

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.10

新型冠状病毒实验室检测技术及其进展*

李晨希¹, 赵呈雪¹, 鲍金凤¹, 康海全², 马萍^{1,2}, 顾兵^{1,2} (1. 徐州医科大学医学技术学院, 徐州市实验诊断学重点实验室, 江苏徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221006)

摘要:2019 年, 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染在中国湖北省武汉市暴发, 该病毒引发的疾病(COVID-19)已对公共卫生构成严重威胁。快速、早期检测 SARS-CoV-2 有助于疫情的控制。该文拟分析 SARS-CoV-2 现有实验室检测方法的优点与不足, 同时展望检测技术未来的研发方向, 为 SARS-CoV-2 及未来可能出现的其他未知病毒引起的疾病的诊疗提供指导。

关键词:新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 核酸检测; 免疫学试验; 基因测序

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

冠状病毒(coronaviruse, CoV)是一类严重危害人类健康的病原微生物, 目前发现的冠状病毒有十几种。该类病毒在进化过程中极易发生基因重组和变异, 呈现遗传多样性, 新亚型及新的冠状病毒在此过程中不断出现。21 世纪以来, 冠状病毒在全球共引起 3 次疫情: 2002 年在中国广东省首次暴发的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndromes, SARS), 2012 年在沙特阿拉伯暴发的中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)以及 2019 年在中国湖北武汉暴发的新型冠状病毒导致的严重急性呼吸感染, 都对人类健康造成了很大的威胁。目前, 国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)将新型冠状病毒正式命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。世界卫生组织(WHO)同时宣布由这一病毒导致的疾病英文名称为 coronavirus disease 2019(COVID-19)。SARS-CoV-2 快速精准的实验室检测是控制 COVID-19 疫情的关键。该文拟对目前出现的 SARS-CoV-2 检测方法及存在问题进行综述。

1 血清免疫学试验

病毒培养的限制条件较多, 免疫学方法操作简便易行, 适用于高危人群的早期筛查, 但其敏感性及特异性还需要进一步的验证和评估。病毒感染人体后约 5~7 d 可产生 IgM 抗体, 10~15 d 可产生 IgG 抗体^[1]。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》^[2]新增加了抗体血清学检测作为疑似病例诊断病毒感染的另一关键证据: 血清新型冠状病毒特异性 IgM 抗体和 IgG 抗体阳性; 血清新型冠状病毒特异性 IgG 抗体由阴性转为阳性或恢复期较急性期 4 倍及以上升高。目前临床应用的抗原、抗体检测方法主要包括免疫层析法(immunochromatography assay, ICA)、化学发光法、酶联免疫吸附法等。

1.1 ICA ICA 具有操作快速、简单、成本低的优势。Jia 等^[3]采用 ICA 对 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 的诊断价值进行了评估, 在 57 例疑似 COVID-19 患者中 24 例核酸检测阳性患者 IgM 和 IgG 单次检测阳性率分别为 79.17% 和 66.67%; 33 例核酸检测阴性患者 IgM 和 IgG 单次检测阳性率分别为

60.61% 和 45.45%; 核酸阳性和核酸阴性患者的 IgM 与 IgG 联合检测的阳性率分别为 87.50% 和 72.73%, 明显高于核酸检测或 IgM、IgG 单次检测。Li 等^[4]开发了一种快速、简便的侧向流免疫分析法(lateral flow immunoassay, LFIA), 能在 15 min 内检出人体血液中抗 SARS-CoV-2 的 IgM 和 IgG 抗体。该研究对 397 例经 PCR 证实的 SARS-CoV-2 感染患者和 128 例核酸阴性患者的血标本进行分析, IgG、IgM 联合抗体检测的敏感性和特异性分别为 88.66% 和 90.63%。此外, 该方法可采用指尖血进行 IgG/IgM 抗体筛查, 有望实现 SARS-CoV-2 的床旁检测(point-of-care testing, POCT)。

