纤维蛋白、细菌污染或患者自身抗体等因素的影响,造成假阳性率偏高,且IgM/IgG抗体的检测窗口期比qRT-PCR长。因此,未来联合qRT-PCR法和IgM/IgG抗体检测能够进一步提高检测阳性率、有效排除假阴性或假阳性检测结果。

3.2 ELISA

ELISA法是将SARS-CoV-2抗原固定到聚苯乙烯载体上,用于捕获人血清中的SARS-CoV-2 IgM/IgG抗体,以酶标记的抗IgM/IgG抗体为诊断二抗,构建间接法检测IgM/IgG抗体的体系,最终通过酶促颜色反应对样本中IgM/IgG抗体进行定量检测。ELISA法的检测灵敏度和特异性均较高,操作方法简便、仪器配置要求低,容易在基层医院开展和广泛推广;但ELISA法的手工操作可能带来不必要的操作误差及交叉污染,且IgM/IgG抗体检测均存在窗口期,难以在感染初期获得阳性检测结果。ELISA法作为SARS-CoV-2的辅助检测技术,尚没有足够的临床研究报道其检测灵敏度和特异性,与胶体金法相比,其优势在于能够定量检测IgM/IgG抗体,可判断IgM抗体转阴,IgG抗体升高4倍等动态过程,辅助监测患者的病情变化。

3.3 化学发光法

化学发光法是利用纳米磁珠标记病毒的重组蛋白捕获血液样本中的病毒抗体IgM或者IgG抗体,利用与吖啶酯偶联的二抗识别抗体,加入激发液后,通过相对发光强度测定化学发光反应。

化学发光法检测的主要优点包括:(1)采样方便,可检测指尖血或静脉血;(2)操作简单、检测时间短、灵敏度高。但临床推广过程中也存在与ELISA法类似的实际问题,包括IgM/IgG抗体检测窗口期较长、假阳性率高等,而疫情爆发下物流和冷链运输较为困难,容易造成试剂性能不稳定。

目前,化学发光法是临床一线使用最广泛的SARS-CoV-2 IgM/IgG抗体检测试剂盒。重庆医科大学联合博奥赛斯公司研发的化学发光法新冠病毒抗体检测试剂盒已完成13 532例检测,IgM和IgG抗体检测的灵敏度分别为93.7%和89.6%,特异性分别为96.20%和92.41%;武汉大学中南医院使用亚辉龙研发的化学发光法新冠病毒抗体检测试剂盒,在6名COVID-19确诊孕妇的新生儿血液样本中检测到病毒特异性抗体,而qRT-PCR却未检测到SARS-CoV-2母婴传播的迹象,充分体现出抗体检测的临床诊断优势^[23]。但化学发光抗体检测试剂尚不能作为COVID-19确诊和排除的唯一依据,也不适用于一般人群的筛查;李萍等^[24]发现,联合IgM/IgG抗体和核酸检测可能是目前最佳的实验室诊

断指标。

总之,联合应用核酸、抗原和抗体等多种检测方式,能够缩短检测窗口期,提高阳性检出率,对于COVID-19的辅助诊断具有重要作用。

4 数字PCR

数字PCR能够直接计量起始样本中核酸分子的个数,是对核酸浓度的绝对值定量,是一种划时代的核酸检测技术。

与qRT-PCR相比,数字PCR的核心优势体现在检测准确性高、灵敏度高、整体操作简单、系统稳定、重复性优良、可以有效避免样本间交叉污染,具体表现为:(1)报告结果为目的基因的拷贝数,为临床诊疗提供更精确的核酸量化依据;(2)极大降低了检测灰区,通过直观阅读量化结果,避免了人为失误,保证检测结果的高可靠性与高重复性;(3)可排除粪便等成分复杂样本对实验结果的干扰,避免成分抑制物引起的假阴性结果。总之,数字PCR能有效避免低病毒载量患者的漏检情况,有助于尽早发现病情和采取隔离措施^[17,24]。

但数字PCR的缺点也较为明显:数字PCR技术成本高,操作复杂,检测通量受限,难以在疫区和基层医疗单位推广应用;尚未制定国家或行业统一标准,缺乏商品化的室内质控品;操作过程极易受到外源污染,造成假阳性^[25-26]。

最近,中国计量科学研究院前沿中心近期成功研发了基于数字PCR技术的SARS-CoV-2核酸检测试剂。而大部分基于数字PCR技术的检测产品只完成了部分仪器的系统优化和全程验证,更多数字PCR仪的操作流程与规范的优化工作尚未结束,并未在临床一线推广使用。专家指出:当报告为“疑似病例”时,实验室可以使用数字PCR法对报告为“疑似”的病例进行进一步验证。若数字PCR技术能够实现缩短全程检测时间、降低生产成本、完善仪器系统优化及全程验证,相信其在未来临床应用中极具潜力。

