

COVID-19 检测技术的优点和局限性

张丽珊^{1,2}, 陈忠正¹, 梁志坤²

1 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642

2 广州达安基因股份有限公司, 广东 广州 510665

张丽珊, 陈忠正, 梁志坤. COVID-19 检测技术的优点和局限性. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3141-3156.

ZHANG LS, CHEN ZZ, LIANG ZK. Advantages and limitations of COVID-19 detection techniques. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3141-3156.

摘 要: 由严重急性呼吸系统综合症冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的 2019 年冠状病毒肺炎 (COVID-19), 其持续大流行已对世界公共卫生安全造成严重的危害。发展病毒检测技术并运用于卫生管理包括人员排查、患者鉴别与治疗、减缓病毒传播等方面已发挥了重要作用。本文简要概述了 SARS-CoV-2 生物学特征, 对全球发展使用的 SARS-CoV-2 病毒主要检测技术和新兴发展检测技术进行了比较详尽的介绍, 并对病毒检测技术进行了展望, 以期为临床医疗诊断、公共卫生防护、疾病预防和控制等提供理论和技术帮助。

关键词: COVID-19; SARS-CoV-2; 血清学; 分子检测

Advantages and limitations of COVID-19 detection techniques

ZHANG Lishan^{1,2}, CHEN Zhongzheng¹, LIANG Zhikun²

1 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Guangzhou Daan Gene Co. Ltd., Guangzhou 510665, Guangdong, China

Abstract: The occurrence and persistent pandemic of 2019 coronavirus pneumonia (COVID-19), caused by the infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has taken a big toll on global public health. The development of virus detection techniques and its application played an important role in health management, including screening, identification and treatment of patients, and slowing down the spread of virus. This review briefly summarizes the biological characteristics of SARS-CoV-2, and introduces in detail the SARS-CoV-2 detection techniques developed and used

Received: December 31, 2021; **Accepted:** May 7, 2022; **Published online:** May 20, 2022

Corresponding author: CHEN Zhongzheng. E-mail: zhongzhengch@scau.edu.cn

worldwide. Perspectives on the follow-up development of virus detection techniques were presented, with the aim to facilitate medical diagnosis, public health protection, disease prevention and control.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; serology; molecular detection

持续的 COVID-19 蔓延对全球人口、社会结构和经济增长产生了破坏性影响。对引起该疾病发生的 SARS-CoV-2 病毒采取的快速、准确检测已在控制疾病传播方面发挥了重要作用。实时逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 是用于识别 SARS-CoV-2 最常用的方法, 但该法耗时长且需专用设备, 可能也会因病毒载量低而导致假阴性, 偶尔也会因全球或局部地区出现的井喷式检测需求带来 RT-PCR 试剂和耗材的供应链短缺, 因此世界各国也发展出了一些其他用于检测 SARS-CoV-2 的方法作为 RT-PCR 法的必要补充。本综述中, 简要描述了 SARS-CoV-2 的生物学特征, 并对全球报道和使用的针对 SARS-CoV-2 涵盖血清学检测和核酸检测的主要方法进行了归纳比较, 侧重介绍了数字 PCR、恒温扩增、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)、纳米孔测序等新兴技术及其优缺点, 并对检测方法的后续发展进行了展望, 以期对相关工作者在病毒检测、疾病诊断与治疗、疫情防控等方面提供理论与技术的帮助。

1 SARS-CoV-2 的生物学特征

SARS-CoV-2 基因组长度约为 30 000 个核苷酸, 主要编码 5 种结构蛋白, 即刺突 (spike, S) 表面糖蛋白、膜 (membrane, M) 蛋白、核衣壳 (nucleocapsid, N) 蛋白、小包膜 (envelope, E) 蛋白和血凝素酯酶 (hemagglutinin esterase, HE) 蛋白^[1]。E 蛋白和 M 蛋白主要参与病毒组装、出芽和病毒粒子形态发生, 而 N 蛋白与病

毒基因组 RNA 复合以产生核衣壳^[2]。S 蛋白是主要表面糖蛋白, 通过两个功能亚基 S1 和 S2 在受体结合和膜融合中发挥重要作用^[3]。S 蛋白三聚体包含一个稳定的茎, 与宿主细胞受体相互作用^[4]。S1 亚基包含受体结合域 (receptor binding domain, RBD), 直接与宿主细胞表面的血管紧张素转换酶 2 受体相互作用, 而 S2 亚基负责病毒和宿主细胞之间的膜融合, 释放病毒基因组 RNA 到细胞质中。SARS-CoV-2 的如上生物学特征, 对于利用分子、免疫学手段开发相关测定技术对该病毒进行检测具有科学指导意义。

2 COVID-19 检测技术

对 COVID-19 的诊断技术, 总体上分为血清学检测和核酸检测两大类型, 而每个检测类型, 相继发展出了系列的检测技术, 包括各种常用的检测技术及最新发展的检测方法。

2.1 血清学检测

血清学检测分为抗原检测和抗体检测两类, 主要通过免疫手段, 对各种抗体或抗原成分进行检测。

2.1.1 抗原检测

抗原检测即通过特异性抗体直接检测病毒或病毒颗粒上的成分 (即 S 糖蛋白、M 蛋白、E 蛋白或释放的 N 蛋白)。目前已经批准的抗原检测产品, 多以 N 蛋白为检测靶标, 使用特异性抗体结合 N 蛋白, 再通过生化反应放大信号至肉眼可观测的程度^[5]。由于不涉及靶标扩增, 抗原检测的灵敏度通常低于核酸检测, 平均灵敏

度为 56%^[6-7]。但抗原检测具特异性高 (>97%)、假阳性率较低、成本低廉、操作方便、出结果快速 (15–30 min) 等特点,能在急性感染期快速检出阳性病例^[8-10]。SARS-CoV-2 在潜伏期后期已有感染性,但多数情况下核酸检测、抗原检测均无法检出。随后病毒会在极短时间内飙升,无论抗原检测或核酸检测都为阳性。在突破性感染及重复感染的中后期,因体内产生的抗体水平较高,核酸检测阳性者其传染性往往较低,但若同步抗原检测为阳性者其传染性依然较高。总体而言,抗原阳性与传染性的相关性较好,抗原检测可以区分具有 SARS-CoV-2 传染性的个体与非传染性或传染性较低的个体^[11]。2022 年 3 月 11 日,国家卫健委发布重磅文件《新型冠状病毒抗原检测应用方案 (试行)》:正式确定在核酸检测基础上,增加抗原检测作为补充^[12]。根据免疫技术的不同,抗原检测发展出了侧流免疫分析 (lateral flow immunochromatography assay, LFIA)、免疫荧光分析 (immuno-fluorescence assay, IFA)、化学发光免疫分析 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 和色谱数字免疫测定等方法。本文着重介绍侧流免疫分析和免疫荧光分析这两种常用技术。

