

数字聚合酶链反应 (dPCR) 技术在病原体基因检测应用中的研究进展

唐月明, 伊洁 (中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要: 实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 的准确度和精密度容易受到很多因素的影响, 数字聚合酶链反应 (dPCR) 作为一种新的分子定量技术, 以其更高的敏感度、精密度、独立于标准曲线及更高的抗干扰能力等优点, 近年来在病原体基因检测中逐渐兴起。该文将 dPCR 技术的特点、优势、不足及在病原体检测中的应用进行综述。

关键词: 数字聚合酶链反应; 病原体; 绝对定量

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 05-174-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.038

Recent Advances in Research on Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Pathogen Gene Detection

TANG Yue-ming, YI Jie (Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China)

Abstract: The accuracy and precision of real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) are susceptible to many factors. Digital polymerase chain reaction (dPCR), as a new molecular quantitative technique, has emerged in pathogen gene detection in recent years with advantages of higher sensitivity, precision, independence from standard curves and higher anti-interference ability. This article reviews the characteristics, progress and applications of dPCR in pathogen gene detection of pathogen, and its prospect in the future.

Keywords: digital polymerase chain reaction; pathogens; absolute quantification

在许多感染性疾病中, 病原体的量化已经被证明是一项有用的预后指标和监测治疗反应的重要参考。实时荧光定量多聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 作为二代核酸检测方法, 已在实验室被广泛使用。它通过在反应体系中加入荧光标记的探针来实时检测荧光信号, 借助荧光曲线的循环阈值 (cycle threshold, C_t) 和标准曲线来定量起始靶基因的浓度, 为相对定量技术。这种方法能有效测定对数拷贝数, 动态范围宽, 但由于很多因素都会影响 qPCR 的效率, 比如在低拷贝靶分子 (如病原体本身含量低或者部分患者在检测前已使用抗生素治疗)、复杂模板背景 (如大量人基因组会干扰引物和探针的特异度反应、qPCR 抑制物存在)、扩增效率低下 (靶基因具有多态性却使用统一的探针及引物)、探针保存不当导致部分降解、标准品和标准曲线偏斜等情况下, 其 C_t 值都会受到影响, 因此 qPCR 的准确度和精密度可能会有很大的差异^[1]。除此之外, 缺乏绝对定量值来校准标准品, 导致 qPCR 结果不精密度高及各实验室之间的可比性差。所以 qPCR 作为临床常规检测技术存在不足之处, 尤其是在复杂背景下

检测低含量的靶基因时, 需要更加敏感和稳定的方法检测。数字聚合酶链反应 (digital PCR, dPCR) 作为一种新的准确定量技术, 在基因的绝对定量检测中得到广泛应用, 尤其是对微量样本的绝对定量。

现将 dPCR 技术的特点、优势及在病原微生物检测中的应用综述如下。

1 dPCR 简介

1999 年 VOGELSTEIN 等^[2]采用 96 孔板对样本进行了微升级别的 PCR 扩增, 从而提出了 dPCR 的概念。随着技术的进步, dPCR 近年来逐渐兴起, 成为一种新的分子生物学诊断技术, 其将微量样品作大倍数稀释和分液, 实现理论上的单分子扩增, 然后用终点法 PCR 和统计学中的泊松分布原理计算出样品的原始浓度^[1]。

dPCR 根据样品分散模式不同分为磁珠模式、微滴模式和芯片模式, 后两者更为常见。其中微滴模式是随着纳米制造技术和微流体技术发展起来的新模式, 也叫微滴式 dPCR (droplet digital PCR, ddPCR)。它的原理是微滴发生器将 PCR 反应混合液通过打散并制成数万个皮升级大小的油包水液滴后进行 PCR 反应, 每个微滴中会含有一个或者不

基金项目: “十三五”艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项“课题”急性呼吸道传染病病原谱和流行规律及重要病原变异特征研究 (2017ZX10103004003)。

