

数字 PCR 技术在感染性疾病中的应用进展*

王国飞,王雪亮 综述,周 靖[△] 审校

上海市临床检验中心/上海市实验医学研究院,上海 200126

摘要:数字 PCR 是一种具有广泛应用前景的、可绝对定量的核酸检测新技术,与实时荧光 PCR 相比具有高灵敏度和精确度上的优势。近年来,数字 PCR 已广泛应用于临床检测领域,特别是病原微生物的检测中,为相关疾病的早期诊断、监测预警、疗效评估等提供了量化指标依据。基于此,该文对数字 PCR 的技术原理、优势及其在感染性疾病中的应用进行综述,以期数字 PCR 更好地用于感染性疾病提供参考借鉴。

关键词:数字 PCR; 实时荧光 PCR; 感染性疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.08.022

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2024)08-1006-05

文献标志码:A

Advances in the application of digital PCR technology in infectious diseases*

WANG Guofei, WANG Xueliang, ZHOU Jing[△]

Shanghai Center for Clinical Laboratory/Shanghai Academy of Experimental
Medicine, Shanghai 200126, China

Abstract: Digital PCR is a new technology for the absolute quantification of nucleic acid detection, which has a wide application prospect. Compared with real-time fluorescence PCR, it has the advantages of high sensitivity and accuracy. In the recent years, digital PCR has been widely used in the field of clinical detection, especially in the detection of pathogenic microorganisms, which provides quantitative indicators for early diagnosis, monitoring and early warning, and curative effect evaluation of related diseases. This review summarizes the technical principle, advantages and application of digital PCR in infectious diseases, in order to provide reference for the application of digital PCR in infectious diseases.

Key words: digital PCR; real-time fluorescence PCR; infectious diseases

感染性疾病是世界各地社会公共卫生和经济稳定的重大负担,对全球卫生安全和人类健康带来越来越大的挑战^[1]。此外,受全球气候变暖、城市化加速和人口快速流动等多种因素影响,新发感染性疾病近年来逐渐增多,尤其是新型冠状病毒(以下简称新冠病毒)感染的全球大流行,使其成为全球重要的公共卫生威胁^[2-3]。因此,在全球一体化大背景下,快速精准地识别相关病原微生物,对于人类健康和公共卫生安全具有非常重要的作用。

病原微生物检测技术主要包括形态学检查、病原分离培养、免疫学检测和核酸检测等。形态学检查、病原分离培养、免疫学检测等传统方法存在漏检和不便分型、培养周期长、较易出现假阴和假阳等缺点。核酸检测因为灵敏性高、特异性强、反应快速等优点,目前已在临床得到广泛应用,特别是实时荧光 PCR,已被用作某些病原体检测的金标准。然而,实时荧光 PCR 作为一种核酸间接定量手段,受到其固有方法学制约,在检测极低丰度靶标序列、识别微小靶标浓度

变化等方面存在不足,特别是在定量检测时无法摆脱标准曲线等外部标准品束缚。

随着技术的不断发展,1999 年作为第 3 代 PCR 技术的数字 PCR(dPCR)被提出,完成了从相对定量到绝对定量的转变。作为一种新的核酸定量技术,具有比传统 PCR 更精准和重复性更好的优点,已逐渐成为生命科学领域引人瞩目的创新之一,并在病原体检测、肿瘤早筛、伴随诊断和产前诊断等领域中得到广泛应用^[4-5]。本文就 dPCR 在病原体检测中的应用进行综述,以期 dPCR 更好地用于传染性疾病预防、用药指导和疗效监测等提供参考借鉴。

1 数字 PCR 技术的原理和优势

1992 年,SYKES 等^[6]在核酸扩增时对样品进行有限稀释并结合泊松分布对扩增结果进行统计处理,这为 dPCR 的产生奠定了坚实的理论基础。1999 年,VOGELSTEIN 与 KINZLER 正式提出了 dPCR 的概念^[7],即将指数型函数转化成线性函数,对模板进行有限稀释,根据荧光信号的有或无进行精确定量,其

