

核酸污染及其引起呼吸道病毒核酸检测假阳性的鉴定与防范

周 纯¹, 陈佑甲², 金志刚^{2*}

¹金华市人民医院科教科, 浙江 金华

²浙江师范大学生命科学院, 浙江 金华

收稿日期: 2023年3月13日; 录用日期: 2023年4月11日; 发布日期: 2023年4月19日

摘 要

呼吸道病毒引起的感染性疾病是一类严重威胁人类健康和生命的重大疾病。利用口咽拭子或鼻咽拭子进行呼吸道病原体鉴定, 对于病毒性呼吸道感染疾病的临床诊疗和疾病防控均具有重要意义。基于PCR的病毒核酸检测具有操作简便、灵敏度高、特异性强等优点, 现已普遍作为病毒病原体鉴定的常用手段。然而由于PCR超高的灵敏度, 病毒核酸检测容易因试剂、耗材和环境受到病毒核酸污染而出现假阳性结果, 从而影响病原体鉴定的准确性。从事呼吸道病毒研究或检测的科研、医疗工作者由于频繁使用、接触含有病毒核酸序列的表达质粒或阳性对照质粒, 其口咽和鼻咽面临核酸污染的高风险, 进而在取样口咽拭子或鼻咽拭子进行呼吸道病毒核酸检测时容易出现假阳性。本文以新型冠状病毒为例, 分析了核酸污染引起核酸检测假阳性的可能发生情况, 并探讨了核酸污染引起核酸检测假阳性的鉴定方法以及预防、消除核酸污染的处理方法, 以期减少该类事件的发生, 并助力病毒性呼吸道感染的精准诊疗。

关键词

呼吸道病毒, 新型冠状病毒, 核酸检测, 核酸污染, 假阳性

Identification and Prevention of Nucleic Acid Contamination and the Resultant False Positive Nucleic Acid Tests for Respiratory Viruses

Chun Zhou¹, Youjia Chen², Zhigang Jin^{2*}

¹Department of Science and Education, Jinhua People's Hospital, Jinhua Zhejiang

²College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

*通讯作者。

Abstract

Infectious diseases caused by respiratory viruses impose a severe threat to human health and life. Identification of the respiratory pathogen using oropharyngeal or nasopharyngeal swabs is essential for clinical diagnosis and treatment of viral respiratory infections, as well as disease control and prevention. PCR-based viral nucleic acid tests have been widely used in identification of viral pathogen due to its advantages in simple operation, high sensitivity and specificity. However, the super-sensitivity of PCR also renders viral nucleic acid tests high incidence of false positive results once the reagents, materials and environments get contaminated with viral nucleic acids, which interferes with the accuracy of pathogen identification. As research and hospital personnel engaged in research or detection of respiratory viruses frequently use or contact with expression plasmids or positive control plasmids that contain viral nucleic acid sequence, their oropharynx and nasopharynx face high risk of nucleic acid contamination, leading to high incidence of false positive results during nucleic acid tests of respiratory viruses using their oropharyngeal or nasopharyngeal swabs. Taking advantage of SARS-CoV-2 as an example, here we analyzed the potential situations that nucleic acid contamination-caused false positive results occur, and discussed how to identify nucleic acid contamination as the cause of false positive results, how to prevent and handle with nucleic acid contamination. We hope this study would be helpful to reduce the incidence of this event and aid precision diagnosis and treatment of viral respiratory infections.