(1) 侧流免疫分析

LFIA 是一种定性检测抗原的免疫胶体技术。该技术常以胶体金为标志物,样品在试纸条上通过层析作用移动,样品中的目标分子与金标抗体结合,在检测线上被另一特异性抗体捕获,检测线显色,过量的金标抗体继续移动并在质控线上被二抗捕获。国家药品监督管理局于 2022 年 3 月 12–13 日审批的 10 款新冠抗原检测试剂盒中有 7 款采用的是胶体金技术。Chaimayo 等的研究表明,LFIA 可以达到相当高的灵敏度 (98.33%) 和特异性 (98.73%)^[13]。LFIA 多以试纸条形式呈现结果,适用于居家自

测,可很好实现疫情防控中的早发现、早隔离。

(2) 免疫荧光分析

IFA 检测技术是将抗体用荧光素标记后作为标准试剂,去检测和鉴定未知的抗原,然后借助荧光分析仪观察特异荧光。目前已有多款新冠抗原检测试剂采用这种技术^[14]。Porte 等指出 IFA 法检测 SARS-CoV-2 的灵敏度为 93.9%,特异性为 100%;当 C_t 值 ≤ 30 时,灵敏度提高到 98%,表明当 C_t 值较低时,IFA 对抗原的检测有更高的灵敏度^[15]。然而,IFA 对结果进行判断需要配置专用设备荧光分析仪,可用于大规模筛查,但不适用于家庭自检。

2.1.2 抗体检测

SARS-CoV-2 感染人体后,会引起人体免疫反应产生特异性抗体。抗体检测通常使用重组抗原来捕获血液中由 SARS-CoV-2 免疫反应后产生的特异抗体,其中免疫球蛋白 M (IgM) 和 G (IgG) 是常见的抗体^[16]。IgM 是感染期间产生的第一种抗体,而 IgG 是血清中最常见和最丰富的抗体。值得注意的是,抗体检测具有局限性,当患者被感染但尚未产生可检测水平的抗体时会导致假阴性结果。另外,当样品中出现近缘病毒干扰时,如样品中出现被检测对象 SARS-CoV-2 的高度相似抗原分子 SARS-CoV 时,抗体检测易出现交叉反应而导致假阳性。另外,当 SARS-CoV-2 病毒变异时,其抗原变化较大,会直接影响抗体检测的结果。不过,抗体检测方法对疫苗研究、流行病学研究和晚期并发症仍然具有重要意义。在 SARS-CoV-2 暴发期间,国内外机构开发出了多种抗体检测方法,包括酶联免疫吸附检测 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫荧光分析 (IFA)、化学发光免疫分析 (CLIA)、侧流免疫分析 (LFIA) 和蛋白质印迹 (Western blotting, WB) 分析等。

(1) 酶联免疫吸附测定

ELISA 技术应用于抗体检测时,常把病毒的重组抗原作为靶分子包被在塑料孔的表面,然后加入血液样品使其中的特异性抗体(IgG 或 IgM)与包被抗原产生特异结合,再加入含有标记的二抗,通过酶依赖性(通常是辣根过氧化物酶)底物反应产生变色现象,经由光谱仪读取变色程度获得样品中的抗体浓度。目前,用于检测 SARS-CoV-2 抗体的 ELISA 方法主要有:间接法、改良的间接法和双抗原夹心法,这些方法重复性好、灵敏度高,检测用时约为 1–5 h。GeurtsvanKessel 等用微流体技术改良 ELISA 间接检测方法,并成功应用于 SARS-CoV-2 抗体的即时检测(point-of-care testing, POCT)中^[17]。Tozetto-Mendoza 等评估了 ELISA 方法检测 SARS-CoV-2 抗体的性能,结果表明该方法特异性好且灵敏度高^[18]。要注意的是,ELISA 虽已成为 SARS-CoV-2 的重要检测技术,但不同的 ELISA 方法在灵敏度和特异性上存在较大差异。Li 等发现 IgM-IgG 联合抗体检测,其灵敏度和特异性分别为 88.66%和 90.63%^[19],而另一项研究指出,针对 COVID-19 的 IgM-IgG 快速检测其灵敏度非常差^[20]。因此,ELISA 检测结果常需核酸检测进行复核。

(2) 化学发光测定

CLIA 作为一种快速、灵敏的 POCT 技术,主要通过将发光物质或酶标记在抗原或抗体上,免疫反应结束后加入氧化剂或底物发生化学反应,在此过程中,当分子以电子激发态形成,然后衰变为基态时,产生光辐射而发光。CLIA 借助高度自动化的仪器实现了测定的高通量并已商业化,如意大利 DiaSorin 的 Liaison 检测仪使用涂有 SARS-CoV-2 S1 和 S2 抗原的磁珠来检测 IgG 抗体,每小时能全自动提供高达 170 个结果。与其他血清学测定方法相比,

CLIA 具有更高的灵敏度和特异性^[21]。如 GeurtsvanKessel 等开发的以 S1/S2 抗原为靶标的 CLIA 抗体检测方法,其灵敏度和特异性分别达 73%和 98%^[17]。Bryan 等验证表明,NP 抗原对 IgG 抗体的检测特异性为 100%^[22]。另外, Ma 等比较了靶向 CLIA 的 RBD 和 NP 抗原,发现使用 RBD 抗原可提高抗体检测的灵敏度和特异性^[23]。

(3) 侧流免疫分析

LFIA 不仅可用于抗原检测,也可用于定性检测血清或血浆中的 IgG 和 IgM 抗体。LFIA 的优势是能覆盖更多的人群,且不用实验室检测即可评估群体免疫力,但其结果的可追溯性较差,且对不同抗体的检测 and 在不同时间段对检测的灵敏度差异较大。GeurtsvanKessel 等比较了 3 种 LFIA 技术,发现 IgM 检测的灵敏度和特异性分别为 87%和 81%,而 IgG 检测的灵敏度和特异性则分别为 84%和 85%^[17]。Van Elslande 等测定了 7 种 LFIA 技术,发现 IgM 与 IgG 组合检测的特异性范围为 97%–100%,但 IgM 或 IgG 单独检测时的特异性范围为 85%–98%^[24]。Traugott 等发现 LFIA 的特异性范围为 98%–100%,但在临床症状出现后的 5 d 内敏感性较差(13%–20%),在第 6–10 天中等(20%–80%),在第 11 天或之后表现出色(100%)^[25]。

目前,多家公司开发出了 COVID-19 血清检测试剂盒,尽管检测准确性不如 RT-PCR,但血清学检测速度快,可进行即时检测,加大了地区检测范围,提高了人群检测力度,从而进一步帮助控制疫情。在疾病早期,当 RT-PCR 灵敏度报告为 50%–60%时,同时使用血清学检测可显著增加灵敏度,一致报告值超过 90%^[16]。此外,在症状出现后的 10–14 d,RT-PCR 的检测灵敏度出现显著下降,而血清学检测灵敏度则达到峰值^[16]。因此,2020 年 5 月,法国卫生