1.2 化学发光法 化学发光法特异性高、线性范围宽、速度快, 已广泛应用于呼吸道病原体的检测。徐万洲等^[5]用全自动化学发光免疫分析技术对 205 例 COVID-19 病例组(包括 186 例 SARS-CoV-2 核酸检测阳性患者以及 19 例核酸检测阴性但临床症状和 CT 检测结果符合《新型冠状病毒肺炎防控方案(第五版)》的患者)和 79 例对照组进行血清 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG 抗体检测, 结果发现 SARS-CoV-2 IgM 和 SARS-CoV-2 IgG 的敏感性分别为 70.24% (144/205) 和 96.10% (197/205), 特异性分别为 96.20% (76/79) 和 92.41% (73/79); 在 SARS-CoV-2 核酸阳性的 COVID-19 患者中绝大多数患者 IgG 阳性, 且 IgG 的阳性率明显高于 IgM 的阳性率, 表明患者处于感染中期或恢复期, 预示患者对 SARS-CoV-2 逐渐产生了免疫力。因此, IgM 和 IgG 联合检测在 COVID-19 早期检测、治疗监测及病程转归方面有重要价值。此外, 李萍等^[6]采用全自动化学发光仪对 COVID-19 患者的 IgM 和 IgG 抗体进行检测, 发现核酸转阴后血清 IgM 抗体浓度显著低于核酸转阴前 IgM 抗体浓度, 而转阴后的 IgG 抗体浓度与核酸转阴前的 IgG 抗体浓度差异无统计学意义。

1.3 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ELISA 可用于冠状病毒抗原和抗体的检测, 其特异性强, 对操作人员要求低, 不要求很复杂的设备, 无放射性核素的危险, 是目前应用较广的一种冠状病毒实验室检测技术。Wang 等^[7]在大肠埃希菌中表达并纯化了带有 His 标记的与 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白同源率为 92% 的核衣壳蛋白片段 SARSr-CoV Rp3, 该研究团队 Zhang 等^[8]以 SARSr-CoV

* 基金项目:江苏省医学重点人才项目(ZDRCA2016053)。

作者简介:李晨希, 1995 年生, 女, 技师, 硕士研究生, 主要从事临床微生物学研究。

通信作者:顾兵, E-mail: gb20031129@163.com; 马萍, E-mail: pingm62@aliyun.com。

Rp3 作为抗原开发了 SARS-CoV-2 IgM 和 IgG ELISA 检测方法,进一步用该方法对接受了 10 d 左右治疗的患者血清进行抗体检测,结果显示 IgM 和 IgG 滴度在首次采样当天都相对较低或无法检出,在采样第 5 天 IgM 阳性率从 50% (8/16) 增加到 81% (13/16),而 IgG 阳性率从 81% (13/16) 增加到 100% (16/16)。

1.4 中和试验(neutralization assay, NA) NA 是病毒或毒素与相应的抗体结合后,失去对易感动物的致病力的试验方法。Zhou 等^[1]通过 Vero E6 和 Huh7 细胞从武汉地区 1 名 COVID-19 危重症患者的支气管肺泡灌洗液中分离出 SARS-CoV-2,并在 Vero E6 细胞中对 5 名经 PCR 证实的 SARS-CoV-2 IgG 阳性患者的血清进行中和试验,结果表明,5 名患者血清在 1:40~1:80 的稀释度下,均能中和 100 TCID₅₀ (50%组织培养感染剂量)。NA 是一项耗时且费力的免疫测定法,不能用于大规模筛查,但其具有很高的特异性。

1.5 抗体检测的影响因素 抗体检测的干扰因素主要有类风湿因子(RF)、嗜异性抗体、补体以及免疫交叉反应^[9-10]。患者体内存在的 RF 能显著干扰许多免疫学检测方法,其中 IgM、IgG 类 RF 可以与免疫检测系统中的捕获抗体及标记二抗的 Fc 段直接结合,从而出现假阳性结果^[8]。嗜异性抗体通常是指能与其他种类动物的免疫球蛋白产生反应的人类抗体,具有广泛的种特异性。免疫检测系统中使用单克隆抗体,嗜异性抗体可与啮齿类动物 IgG 的 Fc 段结合,这样嗜异性抗体既可与检测系统中的捕获抗体结合,又可与标记抗体结合,从而造成检测结果假阳性^[9]。