* 基金项目:上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项(20214Y0391)。

[△] 通信作者, E-mail:zhoujing@sccl.org.cn。

为结合了第 1 代传统 PCR 简单操作和第 2 代实时荧光 PCR 准确定量的特征发展而来的第 3 代 PCR 技术^[8]。

同传统 PCR 相比, dPCR 增加了对反应体系进行分隔的操作, 将几十微升的反应体系分隔成了数万微小独立反应体系, 核酸模板在分隔过程中被充分稀释, 理想状态下为每个微滴中含有 1 个分子核酸模板, 扩增完成后对所有液滴进行荧光信号识别并计数, 以此计算靶标分子的浓度(图 1)^[9]。dPCR 的优

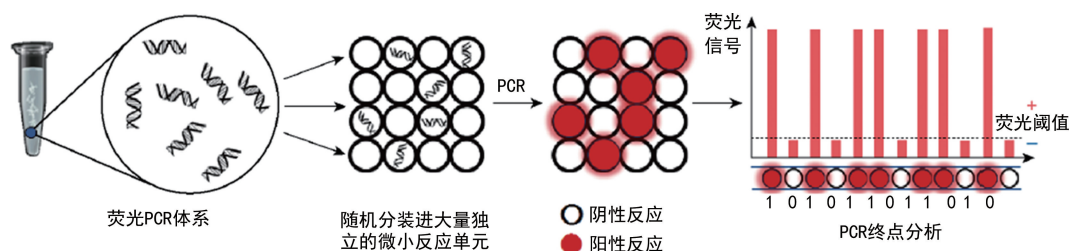


图 1 dPCR 的原理和工作流程^[9]

在发展过程中, dPCR 系统出现了 3 种类型, 即微孔板 dPCR 系统、微流控芯片 dPCR (mcdPCR) 系统和微滴式 dPCR (ddPCR) 系统^[12]。微孔板 dPCR 系统是在不锈钢芯片上刻蚀几千个微反应室, 微量扩增体系在每个微反应室中分别扩增, 每孔的反应体积从微升级降至纳升级, 须通过自动点样仪加液, 实验成本和操作复杂性相对较高。mcdPCR 系统是在微流体技术、纳米制造技术和微电子技术等大力发展的基础上产生的, 通过微流控芯片技术可使样品流体快速准确地分布于若干个独立单元, 此方法通量高、成本低、效果好。ddPCR 系统则是利用油包水技术将其“分割”为数万个纳升级的微滴, 每一个微滴都是一个独立的 PCR 反应体系, 该方法通量高, 操作简单, 成本低, 是目前应用最为广泛的 dPCR 平台。

2 dPCR 在感染性疾病检测中的应用

dPCR 凭借其高灵敏度、高精度和绝对定量的特点, 已成为检测病原微生物的一种有前途和可靠的工具^[13], 并广泛应用于多种病毒、细菌、衣原体、寄生虫感染等的检测和研究中。

2.1 dPCR 在病毒检测中的应用

病毒感染很容易出现发烧感冒的现象, 也会出现咳嗽咳痰的症状, 尤其是高致病性病毒, 会影响人的免疫系统从而引起多种并发症, 导致人体出现免疫力低下、感染、腹泻等症状, 对人体产生较大的不同程度的损害。dPCR 在病毒感染诊断中起着重要的作用, 目前已应用于新型冠状病毒^[14]、人类乳头瘤病毒 (HPV)^[15]、人类疱疹病毒、巨细胞病毒、人流感病毒、乙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 等^[16] 病毒的检测中。NYARUA-BA 等^[17] 综述了 dPCR 在新冠病毒检测中的广泛应用, 包括新冠病毒检测和参考标准的开发、环境监测、突变检测及其临床诊断等, 相关研究均显示 dPCR 的