局和美国传染病学会建议, 症状与 COVID-19 一致但 RT-PCR 检测结果为阴性的患者, 可以通过血清学方法复查^[26-27]。

2.2 分子水平上的核酸检测

核酸检测是早期病毒感染最灵敏的检测方法。目前, 国内外已开发了多种核酸检测技术, 包括逆转录 PCR (RT-PCR)、微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)、环介导等温扩增检测 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 和测序等。

2.2.1 PCR 反应测定

(1) 逆转录 PCR 反应测定

RT-PCR 是 WHO 和 CDC 建议的 SARS-CoV-2 检测金标准, 也是目前使用最广泛的检测方法^[28]。RT-PCR 的工作流程包括样本采集、样本运送到实验室、样本裂解、病毒 RNA 提取纯化及实时 RT-PCR 扩增与分析。目前, 针对不同的基因已开发了多种 RT-PCR 检测技术, 涉及的基因包括 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 基因、核衣壳 (N) 基因、包膜 (E) 基因、刺突 (S) 基因和 ORF1b 或 ORF8 区域基因组等^[29-32]。Chan 等通过优化 RT-PCR 引物, 开发出针对新型冠状病毒刺突基因 (S) 的检测技术^[29], Corman 等则发展了针对新型冠状病毒 RdRp 基因、E 基因和 N 基因的检测技术^[30]。CDC 主张对 SARS-CoV-2 的两个核衣壳蛋白基因 (N1、N2) 进行 RT-PCR 检测^[31], 而 WHO 则建议针对 E 基因进行 RT-PCR 检测, 再对 RdRp 基因进行验证性测定^[32]。在 COVID-19 大流行的初始阶段, 实时 RT-PCR 采用双基因或多基因检测策略可以确保检测的特异性^[33]。但随着疾病流行程度的增加, 一些临床实验室在自建项目中为简化工作流程, 实施了 SARS-CoV-2 的单靶点检测^[34]。

RT-PCR 检测复杂且昂贵, 检测周期较长, 需要高端仪器、多种试剂和专业人员, 不适用于即时诊断。为满足快速诊断的需要, 有人将 RT-PCR 与快速检测技术 (例如数字微流体、视觉横向流动读数和便携式仪器等) 整合在一起, 实现 5–30 min 内出结果^[35-36]。Arumugam 等证明可在 12 min 内借助薄壁 PCR 管和浸入式加热器进行 RT-PCR, 并用发光二极管直接观察结果^[37]。这些方法虽然速度快、操作简单, 但检测中易受限于诸如灵敏度低、样本通量小等不足。

(2) 微滴式数字 PCR

ddPCR 是一种通过结合油包水乳液液滴技术进行数字 PCR 的新方法, 无需标准曲线即可进行绝对核酸定量。其主要技术过程为: 将样品分离到数以亿计的单个液滴中, 使用热循环仪进行 PCR 将每个液滴中的荧光信号放大, 然后将液滴置于读取器中, 根据使用的荧光染料用双色检测系统进行分析。阳性液滴包含至少一个或多个靶基因拷贝, 其荧光增强, 而阴性液滴没有目标基因的拷贝也无荧光。采用这种特殊的 PCR 方法, 使得在用相同引物和探针的情况下, ddPCR 对低病毒载量样本在检测灵敏度和精确度上均比 RT-PCR 高^[38]。另外, ddPCR 可直接计算原始样本中的 DNA 分子数, 无需确定信号阈值和标准曲线, 减少了分析的主观性^[39]。Zaghloul 等运用 8 个引物-探针组比较了 RT-PCR 和 ddPCR 两种检测方法的性能, 发现无论使用哪种引物-探针组, ddPCR 在区分阳性病例和检测低病毒载量样本方面均表现更好^[39]。

ddPCR 被认为是检测 COVID-19 的理想方法, 有助于发现低病毒载量的新病例, 落实早隔离密切接触者 and 一般接触者, 从而及时阻断传播。此外, 病毒拷贝数的变化为评估治疗效果、病毒清除率以及持续监测恢复期患者的病

毒载量变化提供依据,也有助于患者的隔离管理。然而,与 RT-PCR 一样,ddPCR 操作复杂,需要专业的检测人员和特殊实验设备,不适用于即时检测。

2.2.2 等温扩增测定

等温扩增不需要昂贵的热循环仪,不仅灵敏度高且可在资源有限的环境中使用,目前已得到广泛开发并应用于各种病毒的检测。

(1) 重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 测定

RPA 技术是在重组酶、单链 DNA 结合蛋白、链置换 DNA 聚合酶和特异性引物等参与反应下实现的 DNA 扩增,其检测速度快于其他等温扩增方法,可在恒温 (37–42 °C) 下反应,适用于 POCT,但易因气溶胶污染出现假阳性结果。

至今为止,已发展出多种 RPA 方法用于检测 SARS-CoV-2。Wang 等使用便携式设备在 39 °C 下进行 RT-RPA 检测 SARS-CoV-2,仅需 15 min,对 947 个临床样本评估发现该法灵敏度和特异性分别达到 97.63% 和 97.87%^[40]。Qian 等通过在反应体系添加 RNase H,选择性降解 RNA-DNA 杂交双链体中的 RNA 链,建立了增强型 RT-RPA (reverse tranion-recombinase polymerase amplification) 检测方法^[41]。结合侧流分析,增强型 RT-RPA 从收集样品到获得结果只需 45 min,无需提取 RNA,灵敏度显著提高,检测限最低达到了 5 个病毒拷贝^[41]。然而,当 C_t 值高于 32 时,增强型 RT-RPA 检测无法区分来自样品的弱阳性信号,尤其是未提取的样品^[41]。值得一提的是,虽然 RT-RPA 在低病毒载量样本中的灵敏度略低于 RT-PCR,但可用于低成本的即时检测,如在机场、急诊室、海鲜市场、社区卫生服务站等场所,通过使用 RPA 便携式设备,可实现对人群和环境 SARS-CoV-2 病毒

进行快速检测/监测,协助阻断病毒传播。

(2) 环介导等温扩增测定

LAMP 是一种特异性好、灵敏度高且反应时间短的扩增方法,可以在 60–65 °C 条件下,利用 4 到 6 个特异引物快速扩增 DNA/RNA^[42–43]。正向引物、反向引物、内部引物和外部引物是 LAMP 反应所需的 4 种强制性引物,还能通过使用更多引物 (如环引物) 来提高靶向扩增的灵敏度与特异性并减少扩增时间^[43]。LAMP 检测可在 PCR 管中进行,通过浊度、pH 值或嵌入染料颜色的变化,肉眼判断阴阳性^[44]。Lu 等开发了一种 RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) 检测方法,其中针对 RdRp 基因的引物组可检测到 3 copy/rxn,且该方法可通过甲酚红的颜色变化直接解读结果^[45]。另一报道针对 ORF1a 和 S 基因开发了 RT-LAMP 法,可在 30 min 内完成检测,检测灵敏度和特异性达 100%^[46]。Yang 等发展的 RT-LAMP 法对 208 个临床样本进行检测,发现其灵敏度和特异性与 RT-PCR 法相当^[47]。另外,还可应用 RT-LAMP 技术开发纳米生物传感器,在试纸条中显示可视化结果^[48]。但需要注意的是,LAMP 技术需要单独提取 RNA,要设计多个引物,检测流程较为复杂,而且因为 LAMP 灵敏度高,样品处理时易发生气溶胶污染,假阳性问题较严重。

