

· 综 述 ·

数字聚合酶链反应在病原微生物检测中的应用进展*

刘译利^{1,2}综述,高晶^{1△}审校

(1. 复旦大学附属妇产科医院检验科, 上海 200011; 2. 上海健康医学院, 上海 201318)

摘要:数字聚合酶链反应(PCR)是在实时荧光定量 PCR 的基础上发展起来的第 3 代核酸定量分析技术。其不依赖标准曲线、耐受性强、灵敏度高特性使单分子层面的精准定量得以实现。随着商业平台的开发,数字 PCR 的可操作性提升,近年来逐渐在临床微生物领域展现出了良好的应用前景,具体包括定量检测结核分枝杆菌及 2019 新型冠状病毒等病原微生物;直接检测无菌体液(如房水中的人巨细胞病毒);定量检测 HIV-DNA 以评估疗效及病程发展;检测甲型流感病毒对奥司他韦的耐药性突变;标定实时荧光定量 PCR 的参考标准品等。该文将对数字 PCR 的技术原理、技术优势、局限性,以及在临床病原菌检测领域的前沿应用展开论述。

关键词:病原微生物; 数字聚合酶链反应; 核酸定量分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.21.029 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2020)21-2684-05 **文献标识码:**A

The application of digital polymerase chain reaction in pathogen detection*

LIU Yili^{1,2}, GAO Jing^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract: Digital polymerase chain reaction (PCR) is the third generation of nucleic acid quantitative analysis technology based on real-time fluorescent quantitative PCR. It does not depend on the standard curve, has strong tolerance and high sensitivity, which makes the precise quantification of single molecule level possible. With the development of commercial platforms, the operability of digital PCR has been improved. In recent years, it has gradually shown a good application prospect in the field of clinical microbiology, including quantitative detection of Mycobacterium tuberculosis and COVID-19, direct detection of aseptic body fluid, such as human cytomegalovirus in aseptic body fluids, quantitative detection of HIV-DNA to evaluate the efficacy and progression of the disease, detection of resistance mutation of influenza A virus to oseltamivir, and calibration of reference standard for real-time fluorescent quantitative PCR and so on. This article will discuss the technical principle, technical advantages, limitations of digital PCR, as well as the frontier application in the field of clinical pathogen detection.

Key words: pathogenic microorganism; digital polymerase chain reaction; nucleic acid quantitative analysis

数字聚合酶链反应(PCR)是一种新兴核酸检测技术,其利用分割技术将核酸分子移入独立的反应单元中并进行扩增,在结果统计中加入泊松分布公式的应用,从而提升检测效能。数字 PCR 技术不需要建立标准曲线,对核酸的定量不依赖循环阈值(Ct 值)与标准品,打破了先前核酸检测技术定量拷贝数的传统方法,实现核酸拷贝数单分子层面的绝对定量。凭借其高灵敏度、高精确性等特点,数字 PCR 相对于荧光

定量 PCR,具有更广阔的应用前景。

1 数字 PCR 技术的原理

数字 PCR 是第 3 代核酸定量技术,实现了核酸拷贝数从相对定量到绝对定量的突破。数字 PCR 通过将包含核酸分子的反应体系均匀分配至独立的反应单元并进行扩增,采集终点荧光信号,根据有无荧光信号将反应单元计为阳性或阴性。在理想状态下,反应体系被均匀离散,各反应室中最多仅有 1 个核酸

* 基金项目:上海青年临床医技人才(临床检验专业)培养资助计划(沪医卫基[2016]04 号)。△ 通信作者, E-mail: gaojing1511@163.com。

分子,而在实际操作中,反应体系的目标核酸水平较高或分配不均匀时,无法保证理想状态得以实现,因此,对阳性反应单元采用泊松分布公式进行校正以减小误差。随着反应单元数的增加,可以提高反应的灵敏度和特异度,同时可以提高单分子的检测效率,减少污染,降低成本。数字 PCR 根据其分配反应体系方式的不同可以分为两类^[1]:微滴式数字 PCR 和微流控芯片式数字 PCR。