5 RT-LAMP

逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)是一种将环介导等温扩增(LAMP)以及反转录相结合的一步核酸扩增方法,广泛应用于感染性疾病的诊断。LAMP法可针对靶基因上的多个区域设计特异性引物,在恒温条件下利用链置换型DNA聚合酶进行扩增,引导合成链置换DNA,使产物序列不断延伸、环化、再延伸,最终产生一些具有不同茎环结构的DNA和具有很多环结构的DNA。RT-LAMP是目前核酸分子检测技术手段的升级,具有操作简便快速、高灵敏性和高特异性等优势,适用于核酸的现场快速检测。

尹秀山团队基于等温扩增的LAMP法进行优化,发明了一种新技术—iLACO(isothermal LAMP based method for COVID-19)。该技术利用6个特异性引物鉴定ORF1ab基因的8个不同区域,并进行LAMP等温扩增。扩增产物的测序结果通过BLAST与7种相似的冠状病毒、2种流感病毒以及2种其他冠状病毒的序列进行比对,确保该检测方法的特异性^[27];Michael等^[28]对RT-LAMP进行优化,发现在63℃下温育30 min可获得最佳扩增结果。

与qRT-PCR相比,RT-LAMP的优势明显。特异性验证发现,RT-LAMP仅对COVID-19阳性样本有反应,适用于血清、尿液、唾液、口咽拭子和鼻咽拭子等各种类型样本的检测;敏感性可与基于Taq酶的qRT-PCR法相媲美;根据样本中的病毒载量,反应时间约为15~40 min不等,极大缩短了检测时间;不依赖设备,在没有专门的分子生物学仪器的条件下,也可进行检测;RT-LAMP具有易于操作、使用简便、快速、灵敏度及特异性高等优势,可作为一种快速筛查的检测手段。但由于RT-LAMP的敏感性较高,极易受到污染而产生假阳性结果,故要严防操作污染。另外,当病毒载量低于RT-LAMP检测下线时,可能引起假阴性的结果。

RT-LAMP技术尚未在临床一线广泛应用,若在产物的回收鉴定、克隆、单链分离等方面加以完善和改进,有望表现出更为显著的临床优势。

6 SHERLOCK

SHERLOCK技术是CRISPR/Cas研究领域的先驱者—张锋教授于2017年率先发明的核酸检测技术,并于2018年推出了新版的SHERLOCKv2^[29-30]。针对核酸快速检测中的关键科学问题,通过对核酸检测的三个关键技术(样品DNA提取、核酸扩增和靶核酸序列测定)进行创新,最终无需PCR仪和离心机等设备,在常温下依靠肉眼即可测定低至1个拷贝的靶微生物(包括病毒)核酸的新方法:(1)在核酸提取方面,建立了无需离心,仅利用热和化学试剂,即可直接提取各种生物样品中的微生物核酸的HUDSON核酸提取法,所提取的核酸无需分离,可直接用于重组聚合酶扩增(RPA)法^[31];(2)核酸扩增方面,利用RPA,在常温下无需PCR等设备,仅将试管置于室温中,即可在2 h内快速扩增靶核酸片段;(3)对经RPA扩增的DNA片段,采用SHERLOCK方法测定样品中是否含特定靶核酸序列:采用T7 RNA聚合酶将扩增的DNA转录为RNA后,利用Cas13与特定RNA序列结合后可以激活其切割靶RNA和其他非目标RNA的特性,Cas13剪切靶RNA和荧光探针标记的RNA,荧光探针被剪切后发出荧光,同时使用侧向免疫层析法,确定样品中靶微生物含量。可见,SHERLOCKv2

通过全面考虑微生物核酸检测中的多个关键科学点,不仅无需复杂的PCR设备,还可快速准确地测定痕量的微生物核酸,灵敏度可达qRT-PCR法的3.5倍。

近日,麻省理工学院(MIT)的麦戈文脑科学研究所宣布,张锋教授团队利用基于CRISPR的SHERLOCK技术,开发了一种检测新冠病毒RNA的方法。它仅需纯化的核酸分子样本,通过简单的3步,就能在1h内完成检测。但是,张峰团队的研究利用病毒核酸提取物,并未使用患者标本,未能有效考虑标本采集和核酸提取的损失。而且,在测试中虽然能够稳定检测出新冠病毒的序列,但灵敏度为每微升里10~100个拷贝,尚未达到SHERLOCK的理论检测下限,表明SHERLOCK技术走向临床应用的准备依然不足。

本课题组一直致力于SHERLOCK检测技术的开发与应用,目前在内标质控的制备、SARS-CoV-2检测体系优化等方面投入了大量研发精力,以期使SHERLOCK技术尽快走向临床推广与应用。