势包括^[5,10]: (1) 绝对定量。不需要标准品, 不依赖扩增阈值和标准曲线, dPCR 扩增效率不影响结果, 可以绝对定量核酸分子^[11]。(2) 受干扰影响小。dPCR 使用终点荧光分析的方式, 定量较少受到样品中扩增抑制剂的影响。(3) 灵敏度更高。dPCR 可更精确地量化靶标分子, 且在测抗病毒治疗中低浓度病毒载量方面更为灵敏, 同时在检测珍贵样品和样品核酸存在降解时具有明显的优势。

特异性、灵敏性、再现性和检测限通常不受常见因素影响, 可有效规避实时荧光 PCR 法中出现的假阴性和假阳性情况。CAROW 等^[18] 使用 dPCR 和实时荧光 PCR 对宫颈癌患者前哨淋巴结中的 HPV mRNA 进行定量检测, 并确定了预后阈值水平, 结果发现实时荧光 PCR 的平均变异系数 (CV) 为 126%, 而 dPCR 的平均 CV 仅为 40%, 这表明 dPCR 具有更高的可靠性。SNIPPENBERG 等^[19] 通过 dPCR 检测平台对 HIV-1 感染者样本中 DNA 载量进行定量, 可获得更为准确及敏感的 HIV-1 储存库检测结果, 这对提高 HIV-1 感染者的治疗效果起到至关重要的作用。

2.2 在细菌检测中的应用

致病性细菌感染严重威胁人类健康, 副溶血弧菌、结核杆菌、金黄色葡萄球菌等病原菌引起的相关疾病已引起广泛关注。LEI 等^[4] 建立了一种针对副溶血弧菌 *tlh*、*tdh* 和 *ureR* 基因的多重 ddPCR 方法。结果表明该方法显著提高了副溶血性葡萄球菌检测的特异性和准确性, 且其检出限可低至 15 CFU/mL。USHIO 等^[20] 利用 dPCR 检测肺结核 (PTB) 患者血浆中结核分枝杆菌 (MTB) 的研究中发现, 从新诊断的痰涂片阳性 PTB 患者血浆样本中纯化总 DNA 后, 用 dPCR 定量样品中 MTB 特异性基因 (*S6110* 或 *gyrB*) 拷贝数, 结果成功检测到 PTB 患者血浆中的 MTB DNA, 该 dPCR 的测定提高了检测小拷贝数目标分子的灵敏度, 同时为 dPCR 检测 PTB 患者血浆中 MTB DNA 进行了实用性探索。徐卫华等^[21] 比较了 dPCR 和血培养法在检测儿童耐甲氧西林金黄色葡萄球菌血流感染中的应用效果。结果发现 dPCR 的灵敏度和特异度分别为 91.40% 和 94.15%, 平均检测时间为 2.5 h, 远少于血培养法的 48 h, 有助于提高耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的快速诊断能力, 为早期精准治疗赢取时间。

2.3 在支原体和衣原体检测中的应用 解脲支原体(UU)和沙眼衣原体(CT)感染是发病率较高的非淋球菌性传播疾病的常见原因。HUANG 等^[22]开发出用于临床样本中 UU 检测和定量的 ddPCR 方法,为 UU 感染与女性非特异性宫颈炎之间的相关性提供了有效证据。ROBERTS 等^[23]开发出一种用于 CT 感染的 ddPCR 方法,通过检测几内亚比绍 CT 流行人群的 1 509 份临床结膜拭子样本,通过比较 ddPCR 和罗氏扩增 CT/NG 检测的性能,发现 ddPCR 的灵敏度和特异度分别为 73.3% 和 99.1%,阴性和阳性预测值分别为 94.6% 和 94.5%,这提示 ddPCR 可作为一种有效的诊断技术用于诊断眼部沙眼衣原体感染。