2 数字 PCR 技术的特点

数字 PCR 技术作为新兴的临床检测技术,与以往的技术比较,定量目标核酸的方法不同,具有不依赖标准曲线、高灵敏度、高特异度等诸多优点,与实时荧光定量 PCR 技术比较,各方面均有不同。实时荧光定量 PCR 技术是针对整个反应扩增过程实时采集并分析荧光信号,生成扩增曲线,然后利用 Ct 值与标准曲线进行核酸水平的定量分析。在临床检测中,实时荧光定量 PCR 技术存在一定的局限性:对标本类型与核酸模版水平要求相对较高,目前主要应用于血液、尿液与肺泡灌洗液等背景简单的标本中,在检测如粪便、痰液等背景复杂的标本时,由于标本与标准品间背景不同为检测引入误差^[2];部分标本中存在反应抑制剂,如血液抗凝剂、福尔马林等,降低了扩增效率,影响 Ct 值;标本目标核酸水平低于检测限等因素均会影响实时荧光定量 PCR 技术的精确度与灵敏度,且各标准品水平存在差异,不仅为实验引入新误差,还导致各实验室间数据可交换性差。

2.1 不需要依赖标准曲线 数字 PCR 采用终点荧光信号测量法,针对阳性反应单元应用泊松分布公式校正误差,实现真正意义上单分子水平的绝对定量,提升各实验室间数据的可互换性。此外,在 2 代测序技术(NGS)中,文库的建立往往使用荧光定量 PCR 技术,但受其扩增效率与标准曲线的限制导致文库分子的定量不理想,数字 PCR 可测定模版的绝对水平与长度,并且扩增过程不易发生错配,非常适合 NGS 文库的质量控制^[3]。

2.2 高灵敏度与高特异度 HUGGETT 等^[4]研究者在利用荧光定量 PCR 测定野生型 DNA 中罕见突变基因时,出现引物错配,野生型基因竞争性扩增的现象,可检测到的突变率为 1%,数字 PCR 利用分区原理,降低了背景干扰,检测下限突破至 0.001%,较荧光定量 PCR 低了 1 000 倍^[5-6],轻松实现单分子核酸检测。同时,数字 PCR 技术的分区处理还可提高对反应抑制剂的耐受能力,降低其对扩增结果的干扰。数字 PCR 的应用意味着反应体系从微升级至纳升级的突破,在临床应用最广泛的微滴式数字 PCR 的检测系统(QX200)^[7]中,可以将原体积为 20 μ L 的标本分配至多达 20 000 个反应室中,即使是低丰度的目的序列也能被灵敏地检测到。因此,在背景富集的

检测环境下,存在抑制剂或低丰度目标核酸拷贝数的标本检测中,数字 PCR 均具有良好的灵敏度与特异性。目前,数字 PCR 已被用来检测粪便标本中的大肠埃希菌^[8]。

2.3 高精密度 除了不依赖标准曲线外,数字 PCR 的高精度还归功于泊松分布的应用。泊松分布是指离散概率分布,反应随机分布状态,利用统计学原理,根据阳性反应单元的个数及比例进行结果校正,提升检测精确度。数字 PCR 的定量是将有无荧光信号直接计为“阳性”或“阴性”,若目标核酸没有均匀离散,各反应室中存在一个以上靶核酸,则检测结果偏差较大,应用泊松分布原理计算结果,可大幅度提高检测精确度。

2.4 步骤简便,不需要扩增前 DNA 处理 在荧光定量 PCR 技术中,提取 DNA 的步骤复杂且不同试剂盒的提取效率不同,对各实验室间的数据可比性及检测精确度有一定影响。PAVSIC 等^[9]学者尝试在数字 PCR 平台上摒弃这一步骤,利用 95 $^{\circ}$ C 热处理直接降解病毒蛋白质衣壳,释放 DNA,该方法较传统提取方式避免了 DNA 的丢失,可得到更高水平的病毒,更接近实际检测值。

2.5 数字 PCR 技术临床应用的局限性 数字 PCR 作为一种新兴的核酸检测技术,在进入临床检测前,尚需要进行大量的性能验证,比对该前沿技术与传统核酸检测方法间结果的一致性,并解决质量管理控制等问题,不断优化技术,确保检测结果的可靠性。