在固相免疫测定中,来自哺乳动物的固相特异抗体和标记二抗均可以激活人补体系统。因为其在固相吸附及结合过程中,抗体分子发生变构,Fc 段的补体 C1q 结合位点被暴露出来,这样 C1q 就成为一个中介物将二者交联起来,从而出现假阳性结果^[8]。不同种冠状病毒 N 蛋白或 S 蛋白存在免疫交叉反应,邹明园等^[10]用 DNASTar 软件对 7 种冠状病毒 N 蛋白和 S 蛋白的氨基酸序列进行同源性分析,N 蛋白和 S 蛋白同源性分析结果均显示与 SARS-CoV-2 相似性最高的是 SARS-CoV,提示基于 N 或 S 蛋白的抗体血清学检测,可能受其他冠状病毒感染影响出现交叉反应而导致假阳性结果。

2 核酸扩增

国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》指出,对于疑似病例如果具备 SARS-CoV-2 核酸阳性或者基因测序与已知的 SARS-CoV-2 基因组高度同源即可确诊为 COVID-19^[2]。目前 SARS-CoV-2 的全基因组序列信息已经被上传到 GSAID 数据库,根据数据库公开的基因组信息,针对 SARS-CoV-2 的靶基因设计特定的荧光探针可实现病毒核酸检测。SARS-CoV-2 的核酸检测技术主要包括实时荧光逆转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)^[11]、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[12]、基于纳米颗粒的 PCR (nanoparticles-based PCR)^[13]和数字 PCR (digital PCR, dPCR)^[14]等。

2.1 实时荧光 RT-PCR 技术 荧光 RT-PCR 具有快速简便、成本较低、不依赖抗原抗体制备的优势,是 SARS-CoV-2 检测的主流方法。但 RT-PCR 检测结果为阴性时不能排除

COVID-19,需要排除可能产生假阴性的各种因素,包括标本采集、标本病毒含量和实验技术本身原因等。

SARS-CoV-2 实时荧光 RT-PCR 法试剂盒检测主要分为开放阅读框 1ab(open reading frame 1ab, ORF1ab)基因、核壳蛋白基因 N 片段和包膜蛋白基因 E 片段 3 个靶点或 ORF1ab 和 N 片段 2 个靶点。Corman 等^[11]针对 SARS-CoV-2 的 *RdRp* 基因、E 基因和 N 基因分别设计了 3 种不同的探针,同时扩增呼吸道和粪便标本中 SARS-CoV-2 的 3 个靶基因。其中针对 *RdRp* 基因设计了 2 种探针,一种探针在检测不同的冠状病毒之间无特异性,而另一种探针只特异地识别 SARS-CoV-2 的 *RdRp* 基因,该方法具有较高的敏感性和特异性,可区分 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 等其他冠状病毒。尽管实时荧光 RT-PCR 检测方案是针对病毒基因组保守区域而言,但是由于 RNA 病毒表现出大量的遗传变异,引物、探针和目标序列之间的不匹配可能导致检测性能下降,出现假阴性结果。

2.2 LAMP LAMP 只需一个温度进行扩增,不会因为热循环而损失检测时间,通常在 1 h 内即可完成病毒核酸的检测,具有扩增迅速、操作简便等优点。Yu 等^[12]针对 ORF1ab 基因开发了一种基于等温 LAMP 的检测方法(isothermal LAMP based method for COVID-19, iLACO),通过对 11 种呼吸道病毒(包括 7 种相似的冠状病毒、2 种流感病毒和 2 种正常的冠状病毒)的序列比较发现,iLACO 具有较好的种特异性。此外,iLACO 的敏感性可与基于 Taqman 探针的 RT-PCR 相媲美,能够检测出低至 10 个拷贝的 SARS-CoV-2。由于 LAMP 技术具有操作简单、灵敏度高、可视化等优点,在分子诊断领域有很好的应用前景。

2.3 基于纳米颗粒的 PCR 相比于传统的核酸检测方法,将纳米颗粒引入 PCR 体系,可以提高病原体检测的敏感性和特异性。Zhao 等^[13]研发了一种基于羧基包覆磁性纳米颗粒[a carboxyl groups (PC)-coated magnetic nanoparticles, pcMNPs]的方法,该方法将裂解和结合步骤合二为一,将 pcMNPs-RNA 复合物直接引入后续的 RT-PCR 反应,通过对 SARS-CoV-2 的 2 个靶片段(ORF1ab 和 N 基因)的检测分析,可以灵敏地检测到 10 拷贝的病毒 RNA。该方法检测效果好,周转时间短,对 COVID-19 的早期临床诊断具有重要意义。