2.4 在寄生虫检测中的应用 由于国际旅游和移民等因素,寄生虫感染已成为全球疾病负担的主要原因之一和发展中国家面临的主要公共卫生问题。显微镜镜检是检测寄生虫感染的主要手段,但该方法耗时长,低丰度标本检出率低,而 dPCR 凭借其特有优势在寄生虫感染检测中应用越来越多,包括疟原虫^[24]、日本血吸虫^[25]、巴贝西虫^[26]等。POMARI 等^[27]的研究汇总了 dPCR 在寄生虫感染检测中的应用现状,发现 dPCR 在恶性疟原虫和日本血吸虫检测中具有明显优势,不仅表现出更高的灵敏度,同时在对隐孢子虫的检测中显示出对粪便抑制剂具有更好的稳定性。杨亚闪等^[28]建立了针对人巴贝西虫的 18S rRNA 基因的 dPCR 检测方法,并利用该方法检测了 1 000 份我国牡丹江市采集的献血者红细胞,结果发现人巴贝西虫的检出阳性率为 0.2%,并证实该方法具有较高灵敏度和较好稳定性,可稳定检测单拷贝核酸检测下限能达到组内实际检测拷贝数为 4.00 ± 0.65 ,组间实际检测拷贝数为 4.53 ± 0.71 ,为巴贝西虫研究及我国血供安全评估提供了技术储备和参考数据。WEERAKOON 等^[29]研究了 dPCR 直接检测血吸虫的可行性,粪便和血清的检测结果表明其均具有良好的灵敏度(分别为 98% 和 94%),且可根据血吸虫 DNA 载量变化判断患者感染程度,这也表明 dPCR 在血吸虫病控制方面可起到重要作用。

3 数字 PCR 在感染性疾病监测中的应用

dPCR 可以精确定量 10 个拷贝以下的病原微生物^[30],这是实时荧光 PCR 所无法实现的,该特性特别适合感染性疾病早期诊断和低浓度病毒监测。LIN 等^[31]报道了使用 ddPCR 可在 24 h 内快速准确鉴定出两例脓毒症患者中大肠杆菌和肺炎克雷伯菌、肺炎克雷伯菌和粪肠球菌的案例,这表明 dPCR 有助于脓毒症的超早期(<24 h)诊断,可提早预警并在治疗过程中对病原体精准定量监测。RENAULT 等^[32]通过 dPCR 和 qPCR 对 215 例 HIV 感染者样本总 DNA 进行连续监测,结果显示 dPCR 的重复性(CV 为 11.9%)和再现性要比实时荧光 PCR 更好(CV 为

24.7%),有助于长期接受抗逆转录病毒治疗的患者,通过 dPCR 对总 HIV DNA 的绝对定量可以比实时荧光 PCR 更准确地监测 HIV 病毒库。韩冰等^[33]利用 dPCR 技术检测布鲁菌,针对 20 例急性期布鲁菌病患者血清样本,dPCR 均能检出阳性,而实时荧光 PCR 的检测阳性为 0,在急性期布鲁菌病患者血清标本检测中,dPCR 检测灵敏度高于实时荧光 PCR,有良好的临床应用前景,同时检出限可低至每微升 0.08 个拷贝,有效提高了低丰度标本的病原菌检出率。

4 数字 PCR 在感染性疾病重症管理中的应用

病原体感染是重症医学中发病率和死亡率的主要原因,及时准确地诊断对减少感染导致的致死率和致残率至关重要,尤其是某些重症感染疾病的早期诊断、严重程度分层、预后评估或治疗指导等。ZHOU 等^[34]利用 ddPCR 对胸膜和腹膜感染患者样本中的克雷伯菌进行了检测,ddPCR 检测的灵敏度分别为 96% 和 92.86%,同时与基于培养的鉴定的时间相比,ddPCR 分析的标本周转时间约为 3 h,时间上也更为快速。WU 等^[35]通过进行在重症监护病房(ICU)实践中诊断血流感染(BSIs)的差异 ddPCR 结果的前瞻性临床研究,用来评判 ddPCR 作为重症医学中 BSIs 病原体检测的一种有前途工具的可行性。以临床诊断的 BSI 真阳性为基础,ddPCR 检测的灵敏度和特异度分别提高到 84.9% 和 92.5%,结合临床感染证据,ddPCR 显示出在 ICU 实践中快速诊断可疑 BSIs 的潜在优势。CHEN 等^[36]通过在体外将真菌细胞与人血混合,以及在体内分析感染小鼠和疑似念珠菌血症患者的血样,评估了 ddPCR 检测念珠菌 DNA 的灵敏度和特异度,结果表明,ddPCR 分析可以在血液样品中检测到每个反应至少 4.5 个 DNA 拷贝。与传统的培养和实时荧光 PCR 法相比,ddPCR 对念珠菌 DNA 检测显示出更高的灵敏度和特异度,临床上可用于监测念珠菌血症的治疗。以上研究证明,dPCR 可作为一种有潜力的技术工具,有助于改善重症医学中感染的检测和临床管理。