作者简介: 唐月明 (1992-), 女, 硕士, 技师, 主要从事病原微生物检测, E-mail: mingming-10100601@163.com。

包含目标分子,每个微滴内的PCR反应在相对独立的环境里独自反应,反应完成后,通过对每个微滴进行荧光检测,含有荧光信号微滴确定为阳性,不含荧光信号微滴确定为阴性。对微滴进行计数,可以准确得出含有目标分子微滴数和不含目标分子微滴数,同时可以以一维图或二维图呈现检测结果。每微升的目标数是使用一个包含阳性微滴数、总微滴数和微滴体积的公式来计算的^[3]。随着浓度的增加,单个反应体系可能包含2和/或多个目标模板分子,这时能够通过泊松分布进行校正,从而计算出样品中靶分子浓度,实现绝对定量。芯片模式即芯片PCR(chip dPCR, cdPCR),是由物理隔离的腔室组成,在微孔中进行PCR扩增反应。因此,检测芯片扩增的荧光可以代表阳性反应和阴性反应的数量。根据样品分布方法不同进一步分为基于微孔的毛细力驱动样品分散模式、基于通道的样品分散模式、基于水凝胶珠的样品分散模式和基于喷墨的样品分散模式^[4]。

2 dPCR技术的优势

2.1 更高的敏感度和精密度 因为dPCR将样本分成若干小PCR反应分区,可实现单分子级检测,避免了模板间的竞争效应,理论上可以提高低丰度目的序列的检测敏感度,也有实验证实^[5],dPCR在测量某些病原体时具有更高的敏感度。由于dPCR较少受到扩增效率的影响,并且采用终点法定量,因此具有更高的精密度和准确性^[3,6-7]。

2.2 更高的重复性和通用性 dPCR不依赖标准品,不需要标准曲线,也不依赖荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数,直接计算样品中目的核酸分子的个数,可实现绝对定量,重复性和通用性高^[8],因此dPCR可用于给常规qPCR所需的标准品定量,具有计量学意义^[6]。

2.3 更高的抗干扰能力和稳定性 QUAN等^[9]系统比较了十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA)及肝素等常见PCR抑制物对ddPCR和qPCR的影响,结果显示,ddPCR对SDS和肝素的耐受程度高于qPCR,但是抗EDTA的表现并不突出。NIXON等^[10]人也发现cdPCR对乙醇和血浆抑制作用的敏感性较低,但是对EDTA依旧敏感。dPCR耐受能力高的可能原因包括:在ddPCR中,样品被分割成许多微小的反应区,这提高对缓蚀剂的抵抗力^[7];用于生成液滴乳液的油可能将一些抑制物质从水相PCR反应中分离出来;qPCR是依赖每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数来进行定量,dPCR是终点法而不是实时扩增进行定量,因此较

少收到样本中可能存在的抑制物的影响^[1],可以应用在复杂临床样本(血液、粪便和组织等)中的病原微生物或其他标志物的检测^[11],通用性更高。

3 dPCR技术的应用

3.1 低载量病原微生物的DNA检测 优越的精密度和敏感度使dPCR可用于低载量致病微生物的早期检测及治疗的后续监测,提供客观和量化的判断阈值。USHIO等^[12]利用dPCR成功地在肺结核患者的血浆样本中检测到结核杆菌DNA,并提出这种微创、快速和准确的循环检测结核杆菌DNA的方法有可能成为一种新的标准诊断方法,辅助结核早期确诊。关于dPCR检测人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)相关癌症患者血清中HPV DNA的研究表明,可以使用这种高灵敏度的技术进行亚临床肿瘤肿块的生物学检测,例如早期浸润癌、微小残留或早期复发的肿瘤监测^[13]。STRAIN等^[9]论证并提出dPCR的高敏感度和精密度有助于测量潜伏中的HIV病毒进而能够及时干预,达到早期消除的目的。2013年,PERSAUD等^[14]对1例感染HIV的婴儿从出生后30h至18个月时期进行联合抗反转录病毒治疗,在停止治疗后,分别在婴儿24个月和26个月的时候,使用ddPCR检测婴儿血液中HIV DNA水平,检测发现婴儿体内细胞相关的HIV-1 DNA几乎完全消失,残存片段不具备复制能力。2020年,英国学者^[15]用ddPCR等核酸检测方法对接受了异基因干细胞移植,并且中断分析治疗18个月的病人进行了HIV-DNA的检测,ddPCR被用来检测肠道活检和淋巴结组织的细胞。结果显示,该病人在各基质中均没有检测到具有复制能力的病毒,因此认为这些发现代表了HIV患者的治愈。可见,dPCR优越的检测能力在HIV治疗后监测中起到了关键作用。