在性能验证方面,TRYPSTEEN 等^[10]和 BOSMAN 等^[11]在实验中发现,数字 PCR 少数反应单元存在假阳性的现象,目前出现该现象的原因还不得而知,有些学者猜测可能是阈值设置不当导致的。此外,不精密的技术设计在检测过程中可能带来污染,由于数字 PCR 的高灵敏度,极微量的污染也可能造成结果误差,并且当前该技术无法单独分离阳性反应室而从中提取核酸,利用全基因组测序等方法研究假阳性液滴形成。另外,扩增 RNA 基因时分区中可能包含未完全反转录的模板,取样过程存在随机误差引起目的基因未被提取到等原因均有可能导致假阴性。在技术操作层面,目前数字 PCR 技术尚未实现自动化模式且操作繁琐。如何避免实验过程中的污染是对技术人员极大的考验,因此,相关实验操作人员的技术培训尤为重要。此外,反应室中有限的标本体积、有限的数量分区导致动态检测范围局限;多重检测能力低、试剂耗材昂贵等因素也导致了数字 PCR 技术尚未能广泛应用于临床检测中。

3 数字 PCR 技术在病原微生物检测中的应用

当前数字 PCR 技术已经应用于临床疾病的相关检测中,如判断慢性粒细胞白血病复发风险^[12]、器官移植的排斥反应监测与个性化治疗^[13]、无创产前诊

断^[14-15]、癌症基因突变检测^[16-17]、肿瘤耐药突变检测^[5]等方面。在临床病原微生物检测领域,数字 PCR 技术也有卓越的贡献。首先,鉴于其高灵敏度,检测标本不需要利用传统的培养和鉴定方法,大幅度缩短了报告时间,为临床诊断与治疗争取了时间,对传染性疾病的快速诊断和控制起到了极大的作用;其次,病原体的载量与临床疾病的发展、药效评价和用药量调整都息息相关,即使是微量的病原体载量波动也具有重要的参考意义,数字 PCR 技术可对病原体精准定量,已在病原微生物检测方面展开了广泛的研究。

3.1 临床罕见微生物鉴定领域的应用

3.1.1 临床难培养细菌的鉴定

临床上鉴定细菌的方法主要有:细菌分离培养鉴定、血清学抗体检测及核酸检测等,其中利用荧光定量 PCR 技术进行核酸检测是最快速、最安全、灵敏度与特异度均较高的方法,但影响该技术检测结果准确性的因素较多。我国布鲁菌病患者多在出现症状时自行服用抗菌药物,导致病原菌血清水平较低,难以被检测到。韩冰等^[18]尝试利用数字 PCR 技术检测布鲁菌,可检测到的拷贝数低至 0.08 copy/ μ L,有效提高了低丰度标本的病原菌检出率。结核分枝杆菌是引起结核病的病原菌,可累及全身多处器官,其中以感染肺部导致肺结核最为常见,由于血液中仅存在极低载量的结核菌 DNA,故一般检测标本局限于痰液标本、深部痰液取样困难度高、痰液标本背景复杂等影响因素易导致检测效能低下。宋能等^[19]利用数字 PCR 技术检测结核菌 CFP10 基因序列,利用质粒测得其最低检测限为 1.2 copy/ μ L,并选取 20 例结核菌感染患者,检测其血液标本中核酸绝对定量水平为 3.4~94.0 copy/ μ L,灵敏度明显高于荧光定量 PCR 技术。

3.1.2 病毒检测

新型冠状病毒为 β 属的冠状病毒,被国际病毒分类委员会命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2。2019 新型冠状病毒肺炎是由新型冠状病毒感染肺部为主要临床表现的感染性疾病,数字 PCR 技术的高灵敏度与高特异度可提高复杂来源的环境标本中痕量病毒核酸的检出率,并且可避免因病毒变异而导致的引物、探针结合能力与扩增效率下降。实验数据表明,数字 PCR 技术对于低病毒载量的检测相对于荧光定量 PCR 技术更具优势,对于早期疑似病例的筛查、及时阻断传染源、控制传染病暴发与蔓延起到了至关重要的作用^[20]。

早期数字 PCR 技术已应用于定量检测乙型肝炎(简称乙肝)病毒 DNA,近期有学者在此基础上将其用于定量乙肝病毒复制过程中的重要标志物——超螺旋的共价、闭合、环状 DNA 分子(cccDNA)检测,cccDNA 也是导致乙肝病毒慢性感染与停止抗病毒治疗后复发的主要原因^[21]。由于乙肝病毒 DNA 与 cccDNA 基因序列同源性较高,且在接受治疗时 cccD-