Keywords

Respiratory Viruses, SARS-CoV-2, Nucleic Acid Tests, Nucleic Acid Contamination, False Positive

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

呼吸道病毒引起的病毒性呼吸道感染疾病是一类严重威胁人类健康和生命的重大疾病。鼻病毒、冠状病毒(如 HCoV-229E、HCoV-OC43)可引起普通感冒,流感病毒可引起流感,呼吸道合胞病毒可引起支气管炎,流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒和冠状病毒(如 SARS-CoV、SARS-CoV-2)可引起肺炎。通过检测呼吸道病原体的抗原、抗体或其核酸来鉴定感染呼吸道的病原体,不仅有助于针对感染患者采取合理的临床治疗方案,也有助于针对呼吸道感染疾病的传染和扩散采取有效防控措施。呼吸道病毒核酸检测通常利用口咽拭子或鼻咽拭子采集患者口咽或鼻咽部的病毒样本,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)序列特异性地扩增呼吸道病毒的核酸,从而对呼吸道病毒进行鉴定[1]。病毒核酸检测因其具有操作简便、灵敏度高、特异性强等优点,现已广泛应用于呼吸道病毒病原体鉴定[2]。然而由于 PCR 扩增灵敏度极高,病毒核酸检测的试剂、耗材和环境可能受到病毒核酸污染而使病毒核酸检测出现假阳性结果。本文主要探讨因核酸污染导致呼吸道病毒核酸检测假阳性的鉴定方法与防范措施。

2. 核酸污染及其引起的呼吸道病毒核酸检测假阳性

从事呼吸道病毒核酸检测的医疗工作者由于频繁使用、接触含有病毒核酸序列的阳性对照质粒、质粒型或假病毒型质控品，其口咽和鼻咽面临病毒核酸污染的高风险，因而这类人群在采集口咽拭子或鼻咽拭子进行呼吸道病毒核酸检测时容易出现假阳性[3]。医疗机构和核酸检测专业机构通常都有规范化的制度和操作流程来杜绝、减少和应对核酸污染事件的发生。在采集医疗工作者的口咽拭子或鼻咽拭子进行呼吸道病毒核酸检测时，通常也会因为职业因素考虑核酸污染导致假阳性的可能性并进行分析与排除。

目前很多科研工作者在病毒性呼吸道感染疾病的病理机制和抗病毒药物研发等领域从事基础和临床研究，这些科研工作者也频繁使用、接触含有病毒核酸序列的表达质粒。不同于核酸检测的医疗工作者使用的对照质粒或质控品均含有核酸检测的靶点序列，科研工作者只有当使用表达质粒含有的序列与核酸检测靶点序列一致时，核酸污染以及核酸检测假阳性的风险才会陡增。虽然同样面临病毒核酸污染风险，但科研工作者在病毒核酸污染致使核酸检测假阳性事件上的意识和防范措施上都相对薄弱。在采集他们的口咽拭子或鼻咽拭子进行呼吸道病毒核酸检测时同样可能会出现核酸污染导致的假阳性，但这种情况却容易被他们自身以及负责对他们进行核酸检测的医疗工作者忽视。接下来我们将以新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)为例，探讨核酸污染导致核酸检测假阳性的发生条件、鉴定方法、防范和后续处理措施。

3. SARS-CoV-2 核酸污染导致的核酸检测假阳性

新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)疫情自 2019 年底爆发。疫情爆发之后，SARS-CoV-2 成为各高校实验室和科研机构的重点研究对象，一些科研工作者也因此频繁使用或接触了含有核酸检测靶点序列的质粒。迄今为止，全国各地发生了多起因实验室 SARS-CoV-2 核酸污染造成的核酸检测假阳性事件，并一度造成了学生过度紧张以及地区恐慌[4] [5] [6] [7] [8]。作为鉴别 SARS-CoV-2 感染的主要手段，PCR 技术发挥着不可或缺的作用。SARS-CoV-2 核酸检测通过设计特异性引物与 SARS-CoV-2 RNA 反转录获得的 cDNA 配对，经历高温变性、低温退火和引物延伸的多次循环将靶点序列大量扩增，并利用扩增曲线计算病毒核酸初始浓度来判断是否感染 SARS-CoV-2。PCR 具有极高的检测灵敏度，这既是核酸检测作为病原体鉴定主要手段的优势，也是因核酸污染造成假阳性结果的重要因素之一。