(3) 核酸序列扩增 (nucleic acid sequence based amplification, NASBA) 测定

NASBA 法于 1991 年首次报道,其能在 41 °C 下直接扩增且能在短小时内产生大量拷贝 (~10⁹)。该法需 3 种酶 (逆转录酶、RNase H 和 T7 RNA 聚合酶) 和两种目标特异性引物,其中一种引物包含 T7 RNA 聚合酶启动子序列。NASBA 可用于检测不同的传染性 RNA 病毒,如甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus, HAV)^[49]、丙

型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)^[50]等,也可用于 SARS-CoV-2 的检测。Wu 等开发的 INSIGHT 技术,通过荧光探针和侧流读数,以实时和终点方式能灵敏地检测到 S 基因的扩增产物^[51]。然而,该技术尚未获得临床验证。

(4) 转录介导扩增 (transcription mediated amplification, TMA) 测定

TMA 属于单管等温扩增技术,扩增可在 37–41 °C 下进行,不需要热循环仪。该法通过利用 RNA 聚合酶和逆转录酶作用,可在短时间内产生数十亿份 RNA,最低能检测到 5.5×10^3 copy/mL^[52-54]。但 TMA 检测总用时相对长,包括反应前的样品准备需约 2 h 和扩增反应约需的 4.5 h^[55]。由 Hologic Panther 开发检测 SARS-CoV-2 的 TMA 技术,目前已获得 FDA 批准,其通过利用磁性微粒捕获 ORF1ab 基因,然后在室温下进行 TMA 扩增,扩增子由发光标记吡啶酯产生的光子信号予以检测^[56]。

(5) 滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 测定

RCA 是一种通用而直接的等温扩增核酸的方法。该法以环状 DNA 为模板,通过一个短引物,在酶催化下将 dNTPs 转变成单链 DNA,此单链 DNA 包含成百上千个重复的模板互补片段。原理上, RCA 的检测灵敏度可低至单拷贝核酸分子,能用于不同生物目标的检测。Tian 等开发了一种简化的 RCA 单管扩增与实时检测方法,可成功检测合成的 SARS-CoV-2 RdRp cDNA^[57]。最近也报道了另一种类似的检测方法^[58]。尽管这些方法没有针对临床样本进行测试,但 RCA 已被证明是一种有效的即时检测技术,扩增不需要热循环仪,试剂用量少,且扩增一直针对原始模板,非特异性片段少,假阳性率低。

2.2.3 CRISPR 检测技术

CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 和 Cas (CRISPR associated protein, CRISPR 相关蛋白) 组成,当被激活时, Cas 蛋白表现出局部 DNase 或 RNase 活性,从而导致靶 DNA 或 RNA 的局部切割 (顺式切割) 及对相邻单链 DNA (ssDNA) 或 RNA 的附带损伤 (反式切割)。Cas 蛋白类型多样,其中 Cas13a 是家族中唯一可靶向单链 RNA 的效应蛋白,而 Cas12 则只能靶向切割双链 DNA,但 Cas13a 和 Cas12 均具反式切割活性。Cas13a 和 Cas12 的这些特性,使其可靶向识别目标 RNA/DNA 并利用报告分子的断裂将信号放大,以实现 SARS-CoV-2 或其他 RNA 病毒的检测。该技术原理是,病毒 RNA 先经 RT-RPA 进行逆转录与扩增产生 dsDNA,其后若 dsDNA 进入 CRISPR-Cas12 检测系统则其直接与向导 RNA (guide RNA, gRNA) 靶向结合,而若介入 CRISPR-Cas13 系统则 dsDNA 先经 T7 转录酶转录为 RNA 再与 gRNA 结合,激活 Cas12 或 Cas13 进行靶标的切割,同时非特异性切割预先结合在 Cas 蛋白上的双标记寡核苷酸 ssDNA 和 ssRNA 探针,经横向流动读数读取掺入亚胺荧光素 (fluorescein amidite, FAM) 或异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-生物素的探针断裂情况,或读取荧光团 (fluorophore, F)-淬灭剂 (quencher, Q) 双重标记的探针断裂发出的荧光信号,获得病毒检测结果 (图 1)^[59]。

将 CRISPR-Cas 系统发展为病毒检测技术最初由张锋和 Jennifer Doudna 这两个实验室提出。张锋实验室利用 Cas13 蛋白的天然 RNase 活性开发并优化出一套特异高灵敏的酶报告系统 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK),其应用于 COVID-19

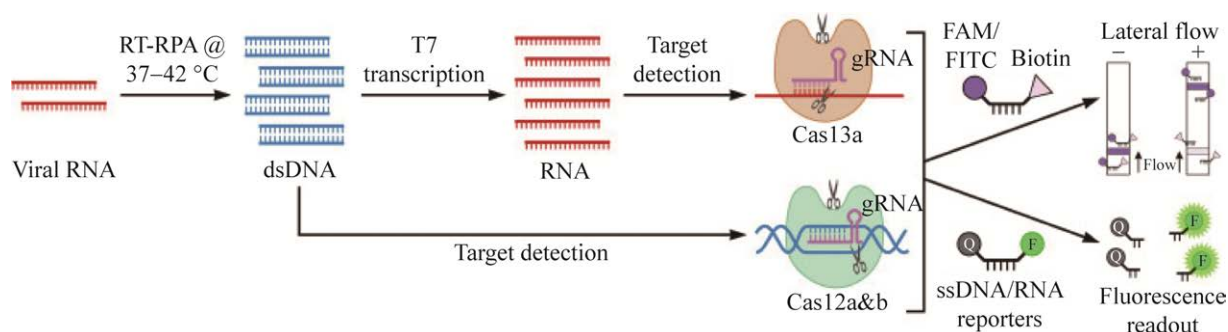


图1 用于病毒RNA检测的CRISPR-Cas技术原理 (转引自Safiabadi等^[59])

Figure 1 Principle of using CRISPR-Cas system for viral RNA detection (quoted from Safiabadi et al^[59]).