NA 水平较低,因此需要选择灵敏度高、特异性好的检测方法以提高检出率与精确度,相比荧光定量 PCR 技术最低检测限为 50 ng,数字 PCR 技术检测限可低至 1 ng,可监测管理慢性肝炎患者发挥重要作用,更能满足临床检测需求。

数字 PCR 技术除应用于临床上病毒的直接鉴定外,还参与到病毒疫苗的研发中,如定量减毒登革病毒血清^[22]、评估嵌合人偏肺病毒表位的重组流感病毒免疫保护效果等^[23]。

3.1.3 寄生虫检测

当前寄生虫类感染性疾病仍是热带国家及发展中国家需要面临的公共卫生问题之一,临床上显微镜镜检是主要的检测寄生虫感染的手段,但该方法耗时长,低丰度标本检出率低。此前,WEERAKOON 等^[24]研究了数字 PCR 技术直接检测血吸虫 DNA 的可行性,实验中以血清、尿液、唾液、粪便为标本,检测结果均具有良好的灵敏度,且可根据血吸虫 DNA 的载量变化判断患者的感染程度,由此证明数字 PCR 技术在血吸虫疾病控制方面同样起到了重要作用。

3.2 微生物载量极低的定性定量检测

数字 PCR 技术可用于检测临床原始标本中水平较低的病原菌 DNA,例如从血液标本中直接检测人乳头瘤病毒(HPV)^[25]、结核分枝杆菌等^[26],在 70 例宫颈癌患者血清标本中有 93% 的标本检测到血液循环中低水平的 HPV^[25],可实现感染早期的筛查与治疗,检测的无创性减轻了患者检查的痛苦,且降低了伤口感染风险。近期,华山医院在 1 项有关青光眼镜状体炎综合征的研究中利用数字 PCR 技术对患者房水标本进行检测发现,数字 PCR 技术较荧光定量 PCR 技术的检测效能更优,尤其适合无菌体液标本中的微量病毒检测。此外,有学者鉴于数字 PCR 技术高灵敏度、高精度等技术优势,有学者将其应用于孕妇羊水^[27]和脑脊液结核分枝杆菌的检测中。

3.3 感染性疾病病程变化及预后判断方面的应用

人类免疫缺陷病毒(HIV)感染患者在接受反转录病毒治疗后即使抑制了血液中病毒繁殖,但存在于潜伏感染细胞中的 HIV-DNA 仍可维持 HIV 的低水平复制,通过检测释放于血液循环中低载量的 HIV-DNA,可评估用药疗效与病程发展。BOSMAN 等^[11]利用数字 PCR 技术与荧光定量 PCR 技术对经过治疗后的患者进行体内残余 HIV-DNA 检测发现,数字 PCR 技术比荧光定量 PCR 技术具有更高的灵敏度,且对于高序列多样性的标本更具优势。有学者利用数字 PCR 技术检出慢性阻塞性肺疾病患者痰液或肺泡灌洗液中存在的定植肺曲霉菌,提示及时检出定植菌可有效预防呼吸系统疾病患者病情的进一步恶化与反复,并且可提高预后效果^[28]。此外,日本科学家发现,可利用数字 PCR 技术的高灵敏度等特性对日本脑炎

病毒及时进行早期检测,有效缓解了由于发病急、预后差的疾病特性带来的严重后果^[29],大幅度降低了严重并发症的发病率和病死率。

3.4 稀有基因突变的检测 数字 PCR 技术在检测野生型背景下的稀有突变基因方面也有明显优势。相对于灵敏度低的实时荧光定量 PCR 技术,数字 PCR 技术可检测到早期痕量的稀有突变,例如检测背景复杂的痰液标本中的结核分枝杆菌^[30],以及甲型流感病毒的耐药性突变。我国是流感病毒的高发地区,使用数字 PCR 技术检测甲型流感病毒对奥司他韦耐药性突变的灵敏度可下降至 0.1%^[31],对防止患者无效用药,帮助临床尽快采取针对性治疗,降低传染病传播风险等均发挥了积极作用。