关于人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, CMV)的研究发现,CMV病毒载量从200 copies/ml以下增长到200 copies/ml以上时患者会出现明显的症状^[16],能够检测CMV载量的微小变化在临床上具有明显的意义,因此dPCR在CMV的研究领域中被广泛使用。QUAN等^[9]发现qPCR比ddPCR有更高的敏感度,但是该研究中qPCR和ddPCR的初始DNA模板量不等,因此可能导致ddPCR敏感度下降。在优化试验后发现,ddPCR在敏感度相同的情况下,批间精密度和批内精密度都更高,这种优势有利于体内CMV的持续检测^[17]。在其他基质中,也有研究者用dPCR对CMV进行绝对定量:CAO等^[5]用dPCR技术对60例青光眼睫状体炎综合征患者的房水进行检测,发现27例CMV阳性,而qPCR法仅发现20例阳性,二代测序验证结果

与 dPCR 检测结果完全一致,其证明 dPCR 的高灵敏度更适合用于房水样本中微量病毒的检测,可以避免重复的有创操作。dPCR 是近年来在寄生虫学中应用的一项强有力的技术,在恶性疟原虫和日本血吸虫中显示出明显优于 qPCR 的优势,在无症状和低密度感染中,dPCR 可能成为检测寄生虫血症的首选方法^[18]。

理想的精密度使得 dPCR 可用于测量高拷贝数和低拷贝数目标基因的扩增比率。人类疱疹病毒 6 型 (human herpesvirus 6, HHV-6) 能够潜伏感染大多数成人。在大约 1% 的人群中,HHV-6 能够整合在人类染色体上 (chromosomally integrated human herpesvirus 6, ciHHV-6), 并通过生殖系统传播。在检测活动性 HHV-6 感染时,遗传了 ciHHV-6 的患者经常被误诊产生不必要的治疗和副作用。SEDLAK 等^[19]运用 dPCR 通过精确测定 HHV-6 和人 DNA 的比率来快速准确地鉴定 ciHHV-6 的方法。遗传了 ciHHV-6 的个体 HHV-6/人细胞比例为 1:1。在造血细胞移植的背景下对这些人进行识别有助于解释 HHV-6 检测的阳性结果,并可能避免使用抗病毒药物进行不必要的治疗。该团队还在随后的研究中建立了新的 dPCR 方法能够识别是哪一种亚类 -HHV-6A 或者 HHV-6B。

3.2 低载量病原微生物的 RNA 检测 dPCR 也被用于 RNA 的定量检测。乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) RNA 是一种反映共价封闭环状 DNA 活性的新标记。然而,检测 HBV RNA 的方法一直是一个技术挑战。LIMOTHAI 等^[20]人比较了逆转录 ddPCR (reverse transcriptase droplet digital PCR, RT-ddPCR) 和逆转录 qPCR (reverse transcriptase quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 对不同治疗阶段的慢性乙肝患者血清的 HBV RNA 检测,结果显示 RT-ddPCR 在所有浓度的 RNA 定量一致性方面均优于 RT-qPCR,可以提高血清 RNA 的检测敏感度,成为 HBV RNA 定量的最佳方法。dPCR 也被用于检测细菌核糖体 RNA,结合测序技术,对危重病人肺微生物群进行定量和表征,辅助分析危重病人预后与入院时肺微生物群特征的关系^[21]。在 2020 年造成全国紧急公共卫生事件的新型冠状病毒-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Sars-Cov-2) 的检测中,ddPCR 展现出其在低载量病毒检测中的优越性。LIU 等^[22]人建立了 ddPCR 的临界值,为 40 copies/ml,显著低于目前常用 qPCR 的检测下限 (1 000, 500 copies/ml 等)。同时实验证明,ddPCR 对确诊病人的拭子检出阳性率高于 qPCR^[23],在 qPCR 阴性的出院患者样本中仍检测出了 Sars-Cov-2 的存在^[22, 24],表明 ddPCR 有助