3.1. SARS-CoV-2 基因组结构

新型冠状病毒与严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)具有相似分类学特征，国际病毒分类委员会将其命名为 SARS-CoV-2 [9] [10]。SARS-CoV-2 是一种具有包膜的单股正链 RNA 病毒，基因组序列约 30,000 个核苷酸，基因组编码 4 个结构蛋白和 11 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。4 个结构蛋白分别是：主要功能为识别宿主细胞受体的刺突糖蛋白(spike protein, S)、具有非选择性阳离子通道功能的包膜蛋白(envelope protein, E)、负责将病毒基因组 RNA 组装成核衣壳的核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N)以及负责将核衣壳进一步组装成病毒体的膜蛋白(membrane protein, M) [11] [12] [13] [14]。开放阅读框执行重要的病毒复制功能，包括 ORF1a 和 ORF1b 这两个大分子量的病毒多聚蛋白。ORF1a 和 ORF1b 由 16 种非结构蛋白(non-structural protein, NSP)组成，如 3C 样蛋白酶(3C-like protease, 3CLpro, 又称 NSP5)和解旋酶(helicase, Hel1, 又称 NSP13)以及 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp, 又称 NSP12)。除此之外, NSP3、NSP9、NSP10、NSP15 和 NSP16 等非结构蛋白也在病毒复制中发挥关键作用(见图 1)。

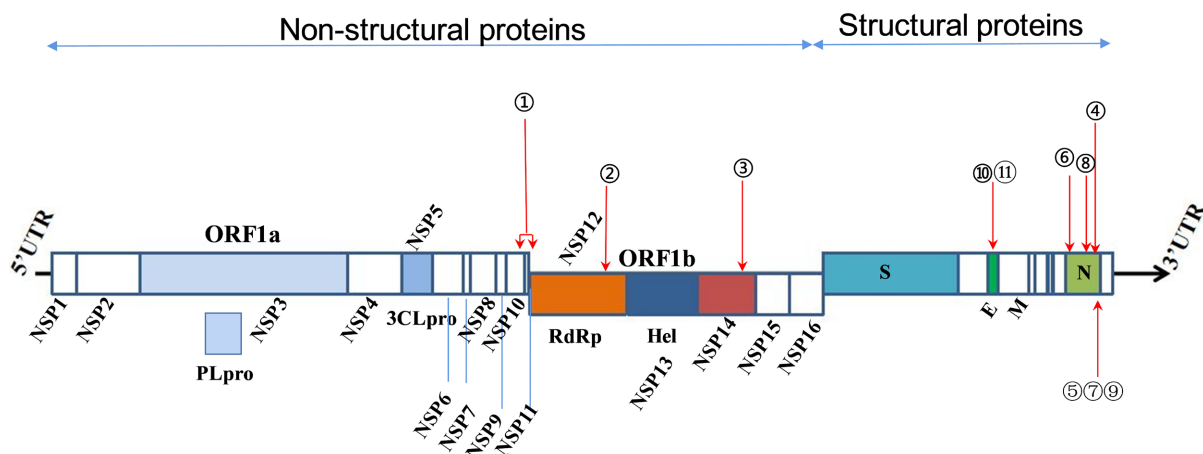


Figure 1. The genome structure of SARS-CoV-2. ①~⑪ in figure denote the position of primers used for SARS-CoV-2 nucleic acid tests in different countries and regions in Table 1

图 1. SARS-CoV-2 基因组结构图。图中①~⑪分别为表 1 中各个国家与地区使用的 SARS-CoV-2 核酸检测引物的位置

Table 1. Primers used for SARS-CoV-2 nucleic acid tests in different countries and regions