3.5 数字 PCR 技术实验室结果标准化的进展 数字 PCR 技术检测不需要凭借外部标准品即可实现精准定量的特性已被应用于荧光定量 PCR 技术标准品的测量^[32],美国国家标准技术研究院使用数字 PCR 技术标定了巨细胞病毒标准品^[33],由于标准品的多样性与水平的偏差导致荧光定量 PCR 技术各实验室间数据缺乏可比性,标准化对于质量控制、数据的可靠性与可交换性起到了至关重要的作用。

4 小 结

数字 PCR 技术作为一种新兴的核酸检测技术,以其高灵敏度、高精度及绝对定量的技术特点,在各检测领域均显示出不可比拟的优势,为目标核酸绝对定量检测带来了历史性进步。在病原菌检测方面,数字 PCR 技术可精确定量病原体载量,检测罕见微生物,辅助临床阐释病程、药效监测、发现早期疾病。目前,数字 PCR 技术尚在发展初期,距离广泛应用于临床检测、取代实时荧光定量 PCR 技术仍有许多问题需要解决,包括降低运行成本、提高仪器自动化程度、提高检测通量、建立行业统一标准等。随着科学技术的不断发展、检测平台的不断优化,有效解决以上问题指日可待,数字 PCR 技术将拥有更广阔的应用前景。

参考文献

[1] 胡思宏,鲍登克,万绍贵. 数字 PCR 及其在现代医学分子诊断中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(9):861-866.

[2] BURNS M J, BURRELL A M, FOY C A. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis[J]. *European Food Res Technol*, 2010, 231(3):353-362.

[3] 关明,郭玮,刘维薇,等. 数字 PCR 的临床应用和挑战[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(14):1665-1669.

[4] HUGGETT J F, COWEN S, FOY C A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):79-88.

[5] WATANABE M, KAWAGUCHI T, ISA S I, et al. Ultra-sensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(15):3552-3560.

[6] DENG X, CUSTER B S, BUSCH M P, et al. Simultaneous estimation of detection sensitivity and absolute copy number from digital PCR serial dilution[J]. *Computat Biol Chem*, 2017, 68:1-5.

[7] RUTSAERT S, BOOSMAN K, TRTSTEEN W, et al. Digital PCR as a tool to measure HIV persistence[J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1):16-23.

[8] PAQUETTE S J, STANFORD D K, THOMAS J, et al. Quantitative surveillance of shiga toxins 1 and 2, escherichia coli O178 and O157 in feces of western-canadian slaughter cattle enumerated by droplet digital PCR with a focus on seasonality and slaughterhouse location[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4):e0195880.

[9] PAVSIC J, ZEL J, MILAVEC M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(1):67-75.

[10] TRYPSTEEN W, VYNCK M, KISELINOVA M, et al. ddpcRquant: threshold determination for single channel droplet digital PCR experiments[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(19):5827-5834.

[11] BOSMAN K J, NIJHUIS M, HAM P M, et al. Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):13811.

[12] ALIKIAN M, WHALE A S, HUGGETT J F, et al. Next-generation sequencing-assisted dna-based digital PCR for a personalized approach to the detection and quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia patients [J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(2):176-189.

[13] BECK J, BIERAU S, BALZER S, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(12):1732-1741.

[14] TAN C, CHEN X, WANG F, et al. A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies[J]. *Analyst*, 2019, 144(7):2239-2247.

[15] KHATTABI L A E, SCIELLOUR R L, TESSIER D L, et al. Could digital PCR be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: a proof of concept study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5):e0155009.

[16] DRAGANA M, JOHN R, MICHAEL B, et al. Applying standard clinical chemistry assay validation to droplet digital pcr quantitative liquid biopsy testing [J]. *Clin Chem*, 2018, 64(12):1732-1742.

[17] 李霄,丁颖,季盼,等. 液滴式数字 PCR 检测晚期非小细胞肺癌血液 EGFR 突变的应用价值[J]. *临床检验杂志*, 2019, 37(8):579-582.