检测仅需RPA扩增、Cas13剪切、试纸条显色3个步骤，能在1 h内完成检测，最低可检测 1×10^4 copy/mL^[60]。后续张锋团队通过合并RT-LAMP和SHERLOCK两种技术发展出了更简易的STOPCovid (SHERLOCK testing in one pot) 方法，对202个SARS-CoV-2病毒阳性和200个病毒阴性鼻咽拭子样本进行检测表明，STOPCovid检测法具有93.1%的灵敏度和98.5%的特异性，其灵敏度与qRT-PCR相当。该法最大优点是不需要提取和纯化RNA，在一个试管中即可运行RT-LAMP和Cas蛋白剪切两种反应，过程无需打开盖子以防止气溶胶污染并降低假阳率，且只需15–45 min就能获得结果，特别适于POCT场景使用^[61]。

Jennifer Doudna实验室则利用Cas12a开发出针对DNA内切酶靶向的CRISPR反式报告检测系统 (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter, DETECTR)，而Broughton等则将该系统与RT-LAMP技术相结合，发展用于检测SARS-CoV-2的E和N基因序列^[62]。该法先将提取的RNA样本经RT-PCR增加样本溶液中的E、N和RNase P基因拷贝数，然后用Cas12切割目的基因使报告探针裂解产生荧光信号，1 h内可获得结果，检测敏感性和特异性分别达到90%和100%^[62]。另外，Zhou等结合RT-RPA技

术开发了一种简单且高通量的CRISPR-Cas12a检测技术，仅需30 min便可检测和区分SARS-CoV-2、甲型和乙型流感以及RSV，检测限为1–100 copy/ μ L^[63]。综上可知，CRISPR技术在SARS-CoV-2检测方面拥有独特的优势和美好的前景，但该技术开发难度较高，临床试验数据较为欠缺，若要用于临床实践尚需继续深入研究。

2.2.4 基因组测序

(1) 二代测序 (next generation sequence, NGS)

NGS测序技术具有高通量的特点，允许大规模并行反应进行边合成边测序，从而可快速获得基因组信息。该技术先将样本中的DNA或RNA模板通过末端修复、接头连接、PCR扩增等步骤制备成一个包含数百万个DNA片段的带接头文库，然后在测序仪上将文库通过添加带荧光标记的碱基进行扩增以增强荧光信号强度，从而读出DNA序列。现有的NGS技术平台主要包括Illumina、Life和MGI等，其中，Illumina开发的COVID-19 NGS检测试剂盒已获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 审批，可用于COVID-19临床检验^[64]。

对于引起COVID-19的SARS-CoV-2病毒，其高质量的基因组序列通过NGS技术对临床

标本中提取的 RNA 测序就可获得^[65]。在 SARS-CoV-2 暴发之初, 研究人员利用 NGS 测序获得了潜在病原体的基因组 29 891 碱基对, 经系统发育分析发现该病原体与蝙蝠冠状病毒的序列具有 96% 的一致性, 而与 SARS-CoV 的同一性为 79.6%^[66]。这项研究鉴定的 SARS-CoV-2 病毒全基因组序列, 为开发该病毒分子水平上的检测方法和探索其潜在的致病机制铺平了道路。随着 SARS-CoV-2 的迅速传播, NGS 被普遍用于该病毒的分子流行病学监测和病毒株溯源分析^[67]。值得一提的是, NGS 技术还可用于变异新毒株的监测, 有助于发现传播力更强的病毒, 如被列入令人担忧的变异株 (variants of concern, VOC) 的 Alpha、Beta、Gamma 和 Delta, 其他变体 eta、Iota、Kappa 和 Lambda, 以及传染力极强的 Omicron。

虽然 NGS 可用于病毒的精准检测, 但当样本病毒载量低时, 会出现测序数据不足或质量较差等问题, 这可使用目标富集技术如多重 PCR 扩增子测序、杂交捕获测序和超高通量宏转录组测序等来提高测序灵敏度和质量^[68-69]。另外, NGS 测序所需试剂及仪器均较为昂贵, 检测成本高, 而且该方法工作流程具复杂性, 需对精密仪器具备专业操作技能和对结果需进行生物信息学专业分析, 限制了许多实验室对 NGS 的应用, 也使得 NGS 无法应用于 SARS-CoV-2 的大筛查。但是, 使用 NGS 技术对阳性病毒标本的基因组测序, 可为许多应用包括疾病发病机制、流行病学、病毒系统发育学、SARS-CoV-2 进化研究, 以及病毒进化对检测手段或治疗方法和疫苗接种等干预措施的影响奠定基础^[70-71]。

(2) 牛津纳米孔技术 (Oxford nanopore technologies, ONT) 测序

牛津纳米孔测序主要是通过多重 RT-PCR

创建带条形码的 DNA 片段文库后, 将该文库加载到含有纳米孔的膜上。纳米孔是打开 DNA 双链的蛋白质, 当每个核苷酸通过膜时, 会引起离子电流的特定变化, 通过读取电流信号得到模板的核苷酸序列。与 NGS 测序相比, ONT 测序具有读长更长和速度极快的优势。NGS 测序通常需 0.5–3.0 d, 且需等测序结束后方可进行分析, 而纳米孔测序直接检测 DNA/RNA 分子通过纳米孔蛋白时产生的电流变化, 速度极快 (DNA=450 bp/s, RNA=80 bp/s), 且可实时记录和同步进行序列分析^[72]。有研究在 ONT 和 Illumina 平台上对 157 个 SARS-CoV-2 阳性样本进行了病毒全基因测序比较, 发现 ONT 测序读数中错误率较高^[73]。为降低 ONT 测序的错误率, Wang 等开发了一种纳米孔靶向测序 (nanopore targeted sequencing, NTS) 技术, 可在 6–10 h 内准确、全面地检测 SARS-CoV-2 等呼吸道病毒, 适用于疑似病例的识别, 还可监测病毒突变情况和鉴定病毒类型^[74]。但是, NTS 的周转时间比实时 RT-PCR 长, 操作也更复杂。因此, NTS 更适合作为补充手段, 用于进一步诊断无法通过 RT-PCR 准确评估的患者。此外, ONT 的技术流程及由此产生的测序数据分析和解读尚不成熟, 需要大量临床测试经不断优化以获得更准确的结果。

总的来说, 无论是哪种核酸检测技术, 最重要的是控制假阴性率和假阳性率。国家卫健委印发的《新型冠状病毒肺炎防控方案 (第五版)》在实验室检测技术指南中明确指出, 核酸检测结果阴性不能排除新型冠状病毒感染, 需要排除可能产生假阴性的因素, 具体包括: 样本质量差如来自口咽等部位的呼吸道样本; 过早或过晚收集的样本; 没有正确保存、运输和处理的样本; 病毒变异、PCR 抑制等技术本身存在的原因^[75]。另外, 引物和探针的浓度、纯化程度,