表 1. 不同国家与地区的 SARS-CoV-2 核酸检测引物

扩增基因	国家/地区/机构	引物序号	引物序列	基因组区域	
ORF1ab (1-21290)	中国	①	F 5'-CCCTGTGGGTTTTACACTTAA-3'	13342-13362 (NSP10)	
			R 5'-TCAGCTGATGCACAATCGT-3'	13442-13460 (RdRp)	
	WHO	②	F 5'-GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG-3'	15431-15452 (RdRp)	
			R 5'-TATGCTAATAGTGTTTTTAACATTTG-3'	15505-15530 (RdRp)	
	中国香港	③	F 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACT-3'	18778-18797 (NSP14)	
			R 5'-AACRCGCTTAAACAAAGCACTC-3'	18889-18909 (NSP14)	
	中国	④	F 5'-GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAT-3'	28881-28902	
			R 5'-CAGCTTGAGAGCAAAATGTCTG-3'	28958-28979	
	中国香港	⑤	F 5'-TAATCAGACAAGGAACTGATTA-3'	29145-29166	
			R 5'-CGAAGGTGTGACTTCCATG-3'	29236-29254	
N (28274-29533)		⑥	F 5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3'	28287-28306	
			R 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3'	28335-28358	
	美国	⑦	F 5'-TTACAAACATTGGCCGCAAA-3'	29164-29183	
			R 5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3'	29213-29230	
		日本	⑧	F 5'-GGGAGCCTTGAATACACCAAAA-3'	28681-28702
				R 5'-TGTAGCACGATTGCAGCATTG-3'	28732-28752
	WHO	⑨	F 5'-AAATTTGGGGACCAGGAAC-3'	29125-29144	
			R 5'-TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC-3'	29280-29299	
E (26245-26472)	WHO	⑩	F 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'	26269-26294	
			R 5'-TGTGTGCGTACTGCTGCAATAT-3'	26360-26381	
	德国	⑪	F 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'	26269-26294	
			R 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'	26360-26381	

3.2. SARS-CoV-2 核酸检测引物

SARS-CoV-2 核酸检测的引物需要避免与其它冠状病毒产生交叉反应, 并尽可能覆盖 SARS-CoV-2 各种突变株。不同国家与地区的 SARS-CoV-2 核酸检测采用了不同的引物, 这些引物的扩增序列集中于 N、E 以及 ORF1ab 中的 RdRp 基因[15] [16] [17]。各个国家和地区疾控中心和世界卫生组织(world health organization, WHO)公开的 PCR 引物见表 1, 可见通常使用了靶向不同基因的两对及以上引物进行 SARS-CoV-2 核酸检测[18] [19]。我国疾控中心推荐使用 2 对引物, 第一对引物横跨 NSP10 和 RdRp 基因, 第二对引物位于 N 基因。由于高校实验室和科研机构通常使用单个基因的表达质粒, 使用同时含有第一对引物扩增的 NSP10 和 RdRp 的表达质粒概率较低。我国较多实验室研究 SARS-CoV-2 N 蛋白, 由于 N 蛋白表达质粒含有第二对引物的完整扩增序列, 这些实验室一旦发生 N 蛋白表达质粒的环境污染和人员污染, 实验室相关人员的核酸检测就有可能出现假阳性结果。事实上国内多起核酸污染导致的 SARS-CoV-2 核酸检测假阳性事件, 均与 N 蛋白表达质粒使用过程中的核酸污染相关。另一方面, 如果高校实验室和科研机构使用 SARS-CoV-2 N 蛋白以外的表达质粒(如 S 蛋白), 由于与核酸检测靶点无交叉, 理论上使用过程中核酸污染也不会造成核酸检测假阳性。