于减少假阴性结果的发生,降低了病毒传播的潜在风险。此外,ddPCR 可以报告病毒载量的具体数值,可用于动态监测患者的 SARS-CoV-2 病毒载量,利于病毒载量与预后关系的研究。

3.3 基因多态性的检测 dPCR 不仅可以对低载量病毒绝对定量,还可在 200 000 个野生型病毒中定性检测出变异病毒,检测限达 0.005%,而 qPCR 和焦磷酸测序法只能检测高于 10% 的突变基因^[25]。由于基因组的高度多样性,引物或探针的不匹配可能会降低扩增或探针水解的效率,在这种情况下,qPCR 可能大大低估了真实的模板拷贝数,利用病原体 DNA 序列数据定制患者特异性引物和探针可以解决此问题,但是该方法繁琐,可行性差。dPCR 由于不依赖于扩增效率,而扩增效率会受到引物或探针结合区序列失配的影响,因此,dPCR 比 qPCR 具有更高的准确性,可用于基因组多态性的突变检测,包括稀有突变、单碱基突变及拷贝数的变异。已报道的利用 dPCR 技术定性检测序列多样性高的病原体包括结核杆菌^[12]、BK 病毒 (BK virus, BKV)^[26]、JC 病毒 (JC virus, JCV)^[27] 等。在此基础上利用 dPCR 检测变异的耐药菌株,对用药的疗程管理和疗效预测有十分重要的意义。利用 dPCR 已成功区分对甲氧西林耐受或者敏感的金黄色葡萄球菌^[28]。ABRAM 等^[29]人证明 dPCR 技术可以直接从全血中识别携带特定耐药基因的病原体并且具有 100% 的敏感度和特异度。

3.4 标准品绝对定量值的建立 美国国家标准与技术研究所采用 dPCR 对 CMV 进行了绝对拷贝数的测量,这也是第一次采用 dPCR 建立标准,并根据精确确定的已知扩增 DNA 分子数来进行不同实验室的方法校准验证和质量控制^[30]。此后 dPCR 陆续被用于 CMV 的 qPCR 标准品的定值^[31]。dPCR 在对 WHO 国际标准物质的拷贝数异质性鉴定中也起到了一定作用。例如,由于 T 抗原等区域的大范围不同缺失,导致多瘤病毒基因组不同位点之间拷贝数显著差异,会导致定量结果显著不同,利用 dPCR 对 WHO 关于 BKV 和 JCV 的国际标准进行测定发现定量结果可相差 8 倍,这一发现经下一代测序证实是由于该国际标准中存在多个病毒亚群^[26-27]。

3.5 不同基质中病原微生物的检测 dPCR 具有比 qPCR 更高的抗干扰能力和稳定性,对不同基质的抑制作用更强,在粪便组织检测幽门螺杆菌^[32]、石蜡包埋组织检测 HBV^[11]中表现出优越的灵敏度和特异度,在鼻咽拭子、痰液、尿液、精液等其他基质中也有应用^[5, 23, 33-34],便于研究者对致病微生物进行研究,能够帮助病人获得早期诊断。

3.6 其他新兴应用

3.6.1 多重 dPCR 检测: ddPCR 实现了 CMV, 人腺病毒 (human adenovirus, ADV) 的多重 DNA 检测, 并对粪便中两种病毒进行了分析, 灵敏度均高于同时进行检测的 qPCR, 保证了易受抑制的临床标本的准确测定, 防止了假阴性^[11]。