2.4 dPCR dPCR 具有绝对定量的优点,在 HBV 和 HIV 检测中已被证实比 RT-PCR 更敏感^[16-17]。Yu 等^[14]从 76 例 COVID-19 确诊患者中收集鼻咽拭子、痰、血和尿液共 323 份临床标本,分别采用微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)和 RT-PCR 对 2 个靶基因(ORF1ab 和 N)进行分析,结果显示 95 份经 RT-PCR 检测呈双靶基因阳性的标本 ddPCR 结果也呈阳性,且 ddPCR 的拷贝数与 RT-PCR 测定的 Ct 值高度相关(ORF1ab: $R^2 = 0.83$; N: $R^2 = 0.87$); 67 份 RT-PCR 检测呈单靶点阳性的标本中,41 (61.2%)份标本 ddPCR 检测呈阳性,病毒载量为 11.1~123.2 copies/test; 在 161 份 RT-PCR 检测阴性的标本中,ddPCR 检出 4 个标本呈阳性,病毒载量为 11.3~20.7 copies/test。该研究表明,RT-PCR 和 ddPCR 检测病毒载量高的标本和 SARS-CoV-2 为阴性的标本均准确可靠,但是 ddPCR 更适用于检测病毒载量低的标本。

2.5 核酸检测的影响因素 SARS-CoV-2 核酸检测的样本类

型包含呼吸道样本、消化道样本和血液样本,对不同的患者需要采集不同类型的样本。临床上对于多数患者采集的样本类型为咽拭子,但是咽拭子采集不易得到足量的合格标本,可能导致检测结果不准确。对于已出现明显症状的患者来说,下呼吸道样本如深咳痰液为核酸检测的首选。最近,陈炜等^[18]研究发现痰标本中的病毒 RNA 载量高于咽拭子标本,可能与 SARS-CoV-2 侵袭下呼吸道和肺有关。

段秀枝等^[19]分析了不同的病毒灭活方式对 SARS-CoV-2 核酸检测的影响,分别比较了不灭活处理和 56 °C 水浴 30 min、56 °C 干浴 60 min 及 60 °C 干浴 30 min 对 3 例 COVID-19 患者咽拭子核酸检测弱阳性结果的影响。研究发现灭活后 SARS-CoV-2 核酸检测阳性率降低,56 °C 水浴 30 min 的阳性检出率较 56 °C 干浴 60 min 及 60 °C 干浴 30 min 高,但是差异无统计学意义。陈培松等^[20]发现经过 56 °C 30 min 和 75% 乙醇处理的咽拭子标本对 2 例 COVID-19 患者后续 SARS-CoV-2 核酸检测均无明显影响。但这些研究的标本数量较少,尚需进一步验证。

不同核酸提取方法的提取浓度、纯度及对 RNA 的保护程度存在差别,在一定程度上也影响病毒核酸检测的阳性率。磁珠法具有高效、简便、提取浓度和纯度较高等优点,是 RT-PCR 中常用的核酸提取方法。离心柱法、一步裂解释放法、煮沸裂解法等也被临床实验室大量应用,各实验室应根据自身条件以及各核酸测试试剂盒的要求选择合适的提取方法。此外,很多核酸测试试剂盒尚缺乏大量临床试验数据和统一的质控标准,对病毒核酸的检测可能产生假阴性结果。

3 基因测序

病毒全基因组测序(whole-genome sequencing, WGS)是开发新的治疗方法和研制疫苗、研究病毒进化或阻止传染病暴发的有力工具,也为识别与公共卫生相关的流行病和控制感染提供了良好的数据。