4. 科研工作者 SARS-CoV-2 核酸检测假阳性的鉴定

4.1. 使用两对及以上 PCR 引物

国内各厂商生产的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒使用了多对引物, 包括但不限于我国疾控中心推荐的 2 对引物(表 1)。使用两对及以上针对不同靶点的特异性引物进行 PCR, 可以将核酸污染导致假阳性的概率维持在较低水平[20] [21] [22]。造成高校实验室和科研机构核酸污染的表达质粒通常只含有 SARS-CoV-2 的某一个基因(如 N 基因), 使用含该基因序列的引物(如位于 N 基因)扩增时会出现假阳性, 而使用该基因序列以外的引物(如位于 ORF1ab 或 E 基因)扩增时会出现阴性。因此, 使用具有两个特异性靶点的核酸检测试剂盒会出现三种结果: 真病毒感染导致的双阳性、未感染出现的双阴性以及核酸污染导致的一阴性一阳性[23]。而如果使用两对以上 PCR 引物, 核酸污染将出现多阴性一阳性的结果, 从而可以将核酸污染导致的核酸检测假阳性排除于真病毒感染[24]。

4.2. PCR 前对样品进行预处理

SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒的原理是逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)。RT-PCR 技术能够检测提供的样本中是否存在特异性核酸片段, 但由于逆转录这一步骤的存在, 无法区分检测样本的核酸类型是 DNA 还是 RNA, 从而忽略了这可能是鉴别高校实验室与科研机构 SARS-CoV-2 核酸污染导致的假阳性的条件之一[25]。高校实验室和科研机构在研究 SARS-CoV-2 时, 通常将 SARS-CoV-2 的基因构建成 DNA 质粒, 这在性质上与真正的 SARS-CoV-2 这一 RNA 病毒有着显著区别。利用这一性质, 可以通过 PCR 前加入 DNase 或去除逆转录步骤将两者区分开来[26] [27] [28]。第一种预处理方法是在 RT-PCR 开始前先使用 DNase 处理去除 DNA 质粒, 如果 PCR 结果转为阴性或 CT 值波动较大, 样本为 DNA 质粒污染, 而真病毒感染的 PCR 结果无显著变化。第二种预处理方法是去除逆转录步骤, 如果 PCR 结果转为阴性或 CT 值波动较大, 样本为 RNA 真病毒, 而 DNA 质粒污染的结果无显著变化。

4.3. 结合抗原检测

真病毒感染的样品除了能检测到病毒核酸, 还能检测到病毒的抗原, 而核酸污染的样品仅在核酸检测时会出现假阳性。因此, 除了以上两种方法, 还可以通过核酸检测结合抗原检测, 将核酸污染导致的

核酸检测假阳性排除于真病毒感染。

5. 科研机构 SARS-CoV-2 核酸污染的防范措施

5.1. 环境核酸污染的防范

高校实验室和科研机构既然使用 SARS-CoV-2 核酸片段作为研究材料,就需要为预防病毒核酸污染建立一套行之有效的办法,包括室内质控、性能验证和快速检测三个方面[29]。第一,室内质控方面,一是需要加强实验室环境管理,包括 SARS-CoV-2 质粒存放管理和口鼻防范用具管理,二是需要建立合理、科学的标准作业程序(standard operation procedure, SOP)来规范化操作流程,根据核酸检测试剂盒的检出上限设计假病毒颗粒的弱阳性质控品是监测扩增曲线的有效手段[30]。第二,性能验证则是按照预期效果调试仪器性能,针对研究用 SARS-CoV-2 基因表达质粒设计不同对照组探索最适合实验室的核酸检测条件,包括特异性引物和反应体系等。第三,快速检测要求实验室具备有效室内采样、PCR 快速扩增并鉴定的能力[29]。选择病毒质粒存放点和 PCR 仪等潜在病毒核酸污染区域进行空气沉降法和表面擦拭法取样,空气沉降法通常使用生理盐水在稳定空间内静置 1 小时后进行核酸检测,而表面擦拭法则使用沾有生理盐水的棉拭子擦拭取样,再浸泡在生理盐水中 0.5 小时进行核酸检测[21] [31]。综上,通过加强高校实验室和科研机构的环境管理、规范化操作流程和日常环境样本监测,能够显著降低病毒核酸污染的概率,从而达到防范环境核酸污染的预期目的。