以及试剂中酶、金属离子等成分与质量的差异,都可能影响扩增效率和最后检测结果的灵敏度。因此,对临床高度疑似新型冠状病毒肺炎患者,应该连续采集标本并用多种技术进行多次检测。对于检测出现假阳性的原因,主要有以下几个方面:引物设计不合适、靶序列或扩增产物的交叉污染、标本间交叉污染、PCR 试剂的污染、实验室中克隆质粒的污染等。最常见的污染源是核酸气溶胶,离心、振荡、开盖、反复吹打等都会产生核酸气溶胶。从技术原理分析,等温扩增产生假阳性的概率大于 PCR,特别是等温扩增的反应温度接近室温时,试剂添加完毕后便马上开始大量拷贝,极易造成交叉污染。不过等温扩增技术中的 RCA 技术,反应一直以原始模板进行扩增,非特异性片段少,因此假阳率较低。COVID-19 常见检测方法的比较及其代表性试剂盒详见表 1^[76]。

3 展望

血清学检测是监测 COVID-19 感染传播的常用技术,成本较低。但其中抗体检测不能确认病毒的存在,而抗原检测的敏感性和特异性低,多用于家庭自检。临床医生无法仅根据血清学检测结果做出准确诊断,需再通过其他技术进行确认。RT-PCR 是检测的金标准,但时间长且需配备昂贵的设备,不适用于 POCT。等温检测技术包括 RPA、LAMP、NASBA、TMA、RCA 等,可用于即时检测,大量相关商业检测试剂盒已获 EUA 批准,尤其涉及不同 CRISPR/Cas 系统的等温分析显示出巨大的潜力。大多数核酸检测试剂盒是针对新型冠状病毒高度保守的基因区段设计特异性引物,避开了高频突变区域,如中国疾控中心指出 Omicron 变异株突变的位点主要集中在 S 蛋白基因的高变异区,并不位于我国第八版《新型冠状病毒

肺炎防控方案》公布的核酸检测试剂引物和探针靶标区域^[77]。因此,变异株的出现往往不影响核酸检测试剂的敏感性和特异性。

二代测序是变异鉴定的金标准,但价格昂贵、技术要求高,不能用作常规检测。比较全基因组测序,基于 RT-PCR 的变异毒株鉴定方法速度更快、通量更大且易于实施,可用于大规模筛查。为快速鉴定新型冠状病毒变异毒株,多家公司通过选取关键突变位点研发出多种核酸试剂盒,如复星的新型新型冠状病毒 B.1.1.7 突变株检测试剂盒、东方生物用于鉴别英国 B.1.1.7 新型冠状病毒异株的 N501Y 和 HV69-70del 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)、南非新型冠状病毒变异株的 K417N 和 E484K 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)等。此外, Banada 等和 Ong 等还开发了 RT-PCR 熔解温度 T_m 测定法来快速鉴定多种 SARS-CoV-2 突变体,通过分析探针与目标位点结合后的 T_m 值,确定是否存在特定的突变^[78-79]。Ning 等发表的 PAM 靶向检测法,可用于 POCT,其工作流程为通过多重 RT-RPA 反应扩增 ORF1a、S1 和 S2 区域后,放入预先装载有 gRNA-CRISPR 试剂混合物的微芯片孔中,最后在智能手机上读取荧光信号进行分析^[80]。该方法能够明显区分 Alpha 和 Delta 毒株以及参考 WA1 毒株,但不能区分其他变异毒株。这些新开发的荧光 PCR、 T_m 测定、PAM 靶向检测等技术,成本低、通量高、操作较简单,可替代 NGS 进行新冠变异毒株鉴别。

总体而言,在短短两年内研发人员开发了多种用于检测 COVID-19 的方法。基于实验室的分子检测,由于样本容量有限且周转时间长,建议使用 RT-LAMP、CRISPR 和其他等温扩增等快速即时检测技术作为筛查的替代方案,但需针对新型冠状病毒双靶标基因(N 基因和 ORF1ab 基因)进行设计,以提高对变异毒株的

表 1 COVID-19 检测方法总结^[75]
Table 1 Summary of the different diagnostic methods available for COVID-19^[75]

Methods	Biomarkers	Description	Sample type	Operating temperature	Assay time	Advantages	Limitations	Representative kits
RT-PCR	SARS-CoV-2 RNA	Conventional PCR; gold standard	Respiratory specimen	Thermal cycling	2–4 h	High sensitivity and specificity	Requires specialized equipment and expertise; cross contamination leads to false positives; genetic variation leads to false negatives	CDC: 2019-novel coronavirus real-time RT-PCR diagnostic panel
ddPCR	SARS-CoV-2 RNA	Limiting dilution, endpoint PCR and poisson statistics	Throat swab	Thermal cycling	1 h	Detection of infection in low viral load samples	ddPCR is currently more expensive than qPCR and requires specialized equipment and consumables	Gnomegen: COVID-19 RT-digital PCR detection kit
RT-LAMP	SARS-CoV-2 RNA	RNA reverse transcription and nucleic acid amplification in one step	Throat swab	60–65 °C	30 min	High sensitivity and specificity; no special equipment is required	Primer design and screening are the difficulties of LAMP, which are time-consuming and energy-consuming	MobileDetect-BIO BCC19 test kit for SARS-CoV-2 detection
CRISPR (SHERLOCK)	SARS-CoV-2 RNA	CRISPR/Cas13-based nucleic acid detection method; check the results visually using commercially available test strips	Nasopharyngeal swab	–	<1 h	Low cost; ultra sensitive; no special equipment required	Cas13 does not catalytically activate in the presence of two or more mismatches; multi-step nucleic acid amplification may affect accurate quantification; RNA secondary structure is sensitive, unstable, and prone to chimerism; target site restriction; toxicity and immunogenicity of Cas protein	Sherlock BioSciences: CRISPR-based tests for SARS-CoV-2
CRISPR (DETECTR)	SARS-CoV-2 RNA	RT-LAMP; CRISPR-Cas12-based lateral flow analysis	Respiratory specimen	62, 37 °C	<40 min	Fast, easy to implement and precise	Sample collection and RNA extraction methods can lead to false positives or false negatives; RNA secondary structure is sensitive, unstable, and prone to chimerism; target site restriction; toxicity and immunogenicity of Cas protein	Mammoth Biosciences: SARS-CoV-2 DETECTR

(待续)

(续表 1)

Methods	Biomarkers	Description	Sample type	Operating temperature	Assay time	Advantages	Limitations	Representative kits
NGS	SARS-CoV-2 RNA	Next-generation sequencing; Gene sequence	Respiratory specimens	Need a variety of temperatures	12 h	Accurate, specific gene sequences can be obtained, and unknown mutant strains can be found and distinguished	At present, the most expensive detection technology requires special equipment, long time, high cost and complicated operation	NovaSeq 6000/Illumina COVIDSeq Test
Antibody detection	Proteins (IgG and IgM antibodies)	Lateral flow immunoassay	Blood samples	Room temperature	15 min	Fast, easy to implement, no special instruments required, simple to operate	Prone to false positive and false negative results; antibody production is time-dependent; Cross-reactivity between similar viruses	Beckman Coulter: ACCESS SARS-CoV-2 IgG
Antigen detection	Protein (antigen)	Chemiluminescent enzyme immunoassay	Nasopharyngeal swab	Room temperature	<1 h	Fast, low cost, easy to operate, can be used for home self-inspection	Presence of SARS-CoV-2 antigen does not necessarily imply presence of live virus; low viral load and low sensitivity	Siemens Healthineers: CLINITEST Rapid COVID-19 Antigen Self-Test