宏基因组测序是一种简单、低成本的方法,也是唯一一种不要求参考序列的方法,可以对新的病原体或序列变体作出快速分析。Chen 等^[21]用一种低输入的宏基因组测序方法对从支气管肺泡灌洗液中提取的病毒 RNA 进行测序,快速鉴定出 SARS-CoV-2。宏基因组测序的局限性是需要很高的测序深度才能获得足够的病毒^[22],而且获得足够数据的测序成本很高,对目标病原体的敏感度相对较低。纳米孔测序(nanopore target sequencing, NTS)结合了靶标扩增和长时实时纳米孔测序的优势,可在 6~10 h 内同时完成对 SARS-CoV-2 和其他呼吸道病毒的鉴定。Wang 等^[23]同时使用 RT-PCR 和 NTS 对 61 份疑似 COVID-19 病例的核酸样品进行了平行测试,发现 NTS 可以识别出更多 SARS-CoV-2 感染的患者,并且可以同时鉴定出合并感染的其他病原体。此外,NTS 可以监测突变的核酸序列,提高了 SARS-CoV-2 鉴定的准确性。

Xiao 等^[24]用宏基因组测序、探针捕获测序和多重 PCR 扩增子测序 3 种方法分别对 8 例梯度稀释的 SARS-CoV-2 培养物(Ct 值 17.3~39.9)和 8 例 COVID-19 临床标本(Ct 值 18~32,包括咽拭子、喉拭子、鼻拭子、肛拭子和唾液标本)基于 DNBSEQ 平台进行分析,发现当病毒载量 $\geq 10^5$ copies/mL

或 Ct 值 ≤ 24.5 时,推荐宏基因组测序方法;当病毒载量 $< 10^5$ copies/mL 或 Ct 值 > 24.5 时,如果关注次要碱基突变和碱基频率,则推荐探针捕获测序方法,如果关注主要碱基突变,则推荐多重 PCR 扩增子测序方法。此外,当病毒载量低至 10^2 copies/mL 或 Ct 值高至 35,推荐多重 PCR 扩增子测序方法。因此,各实验室需要根据自身条件选择合适的测序方法。

4 小结与展望

目前,SARS-CoV-2 的实验室检测方法有限,对 COVID-19 及时、准确的诊断可以对感染进行适当的控制。基于实时荧光 RT-PCR 法的 SARS-CoV-2 核酸检测已经广泛应用并作为实验室确诊方法;WGS 对基因组序列的研究可以揭示 SARS-CoV-2 的遗传进化关系,是未来呼吸道病毒的实验室诊断的金标准;通过检测病毒特异性抗原或抗体来实现呼吸道病毒的 POCT 快速诊断是目前实验室诊断技术发展的趋势。这些技术的联合使用将会提高 SARS-CoV-2 的检出率。此外,COVID-19 临床实验室诊断应还要结合影像学检查,有助于不典型病例的诊断与鉴别诊断。COVID-19 的暴发对各临床实验室和科研机构也提出了更高的要求,实验室操作人员应做好生物安全防护工作,严格按照标准操作规程实施 SARS-CoV-2 检测工作,做好标本检测的分析前、检测中及检测后的质量控制工作。各技术厂家应对所研发的 SARS-CoV-2 检测产品进行充分的性能评价,对研发人员进行严格的培训与考核。相信在不同群体的共同努力下,将会实现 COVID-19 以及未来新发呼吸道疾病的精准诊疗。

5 参考文献

- [1] Zhou P, Yang XL, Wang XG, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [2] 中华人民共和国卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. (2020-03-04) [2020-03-18]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [3] Jia X, Zhang P, Tian Y, *et al.* Clinical significance of IgM and IgG test for diagnosis of highly suspected COVID-19 infection[J/OL]. medRxiv, 2020(2020-03-12) [2020-03-18]. <https://doi.org/10.1101/2020.02.28.20029025>.
- [4] 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/OL]. *J Med Virol*, 2020(2020-02-27) [2020-03-18]. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>.
- [5] 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, 43(2020-02-27) [2020-03-18]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182736.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200223-00109.
- [6] 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, 43(2020-03-08) [2020-03-18]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1184360.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200302-00155.
- [7] Wang N, Li SY, Yang XL, *et al.* Serological evidence of bat SARS-related coronavirus infection in humans, China[J]. *Virology*, 2018,