5.2. 科研工作者口咽和鼻咽核酸污染的防范

SARS-CoV-2 作为传染性极强的病毒,在风险评估中任何形式的污染造成的危害,实验人员都是首当其冲。因此,个人防护显得尤为重要。工作前防护要求包括进入实验室使用病毒质粒前,务必穿实验服、戴一次性手套和一次性口罩等。工作后防护要求包括实验结束后,将一次性手套集中收集,然后用 75%酒精(或等效消毒液)喷洒实验服消毒,污染面切勿接触内部衣物。工作人员离开实验室前必须洗手,并勤漱口、勤洗澡,避免由外部污染进入口咽和鼻咽造成病毒核酸污染。特别需要注意的是,严格禁止穿戴防护装备离开实验室[32]。

6. SARS-CoV-2 核酸污染的后续处理

高校实验室和科研机构一旦出现 SARS-CoV-2 病毒核酸污染及其引起的病毒核酸检测假阳性,应该尽快采取有效的清除办法来防止病毒核酸对环境的持续污染。75%酒精作为常用的杀菌消毒剂,也可以用来清除 SARS-CoV-2 核酸污染,但其相对较高的价格和易挥发性使其并不适用于较大的空间。次氯酸钠溶液价格低廉且易配制,即使在短反应时间内也能高效地进行核酸净化[33] [34],可以同核酸清除剂配合使用。推荐清除步骤如下:1) 喷洒核酸清除剂,30 分钟后擦干;2) 喷洒 1~2 g/L 浓度的次氯酸钠溶液,30 分钟后擦干;3) 使用清水擦拭干净。以上清除步骤每天操作 1~2 次,并持续 2 周左右。在此期间,使用空气沉降法和表面擦拭法这两种取样方法分别对气溶胶和核酸吸附的固体表面采集样本进行 PCR 扩增,直到低于预设的弱阳性质控品的 CT 值,即提示核酸污染已清除。

7. 总结与展望

2019 年以来 COVID-19 疫情的爆发引发了全球公共卫生危机。基于 PCR 的核酸检测,作为 SARS-CoV-2 病毒病原体鉴定的金标准,在疫情防控中发挥了重要作用。各国疾控中心和 WHO 针对 SARS-CoV-2 不同保守区域(包括 ORF1ab、N 和 E 等)设计两对及以上的特异性引物,以进一步提高 PCR 鉴定的准确性。但 PCR 的高灵敏性也容易造成科研工作者因 SARS-CoV-2 核酸污染导致的假阳性结果,并且只有使

用的 DNA 质粒含有核酸检测靶点序列时, 这种情况才可能发生。这类含有病毒核酸序列的 DNA 质粒并不具有感染活性, 但其污染造成的假阳性结果可能会引起被检测人员和社会恐慌以及不必要的资源浪费。本文总结了三种方法来鉴定高校实验室和科研机构核酸污染造成的核酸检测假阳性: 使用多对引物、样品预处理和结合抗原检测。为避免类似的事情再次发生, 从事 SARS-CoV-2 病毒研究的高校实验室与科研机构需要建立严格的实验室管理制度并定时定点地监测实验室环境。

除了 SARS-CoV-2, 病毒性呼吸道感染疾病的病原体大多为 RNA 病毒, 包括鼻病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒和冠状病毒等。以上虽然讨论的仅是 SARS-CoV-2 的病毒个案, 但文中提到的核酸污染导致核酸检测假阳性的发生条件、鉴定方法、防范和后续处理措施同样适用于其他呼吸道病毒。需要注意的是, 在考虑其他病毒核酸检测假阳性可能时, 首要任务应当是判定科研机构使用的 DNA 质粒是否含有核酸检测的靶点序列。我们希望通过本文能引起对高校实验室与科研机构的呼吸道病毒核酸污染导致核酸检测假阳性事件的重视, 从而减少该类事件的发生, 并助力病毒性呼吸道感染疾病的精准诊疗。