检出率。对于未来类似于 COVID-19 的传染病,可采用的基于实验室的分子检测法如荧光 PCR、ddPCR、NGS、ONT 测序和其他需专业特殊设备的方法,其主要适用于对结果准确性要求高的情况。家用检测试剂对操作简便性的要求高,大多采用血清学检测,尤其是试纸条形式的抗原检测。一些可直接观察结果的常温扩增试剂盒也可用于家庭自检,等温扩增法不需要 RT-PCR 中涉及的复杂热循环,但仍需要小型便携式机器,而且与抗原检测相比,出结果的时间更长。组织开展大规模筛查时,关键要素是通量、价格和结果的可追溯性,可选用的检测方法有荧光 PCR、结合高通量设备的等温扩增法、ELISA 法和 CLIA 法等。ELISA 法和 CLIA 法的灵敏度较低,而荧光 PCR 法需经实验室检测,周转时间长。所以,可用于即时检验的高通量等温扩增技术是大规模筛查的最佳方法,但等温扩增核酸检测仍处于起步阶段,需要更多的临床试验数据,希望这些等温扩增法未来发展成更先进的技术,以实现病原体进行高效、简单、快速的检测。

REFERENCES

- [1] Kandimalla R, John A, Abburi C, et al. Current status of multiple drug molecules, and vaccines: an update in SARS-CoV-2 therapeutics. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(10): 4106-4116.
- [2] Saxena SK. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics. Singapore: Springer, 2020: 23-31.
- [3] Huang Y, Yang C, Xu XF, et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(9): 1141-1149.
- [4] Turoňová B, Sikora M, Schürmann C, et al. *In situ* structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science*, 2020, 370(6513): 203-208.
- [5] US. Food & Drug Administration. Sofia 2 SARS Antigen FIA Kit Instructions for Use[EB/OL]. [2022-02-05]. <https://www.fda.gov/media/137885/download>.
- [6] Lambert-Niclot S, Cuffel A, le Pape S, et al. Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS-CoV-2 antigen in nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(8): e00977-20.
- [7] Mertens P, de Vos N, Martiny D, et al. Development and potential usefulness of the COVID-19 Ag respi-strip diagnostic assay in a pandemic context. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 225.
- [8] Porte L, Legarraga P, Vollrath V, et al. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis*, 2020, 99: 328-333.
- [9] Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 3(3): CD013705.
- [10] Larremore DB, Wilder B, Lester E, et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. *Sci Adv*, 2021, 7(1): eabd5393.
- [11] Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, et al. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. *J Virol Methods*, 2021, 288: 114024.
- [12] 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抗原检测应用方案(试行)的通知[EB/OL]. [2022-03-15]. http://www.gov.cn/xinwen/2022-03/11/content_5678610.htm.
- [13] Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virol J*, 2020, 17(1): 177.
- [14] FDA. In Vitro Diagnostics EUAs-Antigen Diagnostic Tests for SARS-CoV-2[EB/OL]. [2022-02-05]. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-antigen-diagnostic-tests-sars-cov-2>.
- [15] Porte L, Legarraga P, Vollrath V, et al. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis*, 2020, 99: 328-333.
- [16] Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, et al. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol*, 2020, 154(3): 293-304.

- [17] GeurtsvanKessel CH, OKBA NMA, Igloi Z, et al. Towards the next phase: evaluation of serological assays for diagnostics and exposure assessment. [EB/OL]. [2022-04-04]. <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20077156>.
- [18] Tozetto-Mendoza TR, Kanunfre KA, Santos Vilas-Boas L, et al. Nucleoprotein-based ELISA for detection of SARS-CoV-2 IgG antibodies: could an old assay be suitable for serodiagnosis of the new coronavirus? *J Virol Methods*, 2021, 290: 114064.
- [19] Li ZT, Yi YX, Luo XM, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*, 2020, 92(9): 1518-1524.
- [20] Cassaniti I, Novazzi F, Giardina F, et al. Performance of VivaDiag COVID-19 IgM/IgG rapid test is inadequate for diagnosis of COVID-19 in acute patients referring to emergency room department. *J Med Virol*, 2020, 92(10): 1724-1727.
- [21] Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights*, 2017, 8(1): 9.
- [22] Bryan A, Pepper G, Wener MH, et al. Performance characteristics of the Abbott architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(8): e00941-20.
- [23] Ma H, Zeng WH, He HL, et al. COVID-19 diagnosis and study of serum SARS-CoV-2 specific IgA, IgM and IgG by a quantitative and sensitive immunoassay. [EB/OL]. [2022-04-04]. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20064907>.
- [24] Van Elslande J, Houben E, Depypere M, et al. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(8): 1082-1087.
- [25] Traugott M, Aberle SW, Aberle JH, et al. Performance of SARS-CoV-2 antibody assays in different stages of the infection: comparison of commercial ELISA and rapid tests. *J Infect Dis*, 2020, 222(3): 362-366.
- [26] Autorité De Santé Haute. Place Des Tests Sérologiques Dans La Stratégie De Prise En Charge De La Maladie COVID-19. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020, 526: 48-56.
- [27] Infectious Diseases Society of America. IDSA COVID-19 Antibody Primer. [EB/OL]. [2021-12-15]. <https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/public-health/covid-19/idsa-covid-19-antibody-testing-primer.pdf>
- [28] Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*, 2020, 66(4): 549-555.
- [29] Chan JFW, Yuan SF, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 2020, 395(10223): 514-523.
- [30] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, 25(3): 2000045.
- [31] Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N Engl J Med*, 2020, 382(10): 929-936.
- [32] Corman V, Bleicker T, Brunink S, Drosten C. 2020. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. World Health Organization, Geneva, Switzerland. [EB/OL]. [2020-01-13]. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2.
- [33] LeBlanc JJ, Gubbay JB, Li Y, et al. Real-time PCR-based SARS-CoV-2 detection in Canadian laboratories. *J Clin Virol*, 2020, 128: 104433.
- [34] Government of Canada. 2020. Interim national case definition: coronavirus disease (COVID-19), updated April 2, 2020. Government of Canada, Ottawa, Ontario, Canada. [EB/OL]. [2021-12-17]. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/2019-novel-coronavirus-infection/health-professionals/national-case-definition.html>.
- [35] Smith E, Zhen W, Manji R, et al. Analytical and clinical comparison of three nucleic acid amplification tests for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(9): e01134-20.
- [36] Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, et al. Evaluating the newly developed BioFire COVID-19 test for SARS-CoV-2 molecular detection. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(12): 1699-1700.
- [37] Arumugam A, Faron ML, Yu P, et al. A rapid COVID-19 RT-PCR detection assay for low resource settings. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(10): 739.
- [38] Hui Y, Wu ZM, Qin ZR, et al. Micro-droplet digital polymerase chain reaction and real-time quantitative polymerase chain reaction technologies provide highly sensitive and accurate detection of zika virus. *Virol Sin*,