- [18] 韩冰, 吴翠萍, 赵芯, 等. 数字 PCR 和荧光定量 PCR 诊断急性期布鲁菌病的灵敏度比较初步研究[J]. 传染病信息, 2019, 32(4): 312-316.
- [19] 宋能, 谭杨, 罗凤玲, 等. 微滴数字 PCR 定量检测全血样品中结核分枝杆菌特异 CFP10 基因[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(2): 10-15.
- [20] 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]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3): 230-233.
- [21] MU D, YAN L, TANG H, et al. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37(10): 2063-2073.
- [22] ABACHIN E, CONVERS S, FALQUE S, et al. Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid[J]. Biologicals, 2018, 52(1): 49-54.
- [23] 李晓燕, 朱丛中, 郭丽茹, 等. 嵌合人偏肺病毒(hMPV)表位的重组流感病毒免疫保护效果[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2020, 40(1): 11-18.
- [24] WEERAKOON K G, GORDON C A, WILLIAMS G M, et al. Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite cell-free DNA detection in diverse clinical samples[J]. J Infect Dis, 2017, 216(12): 1611-1622.
- [25] 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]. J Pathol Clin Res, 2016, 2(4): 201-209.
- [26] 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.
- [27] 席晓霞. 初生婴儿肠道菌群与母体各部位菌群相关性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- [28] 郑璐. 微液滴数字 PCR 技术和非分子诊断方法对非中性粒细胞缺乏宿主肺曲霉菌病的临床应用价值研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [29] WU X L, LIN H, CHEN S J, et al. Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Virol Methods, 2017, 248(1): 166-171.
- [30] PHOLWAT S, STROUP S, FOONGLADDA S, et al. Digital PCR to detect and quantify heteroresistance in drug resistant mycobacterium tuberculosis[J]. PLoS One, 2017, 8(2): e57238.
- [31] WHALE A S, BUSHELL C A, GRANT P R, et al. Detection of rare drug resistance mutations by digital PCR in a human influenza A virus model system and clinical samples[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(2): 392-400.
- [32] DOBNIK D, DEMSAR T, HUBER I, et al. Inter-laboratory analysis of selected genetically modified plant reference materials with digital PCR[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(1): 211-221.
- [33] KLINE M C, HOLDEN M J, SCOTT C, et al. Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA[J]. J Mol Diagn, 2013, 15(2): 177-185.

(收稿日期: 2020-02-02 修回日期: 2020-06-10)

(上接第 2679 页)

- [2] 唐洁, 梁效功, 薛丽, 等. 多参数流式细胞术在多发性骨髓瘤早期诊断中的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(2): 236-239.
- [3] 郭晓聪, 徐晓娅, 刘伟平. 血清蛋白电泳和免疫固定电泳对多发性骨髓瘤的诊断价值[J]. 实用医药杂志, 2019, 36(5): 427-429.
- [4] 毕德成. 免疫球蛋白定量和免疫固定电泳对多发性骨髓瘤的临床诊断价值研究[J]. 中外女性健康研究, 2017, 25(12): 55-56.
- [5] 陈云峰, 葛亮, 沈建江. 免疫固定电泳及免疫球蛋白定量在多发性骨髓瘤诊断和分型中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(11): 881-883.
- [6] 宋鉴清. 电泳技术临床应用——电泳图谱[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2006: 85-91.
- [7] LEE J H, YOON S S, SUH C, et al. Multiple myeloma in Korea: past, present, and future perspectives. experience of the Korean multiple myeloma working party[J]. Int J Hematol, 2010, 92(1): 52-57.
- [8] 杨强, 侯健, 陈文明, 等. 双克隆免疫球蛋白多发性骨髓瘤六例报告并文献复习[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(7): 614-616.
- [9] MANNAA C, NANNIC L, LUMINID A, et al. Artificial intelligence techniques for embryo and oocyte classification[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 26(1): 42-49.
- [10] TAYLOR D, POWERS D. Teaching artificial intelligence to read electropherograms[J]. Forensic Sci Int Genet, 2016, 25: 10-18.
- [11] 唐江涛, 李立新, 冯伟华, 等. 免疫固定电泳和血轻链比值诊断以肾脏损伤为首发症状的多发性骨髓瘤的价值[J]. 四川大学学报(医学版), 2016, 47(4): 551-555.
- [12] 吴颖涛, 邹琳, 黄前川, 等. 血清游离轻链及其比值在轻链型多发性骨髓瘤中的应用价值[J]. 华南国防医学杂志, 2019, 33(7): 458-461.

(收稿日期: 2020-02-11 修回日期: 2020-06-17)