基金项目

金华市科技局重点项目(2020XG-09, 2021-3-146)。

参考文献

- [1] 李佩琼. 快速核酸检测常见呼吸道 RNA 病毒方法的建立及临床应用研究[D]: [博士学位论文]. 广州: 中山大学, 2008.
- [2] Colagrossi, L., Mattana, G., Piccioni, L., Cento, V. and Perno, C.F. (2021) Viral Respiratory Infections: New Tools for a Rapid Diagnosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **42**, 747-758. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1739306>
- [3] Beck, I.A., Styrchak, S., Miller, L., et al. (2022) Persistent Nonviral Plasmid Vector in Nasal Tissues Causes False-Positive SARS-CoV-2 Diagnostic Nucleic Acid Tests. *Microbiology Spectrum*, **10**, e0169522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01695-22>
- [4] 陈纯, 董航, 李科, 等. 广州市 8 起新冠病毒核酸检测假阳性事件原因分析[J]. 国际病毒学杂志, 2022, 29(5): 416-419.
- [5] 贾兴旺. 临床实验室新冠核酸检测质量保证及检测能力提升方案[J]. 标记免疫分析与临床, 2022, 29(5): 721-725.
- [6] 张礼堃, 邹秉杰. PCR 技术在新冠病毒核酸检测中的应用[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(5): 539-544.
- [7] 侯盼飞, 潘艳, 祝丽晶, 陈小颖. 新冠病毒核酸检测中假阳性问题分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2021, 44(5): 373-374.
- [8] Rahbari, R., Moradi, N. and Abdi, M. (2021) rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical Considerations. *Clinica Chimica Acta*, **516**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.011>
- [9] Roberts, A., Chouhan, R.S., Shahdeo, D., et al. (2021) A Recent Update on Advanced Molecular Diagnostic Techniques for COVID-19 Pandemic: An Overview. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article 732756. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732756>
- [10] Hu, B., Guo, H., Zhou, P. and Shi, Z.-L. (2021) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- [11] 刁艳君, 杨柳, 苏明权, 等. SARS-CoV-2 实验室核酸检测要点[J]. 检验医学, 2021, 36(3): 352-356.
- [12] Pérez-López, B. and Mir, M. (2021) Commercialized Diagnostic Technologies to Combat SARS-CoV2: Advantages and Disadvantages. *Talanta*, **225**, Article ID: 121898. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121898>
- [13] Parikh, B.A. and Farnsworth, C.W. (2021) Laboratory Evaluation of SARS-CoV-2 in the COVID-19 Pandemic. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, **35**, Article ID: 101660. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2021.101660>
- [14] Yoshimoto, F.K. (2020) The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *The Protein Journal*, **39**, 198-216. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>
- [15] Li, D., Zhang, J. and Li, J. (2020) Primer Design for Quantitative Real-Time PCR for the Emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics*, **10**, 7150-7162. <https://doi.org/10.7150/thno.47649>
- [16] Guan, W.-D., Chen, L.-P., Ye, F., Ye, D., Wu, S.-G., Zhou, H.-X., He, J.-Y., Yang, C.-G., Zeng, Z.-Q., Wang, Y.-T.,