3.6.2 为高通量测序技术提供灵敏校准: DING 等^[35]使用 dPCR 精确定量测序模板, 使测序文库在没有预扩增的前提下对样品需求体积减少了 1 000 倍以上至皮克级, 同时消除了构建标准曲线带来的不确定性, 最大限度的减少了偏倚, 成功地对低于纳克级的细菌和哺乳动物的 DNA 样品进行了测序。EASTBURN 等^[36]人引入了微流控液滴富集技术, 将 5 个不同基因组位点的靶基因富集了 31.6 倍, 应用 dPCR 技术实现了测序文库的绝对定量, 且大大降低了样本用量、测序成本和时间。将下一代测序方法与 dPCR 联合使用可被视为未来病毒学领域应用的发展趋势, 能够更全面识别目标基因座内的遗传多态性。

3.6.3 免除核酸提取, 减少工作流程: PAVSIC 等^[31]分别用两个不同的 dPCR 平台 (Bio-Rad 和 Biomark) 分别对病毒 DNA 进行免提取及提取后 dPCR 定量分析, 结果表明两种平台的免提取方法测得浓度与实际病毒载量更接近。这是第一份免 DNA 提取进行 dPCR 直接定量的研究。免 DNA 提取进行病原微生物定量将大大减少工作流程, 提高工作效率, 节省临床周转时间, 但是仍然需要对其其他病毒、参考物质和临床相关基质进行验证。在此基础上, ddPCR 也被用于直接从全血样本中进行细菌鉴定和抗生素敏感性分析, 为血液感染和抗生素耐药早期指导和适当治疗提供快速诊断^[29]。

3.6.4 与多种扩增技术整合: 将数字技术同其他扩增技术整合的模式比如数字环介导等温扩增技术 (digital loop-mediated isothermal amplification, dLAMP) 和数字重组酶聚合酶扩增技术 (digital recombinase polymerase amplification, dRPA) 也有报道。dLAMP 易于组装和操作的特点, 可以在没有预处理设备、辅助仪器或控制系统的情况下形成坚固的液滴。研究者利用 dLAMP 定量 HPV^[37], 发现虽然敏感度低于 dPCR, 但其定量性能及抗抑制剂性能均优于 qLAMP, 后者无法对 1 000 copies/ml 以下的核酸进行定量^[10]。而 GORGANNEZHAD 等^[38]人描述的一种微流控 dRPA SlipChip 是利用 RPA 替代 dPCR 所需要的温度循环, 通过在每个反应室中添加一个化学引发剂, 只需简单的滑动步骤, 即可同时引发 1 000 多个纳升规模的 RPA 反应。经过验证, 该模式与相同 SlipChip 基础上的 dPCR 性能

相当。

4 小结与展望

ddPCR 虽具有更高的敏感度、重复性和稳定性, 也已在相应领域获得了应用, 但是该技术在未来能否广泛应用仍具有许多挑战。

4.1 通量低 qPCR 可同时检测 96 个样本甚至更多, 但是 ddPCR 的每张芯片上最多分析 48 个样品, ddPCR 则更少, 因此应增加检测通量, 以降低临床周转时间。

4.2 灵敏度需提高 增加单样本反应分区数和荧光通道数量或改进荧光编码的方法, 可以进一步提升检测灵敏度甚至同时检测多种靶标。

4.3 检测范围受限 由于 dPCR 需要单分子级检测, 在不同浓度下需要不同的稀释方法, 尤其是高浓度下增加稀释分区以确保仪器不饱和。

4.4 RNA 定量易受影响 虽然 dPCR 被广为应用于核酸的检测, 其在 RNA 定量检测领域仍是需要不断发展的, 目前看仍然是依赖于转录效率和检测效率的。在进行 RNA 定量时, 由于逆转录酶和引物等因素影响, 导致逆转录过程不完整, 使得 cDNA 与原始 RNA 拷贝数目不一致; 或者由于分子丢失效应, 比如在反应孔中同时添加逆转录反应体系和 cDNA 扩增体系, 扩增体系受到抑制, 导致不是所有模板都被扩增, 因此对 RNA 定量不准确。