5 数字 PCR 在耐药基因检测中的应用

相比 qPCR,dPCR 能早期检测罕见突变基因或药物抗性基因^[37]。SUN 等^[38]建立了一种使用 ddPCR 定量检测粪便样本中幽门螺杆菌克拉霉素耐药(突变)和易感(野生型)等位基因(23S rRNA)的方法,以对幽门螺杆菌抗微生物耐药性进行评估。相较于常规临床耐药监测,由于幽门螺杆菌抗微生物剂抗性的准确评估受到分离物取样较少的限制,ddPCR 灵敏度高的特性使其能更好地检测到耐药性突变。SRISUTHAM 等^[39]开发和验证了用于检测与抗疟疾药物抗性相关的恶性疟原虫多药耐药性 1(pfmdr1)、恶性疟原虫血浆蛋白酶 2(pfplasmepsin2)和恶性疟原虫 GTP 环化水解酶 1(pfgh1)基因拷贝数变异(CNV)的 ddPCR 检测方法。通过与实时荧光 PCR

法的比较,多重 ddPCR 法是准确检测基因拷贝数的可选方法,不需要校准标准,同时降低了成本和检测所需时间,表明 ddPCR 试验是监测抗疟疾药物耐药性的一个有用的附加工具。HU 等^[40]使用多重 ddPCR 检测临床上常见的 16 种细菌、4 种真菌和 4 个耐药基因,通过比较 dPCR、mNGS 疑似血流感染患者中的应用,表明在 ddPCR 检测 Panel 所覆盖的病原体范围内,ddPCR 比 mNGS 具有更高的灵敏度,且 ddPCR 可在 4 h 内完成检测,相比宏基因组测序(mNGS)2 d 的检测时间具有明显优势。

6 数字 PCR 在感染性疾病检测新平台/新技术检测开发中的应用

随着新技术的发展,针对感染性疾病的 dPCR 新检测平台也在不断开发中。CHOI 等^[41]为实现传染病快速检测,开发出传染病定量检测的物联网集成多路 dPCR 系统。该系统可使用自启动微流控芯片,以更高的线性度(>98%)和灵敏度(每微升 1 个拷贝)实现 3 种疾病病原体(流感病毒、登革热病毒和人类冠状病毒)的 9 个型别(如 H1N1、H3N2、IFZ B、DENV2、DENV3、DENV4、OC43、229E 和 NL63)的检测。钟田雨等^[42]研发试制了基于 dPCR 平台的新冠病毒核酸超敏定量检测试剂,利用创新的 RNA 一步法逆转录 ddPCR 技术,针对可对新冠病毒 ORF1ab 基因和 N 基因保守区进行核酸绝对定量,提高检测准确性可用于临床上新冠病毒感染的辅助诊断和病毒载量分析,具有广泛的临床应用价值。CHEN 等^[43]设计了硅基快速生成静态液滴阵列芯片的快速 dPCR 检测平台,使用乙型肝炎病毒质粒的梯度稀释作为 dPCR 反应的靶 DNA 来测试平台定量检测 DNA 分子的可行性,平台可实现 2 704 个微孔(每微孔 0.785 nL)的液滴阵列,样品加载时间小于 10 s,具备简单和有效的特性。