- 33(1): 104-107.
- [8] Zhang W, Du RH, Li B, *et al.* Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 386-389.
- [9] 陈金超, 刘涤瑕, 王丽, 等. 免疫学检测方法中的干扰因素和对策[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(21): 2575-2576.
- [10] 邹明园, 吴国球. 抗原交叉反应对新型冠状病毒血清特异性抗体检测的影响[J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(3): 161-163.
- [11] Corman VM, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. *Euro Surveill*, 2020, 25(3): 2000045.
- [12] Yu L, Wu S, Hao X, *et al.* Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse tran-scriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic plat-form: iLACO [J]. *medRxiv*, 2020 (2020-02-24) [2020-03-18]. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.20025874>.
- [13] Zhao Z, Cui H, Song W, *et al.* A simple magnetic nanoparticles-based viral RNA extraction method for efficient detection of SARS-CoV-2[J]. *bioRxiv*, 2020 (2020-02-27) [2020-03-18]. <https://doi.org/10.1101/2020.02.22.961268>.
- [14] Yu F, Yan L, Wang N, *et al.* Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, ciaa345.
- [15] 童永清, 汪明, 徐万洲, 等. 新型冠状病毒核酸检测临床实验室操作规范的建议[J/OL]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43 (2020-02-11) [2020-02-20]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1180187.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.0003.
- [16] Huang JT, Liu YJ, Wang J, *et al.* Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 290-296.
- [17] Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, *et al.* HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation [J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 244-248.
- [18] 陈炜, 张春阳, 朱颖, 等. 4 例新型冠状病毒感染病例咽拭子与痰标本病毒核酸检测的比较[J/OL]. *中国人兽共患病学报*, 2020 (2020-02-12) [2020-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1284.R.20200211.2118.002.html>.
- [19] 段秀枝, 王旭楚, 俞攀, 等. 病毒灭活处理对 2019 新型冠状病毒核酸检测弱阳性结果的影响[J/OL]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43 (2020-03-09) [2020-03-18]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1184369.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200227-00138.
- [20] 陈培枝, 何宇婷, 黄裕立, 等. 不同方式灭活口咽拭子标本对 2019 新型冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测结果的影响[J/OL]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(2020-02-11) [2020-02-20]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1180188.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.0004.
- [21] 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): 313-319.
- [22] Houldcroft CJ, Beale MA, and Breuer J. Clinical and biological insights from viral genome sequencing[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(3): 183-192.
- [23] Wang M, Fu A, Hu B, *et al.* Nanopore target sequencing for accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses [J]. *medRxiv*, 2020 (2020-03-04) [2020-03-18]. <https://doi.org/10.1101/2020.03.04.20029538>.
- [24] Xiao M, Liu X, Ji J, *et al.* Multiple approaches for massively parallel sequencing of HCoV-19 (SARS-CoV-2) genomes directly from clinical samples [J]. *bioRxiv*, 2020 (2020-03-16) [2020-03-18]. <https://doi.org/10.1101/2020.03.16.993584>.

(收稿日期:2020-03-24)

(本文编辑:刘群)

(上接第 275 页)

- [3] 姚怡婷, 徐伟红, 谭美玉, 等. 不同实验室方法在肺结核辅助诊断中的应用评价[J]. *临床检验杂志*, 2019, 37(10): 789-792.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中华人民共和国卫生行业标准 肺结核诊断标准: WS288-2017[S]. 2018.
- [5] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015, 32-133.
- [6] 杨健, 张天华, 鲜小萍, 等. 5 种病原学检测方法在肺结核病诊断中的应用评价[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(7): 672-676.
- [7] 张帆, 刘守江, 魏巍, 等. 结核分枝杆菌实验室检测方法的结果差异分析及临床诊断评估[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(8): 1010-1012.
- [8] Sahrin M, Rahman A, Uddin MKM, *et al.* Discordance in Xpert MTB/RIF assay results among low bacterial load clinical specimens in Bangladesh[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2018, 22(9): 1056-1062.
- [9] Singh BK, Sharma SK, Sharma R, *et al.* Diagnostic utility of a line probe assay for multidrug resistant-TB in smear-negative pulmonary tuberculosis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182988.
- [10] 中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会. 结核病病原学分子诊断专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(9): 688-695.

(收稿日期:2020-03-03)

(本文编辑:周万青,刘群)