4.5 价格昂贵 dPCR 未来应降低成本以解决因实验成本昂贵而无法普及的现状。

4.6 不同厂家间结果互通性仍需提高 虽然 dPCR 是绝对定量, 但是不同厂家使用的不同试剂和平台检测结果仍然不一致, 已有研究者采用三套 PCR 试剂和两个 dPCR 平台进行 CMV DNA 的检测, 发现结果存在差异^[39], 对检测到的假阳性信号, 值得进一步研究。

综上所述, 虽然 dPCR 技术在达到普遍应用的道路上仍然存在许多不足与挑战, 但是其不需要标准曲线, 以绝对定量的优势, 对低拷贝核酸, 尤其是缺乏标准品的病原体的检测和定量提供了一种新的发展方向, dPCR 技术的进一步发展也会更利于病原体的诊断、治疗及耐药分析监测等。但其检测结果特别是极低检测下限在临床中的实际应用价值尚需进一步通过更多的研究证明。

参考文献:

- [1] KUYPERS J, JEROME K R. Applications of digital PCR for clinical microbiology[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(6): 1621-1628.
- [2] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [3] VYNCK M, TRYPSTEEN W, THAS O, et al.

- The future of digital polymerase chain reaction in virology[J]. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2016, 20(5): 437-447.
- [4] CAO Lei, CUI Xingye, HU Jie, et al. Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 90: 459-474.
- [5] CAO Guojun, TAN Chen, ZHANG Yuyan, et al. Digital droplet polymerase chain reaction analysis of common viruses in the aqueous humour of patients with Posner-Schlossman syndrome in Chinese population[J]. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2019, 47(4): 513-520.
- [6] ZHANG Kuo, LIN Guigao, LI Jinming. Quantitative nucleic acid amplification by digital PCR for clinical viral diagnostics[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2016, 54(9): 1427-1433.
- [7] SIDSTEDT M, RÅDSTRÖM P, HEDMAN J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(9): 2009-2023.
- [8] TANG Li, SUN Yilun, BUELOW D, et al. Quantitative assessment of commutability for clinical viral load testing using a digital PCR-based reference standard[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(6): 1616-1623.
- [9] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: A technology review [J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(4):1271.
- [10] NIXON G, GARSON J A, GRANT P, et al. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(9): 4387-4394.
- [11] KOJABAD A A, FARZANEHPOUR M, GOUVARCHIN GALEH H E, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives[J]. *Journal of Medical Virology*, 2021. DOI:10.1002/jmv.26846.
- [12] USHIO R, YAMAMOTO M, NAKASHIMA K, et al. Digital PCR assay detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pulmonary tuberculosis patient plasma[J]. *Tuberculosis*, 2016, 99 : 47-53.
- [13] JEANNOT E, BECETTE V, CAMPITELLI M, et al. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma[J]. *The Journal of Pathology. Clinical Research*, 2016, 2(4): 201-209.
- [14] PERSAUD D, GAY H, ZIEMNIAK C, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 369(19): 1828-1835.
- [15] GUPTA R K, PEPPA D, HILL A L, et al. Evidence for HIV-1 cure after CCR5 Δ 32/ Δ 32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report[J]. *The Lancet HIV*, 2020, 7(5): e340-e347.
- [16] WAGGONER J, HO D Y, LIBIRAN P, et al. Clinical significance of low cytomegalovirus DNA levels in human plasma[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(7): 2378-2383.
- [17] LIMAYE A P, BABU T M, BOECKH M. Progress and challenges in the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection in transplantation[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 34(1): e00043-19.
- [18] POMARI E, PIUBELLI C, PERANDIN F, et al. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, 25(12): 1510-1516.
- [19] SEDLAK R H, HILL J A, NGUYEN T, et al. Detection of human herpesvirus 6B (HHV-6B) reactivation in hematopoietic cell transplant recipients with inherited chromosomally integrated HHV-6A by droplet digital PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(5): 1223-1227.
- [20] LIMOTHAI U, CHUAYPEN N, POOVORAWAN K, et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR vs reverse transcriptase quantitative real-time PCR for serum HBV RNA quantification[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(12): 3365-3372.
- [21] DICKSON R P, SCHULTZ M J, VAN DER POLL T, et al. Lung microbiota predict clinical outcomes in critically ill patients[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2020, 201(5): 555-563.
- [22] LIU Chong, SHI Qingxin, PENG Mingfei, et al. Evaluation of droplet digital PCR for quantification of SARS-CoV-2 virus in discharged COVID-19 patients[J]. *Aging*, 2020, 12(21): 20997-21003.
- [23] YU Fengting, YAN Liting, WANG Nan, et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2020, 71(15): 793-798.
- [24] SUO Tao, LIU Xinjin, FENG Jiangpeng, et al. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 1259-1268.
- [25] PEKIN D, SKHIRI Y, BARET J C, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(13): 2156-2166.
- [26] BATEMAN A C, GRENINGER A L, ATIENZA E E, et al. Quantification of BK virus standards by quantitative real-time PCR and droplet digital PCR is confounded by multiple virus populations in the WHO BKV international standard[J]. *Clinical Chemistry*, 2017, 63(3): 761-769.
- [27] GRENINGER A L, BATEMAN A C, ATIENZA E E, et al. Copy number heterogeneity of JC virus standards[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(3): 824-831.
- [28] LUO Jun, LI Junhua, YANG Hang, et al. Accurate detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mixtures by use of single-bacterium duplex droplet digital PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(10): 2946-2955.
- [29] ABRAM T J, CHERUKURY H, OU C Y, et al. Rapid bacterial detection and antibiotic susceptibility testing in whole blood using one-step, high throughput blood