7 展望

自疫情爆发以来,qRT-PCR法被质疑的声音从未停止,然而其他检测方法尚未取得行业共识,取代qRT-PCR的难度较大;新冠病毒血清特异性IgM抗体和IgG抗体指标无法筛查低病毒载量 and 无症状感染者;数字PCR和SHERLOCK技术在核酸定量和灵敏度方面优势明显,未来应该重视产品的转化应用和临床专家共识的制定。目前,在qRT-PCR核酸检测试剂盒的产能逐渐满足临床需求的前提下,技术创新显得尤为重要。提高新冠病毒检测技术的灵敏度、提高准确性、扩大筛查通量、实现全自动流水线式操作平台应该成为主要的研究方向。现阶段全国各地正集中优势资源,加强科研攻关,相信随着检测技术的完善与创新,我们对新冠病毒肺炎患者的确诊和收治能力将进一步提高。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行六版) <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [3] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms[J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-9.
- [4] Chu D, Pan Y, Cheng S, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(4): 549-55.
- [5] 高维寅, 张洪, 罗阳. 新型冠状病毒肺炎核酸检测中的假阴性分析及对策[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(6): 641-3.

- [6] 李 泉, 刘钉宾, 乔正荣, 等. SARS-CoV-2 IgM/IgG抗体检测在新型冠状病毒肺炎诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200304.1041.006.html>.
- [7] 杨坤宇, 陈 帆, 张师音, 等. 热对流PCR用于甲型流感病毒检测的评价[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2017, 40(3): 156-8, 163.
- [8] Chen L, Liu W, Zhang Q, et al. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 313-9.
- [9] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-74.
- [10] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319-38.
- [11] 莫 茜, 秦 炜, 傅启华, 等. 正确认识新冠病毒核酸检测的影响因素 [J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2020.0002.
- [12] 陶 悦, 傅启华, 莫 茜. 病原宏基因组测序在新型冠状病毒检测中的应用与挑战 [J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.0008.
- [13] WY, GT, ZL, et al. Decoding evolution and transmissions of novel pneumonia coronavirus using the whole genomic data [ChinaXiv: 202002.00033].
- [14] Jessica E, Jennifer A, Sreyngim L, et al. Rapid metagenomic characterization of a case of imported COVID-19 in Cambodia [J]. *BioRxiv*, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.968818>
- [15] Antonin B, Grégory D, Alexandre G, et al. Molecular characterization of SARS-CoV-2 in the first COVID-19 cluster in France reveals an amino-acid deletion in nsp2 (Asp268Del) [J]. *BioRxiv*, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.998179>
- [16] JW A, Yi Z, HC Z, et al. Era of molecular diagnosis for pathogen identification of unexplained pneumonia, lessons to be learned[J]. *Emerg Microb Infect*, 2020, 9(1): 597-600.
- [17] 徐万洲, 李 娟, 何晓云, 等. 血清2019新型冠状病毒IgM和IgG抗体联合检测在新型冠状病毒感染中的诊断价值[J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200223-00109.
- [18] Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J Med Virol*. Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/jmv.25727
- [19] 张稳健, 吕 欣, 黄 驰, 等. 胶体金免疫层析法检测新型冠状病毒IgM/IgG抗体的临床评价与应用[J/OL]. 病毒学报. <https://doi.org/10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003676>
- [20] 梁 颖, 曾斯敏, 刘(王亭), 等. 病毒特异性抗体检测在新型冠状病毒肺炎诊断中的应用价值[J/OL]. 武汉大学学报(医学版). DOI:10.14188/j.1671-8852.2020.0167
- [21] 罗效梅, 王 静, 张 娅, 等. 全血 SARS-CoV-2 特异性抗体检测对2019-冠状病毒病的临床应用价值分析[J/OL]. 西南大学学报(自然科学版), 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1189.N.20200306.1716.004.html>
- [22] 郑培明, 崔发财, 张福明, 等. 新型冠状病毒 IgM/IgG 抗体不同检测方法在新型冠状病毒感染中的临床应用评价[J/OL]. 检验医学, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1915.R.20200331.1804.002.html>.
- [23] Zeng H, Xu C, Fan J, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. Published online March 26, 2020. doi:10.1001/jama.2020.4861.
- [24] 李 萍, 李志勇, 赵四林, 等. 血清2019-nCoV IgM和IgG抗体用于诊断新型冠状病毒肺炎的初步探讨[J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1184360.htm>, doi: 10.3760/cma.j.cn114452-20200302-00155.
- [25] 李 亮, 隋志伟, 王 晶, 等. 基于数字PCR的单分子DNA定量技术研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(10): 1017-23.
- [26] 李智杰, 刘占悝, 李健友, 等. 数字PCR技术研究进展[J]. 特产研究, 2019, 41(1): 120-3.
- [27] Yu L, Wu S, Hao X, et al. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO [J/OL]. *Med Rxiv*, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.20025874>.
- [28] Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, et al. Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Med Rxiv*, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.20025155>.
- [29] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-44.
- [30] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-42.
- [31] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-8.

(编辑: 经 媛)