- 2018, 33(3): 270-277.
- [39] Zaghloul H, El-Shahat M. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World J Hepatol*, 2014, 6(12): 916-922.
- [40] Wang J, Cai K, He X, et al. Multiple-centre clinical evaluation of an ultrafast single-tube assay for SARS-CoV-2 RNA. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(8): 1076-1081.
- [41] Qian J, Boswell SA, Chidley C, et al. An enhanced isothermal amplification assay for viral detection. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5920.
- [42] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223-229.
- [43] Sharma S, Kabir MA, Asghar W. Lab-on-a-chip zika detection with reverse transcription loop-mediated isothermal amplification-based assay for point-of-care settings. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(11): 1335-1343.
- [44] Hardinge P, Murray JAH. Reduced false positives and improved reporting of loop-mediated isothermal amplification using quenched fluorescent primers. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7400.
- [45] Lu RF, Wu XM, Wan ZZ, et al. Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Virol Sin*, 2020, 35(3): 344-347.
- [46] Yan C, Cui J, Huang L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(6): 773-779.
- [47] Yang WH, Dang XF, Wang QX, et al. Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method. [EB/OL]. [2022-04-04]. <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030130>.
- [48] Zhu X, Wang XX, Han LM, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosens Bioelectron*, 2020, 166: 112437.
- [49] Abd el-Galil KH, El-Sokkary MA, Kheira SM, et al. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 7113-7116.
- [50] Damen M, Sillekens P, Cuypers HT, et al. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J Virol Methods*, 1999, 82(1): 45-54.
- [51] Wu QX, Suo CQ, Brown T, et al. INSIGHT: a population-scale COVID-19 testing strategy combining point-of-care diagnosis with centralized high-throughput sequencing. *Sci Adv*, 2021, 7(7): eabe5054.
- [52] Brentano ST, Mcdonough SH. Isothermal Amplification of RNA by Transcription-Mediated Amplification (TMA) Nonradioactive Anal Biomol. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000: 374-380.
- [53] Pham J, Meyer S, Nguyen C, et al. Performance characteristics of a high-throughput automated transcription-mediated amplification test for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(10): e01669-20.
- [54] Gorzalski AJ, Tian HL, Laverdure C, et al. High-Throughput Transcription-mediated amplification on the Hologic Panther is a highly sensitive method of detection for SARS-CoV-2. *J Clin Virol*, 2020, 129: 104501.
- [55] Zhen W, Manji R, Smith E, et al. Comparison of four molecular *in vitro* diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(8): e00743-20.
- [56] Hologic Panther. Aptima® SARS-CoV-2 Assay 2020. [EB/OL]. [2021-12-05]. <https://www.fda.gov/media/138096/download>.
- [57] Tian B, Gao F, Fock J, et al. Homogeneous circle-to-circle amplification for real-time optomagnetic detection of SARS-CoV-2 RdRp coding sequence. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112356.
- [58] Huang W, Hsu H, Su J, et al. Room temperature isothermal colorimetric padlock probe rolling circle amplification for viral RNA detection. [EB/OL]. [2022-04-04]. <https://doi.org/10.1101/2020.06.12.128876>.
- [59] Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, et al. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clin Microbiol Rev*, 2021, 34(3): e00228-20.
- [60] Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. 2020. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. Broad Institute, MIT, Cambridge, MA. [EB/OL]. [2022-04-04]. <https://go.idtdna.com/rs/400-UEU-432/images/Zhang%20et%20al.%2C%202020%20COVID-19%20detection%20%28updated%29.pdf>.
- [61] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing. *N Engl J Med*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [62] Broughton JP, Deng XD, Yu GX, et al. CRISPR-cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*,

- 2020, 38(7): 870-874.
- [63] Zhou HF, Tsou JH, Chinthalapally M, et al. Detection and differentiation of SARS-CoV-2, influenza, and respiratory syncytial viruses by CRISPR. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(5): 823.
- [64] First NGS-based COVID-19 diagnostic. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 777.
- [65] Nasir JA, Kozak RA, Aftanas P, et al. A comparison of whole genome sequencing of SARS-CoV-2 using amplicon-based sequencing, random hexamers, and bait capture. *Viruses*, 2020, 12(8): 895.
- [66] Tian JB, Yuan XL, Xiao J, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol*, 2020, 21(7): 893-903.
- [67] Lu J, du Plessis L, Liu Z, et al. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China. *Cell*, 2020, 181(5): 997-1003.e9.
- [68] Meredith LW, Hamilton WL, Warne B, et al. Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(11): 1263-1272.
- [69] Xiao MF, Liu XQ, Ji JK, et al. Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples. *Genome Med*, 2020, 12(1): 57.
- [70] Jary A, Leducq V, Malet I, et al. Evolution of viral quasi species during SARS-CoV-2 infection. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(11): 1560.e1-1561560.e4.
- [71] Karamitros T, Papadopoulou G, Bousali M, et al. SARS-CoV-2 exhibits intra-host genomic plasticity and low-frequency polymorphic quasi species. *J Clin Virol*, 2020, 131: 104585.
- [72] Jain M, Olsen HE, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 239.
- [73] Bull RA, Adikari TN, Ferguson JM, et al. Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6272.
- [74] Wang M, Fu AS, Hu B, et al. Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. *Small*, 2020, 16(32): e2002169.
- [75] 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防控方案(第五版)的通知[EB/OL]. [2022-03-15]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/22/content_5482010.htm.
- [76] Administration U F A D. *In vitro* diagnostics EUAs. US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. [EB/OL]. [2022-02-05]. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-molecular-diagnostic-tests-sars-cov-2>.
- [77] 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防控方案(第八版)的通知[EB/OL]. [2022-03-15]. http://www.gov.cn/xinwen/2021-05/14/content_5606469.htm.
- [78] Banada P, Green R, Banik S, et al. A simple reverse transcriptase PCR melting-temperature assay to rapidly screen for widely circulating SARS-CoV-2 variants. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(10): e0084521.
- [79] Ong DSY, Koeleman JGM, Vaessen N, et al. Rapid screening method for the detection of SARS-CoV-2 variants of concern. *J Clin Virol*, 2021, 141: 104903.
- [80] Ning B, Youngquist BM, Li DD, et al. Rapid detection of multiple SARS-CoV-2 variants of concern by PAM-targeting mutations. *Cell Rep Methods*, 2022, 2(2): 100173.

(本文责编 郝丽芳)