- digital PCR[J]. Lab on a Chip, 2020, 20(3): 477-489.
- [30] HAYNES R J, KLINE M C, TOMAN B, et al. Standard reference material 2 366 for measurement of human cytomegalovirus DNA[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2013, 15(2): 177-185.
- [31] PAVŠIČ J, DEVONSHIRE A, BLEJEC A, et al. Inter-laboratory assessment of different digital PCR platforms for quantification of human cytomegalovirus DNA[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(10): 2601-2614.
- [32] TALARICO S, SAFAEIAN M, GONZALEZ P, et al. Quantitative detection and genotyping of *Helicobacter pylori* from stool using droplet digital PCR reveals variation in bacterial loads that correlates with cagA virulence gene carriage[J]. Helicobacter, 2016, 21(4): 325-333.
- [33] WU Xulong, LIN Hua, CHEN Shijie, et al. Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 248:166-171.
- [34] ROSALES-CHILAMA M, DIAZ-MORENO N, PRIETO M D, et al. Comparative assessment of DNA targets and amplification methods for leishmania (viannia) detection in human samples[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2020, 102(6): 1323-1327.
- [35] DING Yun, CHOO J, DE MELLO A J. From single-molecule detection to next-generation sequencing: microfluidic droplets for high-throughput nucleic acid analysis[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2017, 21(3): 58.
- [36] EASTBURN D J, HUANG Y, PELLEGRINO M, et al. Microfluidic droplet enrichment for targeted sequencing[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(13): e86.
- [37] YU Ziqing, LÜ Weiyuan, YU Mengchao, et al. Self-partitioning SlipChip for slip-induced droplet formation and human papillomavirus viral load quantification with digital LAMP[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 155: 112107.
- [38] GORGANNEZHAD L, STRATTON H, NGUYEN N T. Microfluidic-Based nucleic acid amplification systems in microbiology[J]. Micromachines, 2019, 10(6): 408.
- [39] HAYDEN R T, GU Z, SAM S S, et al. Comparative performance of reagents and platforms for quantitation of cytomegalovirus DNA by digital PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54(10): 2602-2608.
- 收稿日期: 2021-01-07
修回日期: 2021-04-21