- Li, R.-F., Du, Q.-L., Liang, X.-L., Ma, Q.-H. and Yang, Z.-F. (2020) High-Throughput Sequencing for Confirmation of Suspected 2019-nCoV Infection Identified by Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Chinese Medical Journal*, **133**, 1385-1386. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000792>
- [17] Zhou, Y., Zhang, L., Xie, Y.-H. and Wu, J. (2022) Advancements in Detection of SARS-CoV-2 Infection for Confronting COVID-19 Pandemics. *Laboratory Investigation*, **102**, 4-13. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00663-w>
- [18] Shi, J., Han, D., Zhang, R., Li, J. and Zhang, R. (2020) Molecular and Serological Assays for SARS-CoV-2: Insights from Genome and Clinical Characteristics. *Clinical Chemistry*, **66**, 1030-1046. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa122>
- [19] Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Dobnik, D., Neužil, P., Amoth, P., Mwau, M., Yu, J., Yang, H. and Wei, H. (2022) Digital PCR Applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 Era: A Roadmap for Future Outbreaks. *Clinical Microbiology Reviews*, **35**, e0016821. <https://doi.org/10.1128/cmr.00168-21>
- [20] Liu, X., Feng, J., Zhang, Q., Guo, D., Zhang, L., Suo, T., Hu, W., Guo, M., Wang, X., Huang, Z., Xiong, Y., Chen, G., Chen, Y. and Lan, K. (2020) Analytical Comparisons of SARS-CoV-2 Detection by qRT-PCR and ddPCR with Multiple Primer/Probe Sets. *Emerging Microbes & Infections*, **9**, 1175-1179. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1772679>
- [21] 刘方遥, 于芳, 张恒, 等. 北京市海淀区新型冠状病毒核酸检测实验室污染情况调查与处理[J]. 国际病毒学杂志, 2021, 28(3): 257-260.
- [22] 段植, 王琴, 张浩, 周强. 新冠病毒核酸检测实验室核酸污染监测及排除[J]. 中国血液流变学杂志, 2021, 31(4): 553-557.
- [23] Banko, A., Petrovic, G., Miljanovic, D., et al. (2021) Comparison and Sensitivity Evaluation of Three Different Commercial Real-Time Quantitative PCR Kits for SARS-CoV-2 Detection. *Viruses*, **13**, Article No. 1321. <https://doi.org/10.3390/v13071321>
- [24] 方莉, 刘芷洁, 赵维蛟, 许媛. 3种实时荧光PCR试剂在结核分枝杆菌核酸检测中的临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2014(8): 977-978
- [25] Lippi, G., Simundic, A.-M. and Plebani, M. (2020) Potential Preanalytical and Analytical Vulnerabilities in the Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **58**, 1070-1076. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285>
- [26] 李夫, 张代涛, 贾蕾, 等. 环境样本新型冠状病毒核酸检测阳性结果评估及处置建议[J]. 国际病毒学杂志, 2021, 28(3): 177-181.
- [27] 王爽, 潘阳, 徐新民, 等. 新型冠状病毒核酸PCR检测假阳性核酸污染类型的鉴别方法[J]. 首都医科大学学报, 2022, 43(3): 427-432.
- [28] 王秋, 黄韵, 姜航, 等. CLSI EP23-A在新型冠状病毒核酸检测实验室风险管理中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(21): 2680-2684.
- [29] 陈倩, 单志明, 宋超, 等. 浙江地区新建新型冠状病毒核酸检测实验室质量现状分析[J]. 检验医学, 2022, 37(7): 669-673.
- [30] 薛秀荣, 来祝標, 韩惠云. 浅谈核酸检测实验室防污染措施[J]. 中国卫生产业, 2018, 15(26): 144-145.
- [31] 姚娜, 潘彤, 赵倩, 等. PCR实验室污染原因分析与排除方法[J]. 继续医学教育, 2019, 33(2): 142-143.
- [32] 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]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3): 209-212.
- [33] 李云龙, 张健, 魏艳, 等. 分子诊断实验室去除核酸污染的方法学研究[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 673-679.
- [34] Fischer, M., Renevey, N., Thür, B., Hoffmann, D., Beer, M. and Hoffmann, B. (2016) Efficacy Assessment of Nucleic Acid Decontamination Reagents Used in Molecular Diagnostic Laboratories. *PLOS ONE*, **11**, e0159274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159274>