7 小 结

作为第 3 代 PCR 技术,dPCR 以其高灵敏、高精度、干扰小、绝对定量的技术优势已在感染性疾病检测和研究中得到广泛应用,并为疾病早期诊断、疗效评估和预后检测等方面提供了更具重复性和再现性的数据支持。但作为一项新的技术,dPCR 尚处于发展阶段,还有许多问题需要进一步解决和探讨,如实验成本过高、临床应用尚未普及、操作过程存在污染概率较高、检测速度和检测通量有待提升等。未来,结合高通量和数字芯片技术的持续发展,dPCR 将作为“精准医疗”的有力支撑,朝着高通量、自动化、多功能方向发展,继续引领分子诊断热潮,推动 dPCR 在生命科学中的实际应用。

参考文献

[1] NII-TREBI N I. Emerging and neglected infectious diseases: insights, advances, and challenges [J]. Biomed Res

Int, 2017, 2017: 5245021.

- [2] 焉鑫,刘蒙达,张力,等. 聚合酶螺旋反应(PSR)在病原微生物快速检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(9): 105-108.
- [3] GAO J, QUAN L. Current status of diagnostic testing for SARS-CoV-2 infection and future developments: a review [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e928552.
- [4] 尹居鑫,夏丽萍,邹哲宇,等. 多重数字聚合酶链式反应技术及其应用[J]. 分析化学, 2022, 50(1): 25-38.
- [5] 张瑾,张娟,徐鹏飞,等. 数字 PCR 技术及在病原微生物检测中的应用[J]. 口岸卫生控制, 2019, 24(5): 16-19.
- [6] SYKES P J, NEOH S H, BRISCO M J, et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. Biotechniques, 1992, 13(3): 444-449.
- [7] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [8] 黄瑾,梁涛波,许恒毅. 数字 PCR 在生物学检测中应用的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(2): 255-264.
- [9] 赵云,王蕾,郭雅萌,等. 数字聚合酶链反应及其在感染性疾病中的应用[J]. 微生物与感染, 2019, 14(3): 185-192.
- [10] KUYPERS J, JEROME K R. Applications of digital PCR for clinical microbiology [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(6): 1621-1628.
- [11] QUAN P L, MARTIN S, ERIC B. dPCR: a technology review [J]. Sensors (Basel), 2018, 18(4): 1271.
- [12] 赵治国,崔强,赵林立,等. 微滴数字 PCR 技术应用进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(6): 93-96.
- [13] CHEN B, JIANG Y, CAO X, et al. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases [J]. Clin Chim Acta, 2021, 517: 156-161.
- [14] DE KOCK R, BASELMANS M, SCHARNHORST V, et al. Sensitive detection and quantification of SARS-COV-2 by multiplex droplet digital RT-PCR [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(4): 807-813.
- [15] LILLSUNDE LARSSON G, HELENIUS G. Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45—a short report [J]. Cellular Oncol, 2017, 40(5): 521-527.
- [16] LI H, BAI R, ZHAO Z, et al. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases [J]. Biosci Rep, 2018, 38(6): BSR20181170.
- [17] NYARUABA R, MWALIKO C, DOBNIK D, et al. Digital PCR applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 era: a roadmap for future outbreaks [J]. Clin Microbiol Rev, 2022, 35(3): e0016821.
- [18] CAROW K, READ C, HÄFNER N, et al. A comparative study of digital PCR and real-time qPCR for the detection and quantification of HPV mRNA in sentinel lymph nodes of cervical cancer patients [J]. BMC Res Notes, 2017, 10(1): 532.
- [19] VAN SNIPPENBERG W, GLEERUP D, RUTSAERT S, et al. Triplex digital PCR assays for the quantification of intact proviral HIV-1 DNA [J]. Methods, 2022, 201:

- 41-48.
- [20] USHIO R, YAMAMOTO M, NAKASHIMA K, et al. Digital PCR assay detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pulmonary tuberculosis patient plasma[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 99: 47-53.
- [21] 徐卫华, 田克印, 李小双. 数字 PCR 和血培养检测儿童 MRSA 血流感染应用价值比较[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(6): 930-936.
- [22] HUANG Y, PAN H, XU X, et al. Droplet digital PCR (ddPCR) for the detection and quantification of *Ureaplasma* spp[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 804.
- [23] ROBERTS C H, LAST A, MOLINA-GONZALEZ S, et al. Development and evaluation of a next-generation digital PCR diagnostic assay for ocular *Chlamydia trachomatis* infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2195-2203.
- [24] DONG L, LI W, XU Q, et al. A rapid multiplex assay of human malaria parasites by digital PCR[J]. *Clin Chim Acta*, 2023, 539: 70-78.
- [25] WEERAKOON K G, GORDON C A, GOBERT G N, et al. Optimisation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: a duplex approach with DNA binding dye chemistry[J]. *J Microbiol Methods*, 2016, 125: 19-27.
- [26] WILSON M, GLASER K C, ADAMS-FISH D, et al. Development of droplet digital PCR for the detection of *Babesia microti* and *Babesia duncani*[J]. *Exp Parasitol*, 2015, 149: 24-31.
- [27] POMARI E, PIUBELLI C, PERANDIN F, et al. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(12): 1510-1516.
- [28] 杨亚闪, 林宝钗, 刘曹毅, 等. 人巴贝西虫数字 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国输血杂志*, 2021, 34(8): 835-838.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] LIN K, ZHANG H C, ZHAO Y H, et al. The direct application of plasma droplet digital PCR in the ultra-early pathogen detection and warning during sepsis: case reports[J]. *J Infect Public Health*, 2022, 15(4): 450-454.
- [32] RENAULT C, BOLLORÉ K, PISONI A, et al. Accuracy of real-time PCR and digital PCR for the monitoring of total HIV DNA under prolonged antiretroviral therapy [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 9323.
- [33] 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.
- [34] ZHOU F, SUN S, SUN X, et al. Rapid and sensitive identification of pleural and peritoneal infections by droplet digital PCR[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2021, 66(2): 213-219.
- [35] WU J, TANG B, QIU Y, et al. Clinical validation of a multiplex droplet digital PCR for diagnosing suspected bloodstream infections in ICU practice: a promising diagnostic tool[J]. *Crit Care*, 2022, 26(1): 243.
- [36] CHEN B, XIE Y, ZHANG N, et al. Evaluation of droplet digital PCR assay for the diagnosis of candidemia in blood samples[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 700008.
- [37] PEKIN D, SKHIRI Y, BARET J C, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics[J]. *Lab Chip*, 2011, 11: 2156-2166.
- [38] SUN L, TALARICO S, YAO L, et al. Droplet digital PCR-based detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates reveals frequent heteroresistance [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9): e00019-18.
- [39] SRISUTHAM S, SUWANNASIN K, SUGARAM R, et al. Measurement of gene amplifications related to drug resistance in *Plasmodium falciparum* using droplet digital PCR[J]. *Malar J*, 2021, 20(1): 120.
- [40] HU B, TAO Y, SHAO Z, et al. A comparison of blood pathogen detection among droplet digital PCR, metagenomic next-generation sequencing, and blood culture in critically ill patients with suspected bloodstream infections[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 641202.
- [41] CHOI J W, SEO W H, LEE Y S, et al. Development of an IoT-integrated multiplexed digital PCR system for quantitative detection of infectious diseases [J]. *Lab Chip*, 2022, 22(20): 3933-3941.
- [42] 钟田雨, 郭永, 张小康, 等. 基于数字 PCR 技术平台的新型冠状病毒超敏定量检测试剂盒的试制[Z]. 江西, 赣南医学院第一附属医院, 2020-05-13.
- [43] CHEN X, SONG Q, ZHANG B, et al. A rapid digital PCR system with a pressurized thermal cycler[J]. *Micromachines (Basel)*, 2021, 12(12): 1562.

(收稿日期: 2023-09-24 修回日期: 2024-01-19)