(上接第137页)

- [13] 刘敏, 李承红, 刘双, 等. 诱导痰 Galectin-3BP 及相关炎症因子水平检测在中性粒细胞型哮喘诊断中的价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 56-58, 128. LIU Min, LI Chenghong, LIU Shuang, et al. Value of induced sputum Galectin-3BP and related inflammatory factors in the diagnosis of neutrophil asthma [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(6): 56-58, 128.
- [14] 刘恩照, 路利平, 刘运龄, 等. microRNA-145 通过 CD40 对泡沫细胞免疫炎症反应的影响 [J]. 天津医药, 2017, 45(12): 1233-1236. LIU Enzhao, LU Liping, LIU Yunling, et al. The effect of microRNA-145 on immune-inflammatory response of foam cells by targeting CD40 [J]. Tianjin Medical Journal, 2017, 45(12): 1233-1236.
- [15] 孙海霞, 张洪钦, 刘波泉. 支气管哮喘患者血清相关 miRNAs 的检测及其意义 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(13): 58-60. SUN Haixia, ZHANG Hongqin, LIU Boquan. Detection and clinical significance of miRNAs in serum of patients with bronchial asthma and its [J]. China Medical Herald, 2017, 14(13): 58-60.
- [16] 张晓岩, 林江涛, 王文雅, 等. 35 例重症支气管哮喘患者临床特征和气道炎症表型 [J]. 中华内科杂志, 2019, 58(9): 680-684. ZHANG Xiaoyan, LIN Jiangtao, WANG Wenya, et al. The clinical characteristics and airway inflammatory phenotypes in 35 patients with severe asthma [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2019, 58(9): 680-684.
- [17] 李美娇, 常春, 王晓华, 等. 哮喘患者 CT 小气道参数与临床及炎症指标的相关性分析 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(27): 2184-2188. LI Meijiao, CHANG Chun, WANG Xiaohua, et al. Correlation of CT small airway measurement with clinical and inflammation factors in asthma patients [J]. National Medical Journal of China, 2018, 98(27): 2184-2188.
- [18] 李毅, 熊雪, 杜永成, 等. 组蛋白去乙酰化酶 2 的表达在烟草烟雾暴露后哮喘大鼠气道 Th1/Th2 平衡中的作用研究 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46(5): 70-74. LI Yi, XIONG Xue, DU Yongcheng, et al. Role of HDAC2 on Th1/Th2 balance in asthmatic rats with cigarette smoke exposure [J]. Journal of Medical Research, 2017, 46(5): 70-74.
- [19] 徐凌云, 夏敏, 李亚琴, 等. 支气管哮喘患儿血清中的 IL-10, IL-12, IFN- γ , Eotaxin 水平检测及其临床意义 [J]. 贵州医药, 2019, 43(11): 1711-1713. XU Lingyun, XIA Min, LI Yaqin, et al. Serum levels of IL-10, IL-12, IFN- γ and eotaxin in children with bronchial asthma and their clinical significance [J]. Guizhou Medical Journal, 2019, 43(11): 1711-1713.
- [20] 蓝英, 康钰, 骆书芬. 支气管哮喘患儿外周血单核细胞 miR-138, RUNX3 表达及与 Th1/Th2 平衡的关系 [J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(12): 2192-2197. LAN Ying, KANG Yu, LUO Shufen. Expression of miR-138 and RUNX3 in peripheral blood mononuclear cells of children with bronchial asthma and their relationships with Th1/Th2 balance [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2019, 24(12): 2192-2197.
- [21] QIU Yuying, ZHANG Yingwei, QIAN Xiufen, et al. miR-371, miR-138, miR-544, miR-145, and miR-214 could modulate Th1/Th2 balance in asthma through the combinatorial regulation of Runx3 [J]. American Journal of Translational Research, 2017, 9(7): 3184-3199.
- 收稿日期: 2021-01-28
修回日期: 2021-04-02