

微滴式数字聚合酶链反应在病原体检测中的研究进展

周玉麟, 刘妍, 夏勇, 郭旭光

作者单位: 510140 广东, 广州医科大学附属第三医院检验科

作者简介: 周玉麟, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学。E-mail: 3503248511@qq.com

通信作者: 郭旭光, 医学博士, 副教授, 副研究员, 副主任技师, 博士研究生导师, 研究方向: 临床微生物学检验。E-mail: 44303291@qq.com



郭旭光, 医学博士, 副教授, 副主任技师, 副研究员, 医师, 广州医科大学硕士研究生导师, 博士研究生导师, 博士后合作导师, 广州市高层次人才青年后备人才, 广州市高层次卫生人才医学骨干人才, 广州医科大学附属第三医院毅文人才工程启航计划培养对象、精英人才第二、三层次培养对象, 临床微生物实验室组长。目前学术任职: 首届全国细菌耐药监测学术委员会青年委员会委员、中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会委员、广东省医学会细菌感染与耐药防治分会第一届常务委员。主持国家自然科学基金等各级各类科研项目 18 项; 指导学生获得国家级等各级科研项目 10 余项。发表学术论文 113 篇, 其中以第一作者

或通信作者发表 SCI 收录论文 68 篇, H 指数 14, 被引用次数 4 420。申请国家发明专利 11 项, 获得授权 3 项; 申请实用新型专利 1 项, 获得授权 1 项; 申请国际 PCT 专利 1 项。参编国际指南 1 项, 参编参译学术专著 3 部。在国际学术会议上进行英文大会发言 2 次; 获 Asian Pacific Society of Respirioly Travel Award 1 次, 广东医学科技奖三等奖 1 项。

[摘要] 聚合酶链反应是一种分子生物学技术, 用于使某些脱氧核糖核酸(DNA)片段扩增, 它是一种常见且不可或缺的技术, 已应用于许多领域, 特别是在临床实验室中。第三代聚合酶链反应, 微滴式数字聚合酶链反应(ddPCR), 是常规聚合酶链反应方法的生物技术改进, 可用于直接定量和克隆扩增 DNA。ddPCR 现在广泛用于低丰度核酸检测, 可用于感染性疾病的诊断。该文介绍了 ddPCR 检测手段的发展及原理, 总结了其在病毒性、细菌性和真菌性疾病临床诊断中的潜在优势; ddPCR 对低丰度病原体的检测更灵敏、准确、可重复, 可能在未临床应用中是比定量聚合酶链反应更好的选择。

[关键词] 微滴式数字聚合酶链反应; 病原体; 研究进展

[中图分类号] R 446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)10-0914-07

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.10.05

Research progress of droplet digital PCR in pathogen detection ZHOU Yu-lin, LIU Yan, XIA Yong, et al.

Department of Laboratory Medicine, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong 510140, China

[Abstract] Polymerase chain reaction(PCR) is a molecular biology technique used to amplify certain fragments of deoxyribonucleic acid(DNA). It is a common and indispensable technique that has been used in many fields, especially in clinical laboratories. Droplet digital polymerase chain reaction(ddPCR) is a third-generation PCR, which is a biotechnology obtained by improving the conventional PCR method, and can be used to directly quantify and clonally amplify DNA. Droplet digital PCR is now widely used for low-abundance nucleic acid detection, which can be used for the diagnosis of infectious diseases. This paper introduces the development and principle of ddPCR detection means, summarizes its potential advantages in the clinical diagnosis of viral diseases, bacterial diseases and fungal diseases, and draws the conclusion that ddPCR is more sensitive and accurate and repeatable for the detection of low-abundance pathogens, and may be a better choice than quantitative PCR in future clinical applications.

[Key words] Droplet digital polymerase chain reaction(ddPCR); Pathogen; Research progress

感染性疾病是临床上常见疾病,其快速、明确地诊断病原体有助于提高诊疗效果。近几年,在多种感染性疾病中,病原体定量检测被证明对疾病的预后和监测治疗有重要作用。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, rt-qPCR)作为二代核酸检测方法,已在实验室及临床被广泛使用。但由于很多因素都会影响 rt-qPCR 的效率,因此 rt-qPCR 的准确度和精密度可能会有很大的差异。rt-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^[1]。虽然 rt-qPCR 已被广泛应用于血清、脑脊液和组织样本的检测,但其灵敏度、准确性和可复制性仍不令人满意。第三代聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR),微滴式数字聚合酶链反应(droplet digital PCR, ddPCR),是对传统 PCR 方法的生物技术改进,用于直接量化和克隆扩增 DNA。目前广泛应用于低丰度核酸检测,可用于感染性疾病的诊断^[2]。ddPCR 相较于定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR),其优势是绝对定量的,不需要标准曲线,而且高度可复制的,也不需要极低浓度下的模板进行预富集。ddPCR 通过直接计数阳性孔来计数绝对 DNA 数量,这在不同的检测中提供了更好的可比性结果^[3]。总的来说,ddPCR 通常具有更高的灵敏度、更好的准确性和更稳定的性能。近几年的报告确实显示了 ddPCR 在临床诊断中的应用潜力^[3-4]。因此,将 ddPCR 用于临床研究,对正确诊断和有效治疗具有巨大的优势。其在病原体检测中应用广泛,可用于细菌、真菌、原虫和病毒的快速检测。现将 ddPCR 技术的发展、原理、优势及在病原微生物检测中的具体应用综述如下。

1 ddPCR 的发展及原理

1992年,Sykes 最先提出了 ddPCR 的概念,它是通过将泊松分布和稀释模板结合到单分子水平来定量 DNA 分子。ddPCR 的原理是将与 Taqman 实验相似的传统 PCR 混合物,通过加入微孔板、毛细血管或油乳稀释成更小的反应体系^[5]。然后这些小的反应体系会单独运行,运行结束后,对所有反应中的阳性反应进行检查和统计。利用小数的泊松定律,模板的数量与阳性反应系呈正相关,从而可以计算出模板的确切拷贝数。近几年报道 ddPCR 适用于检测低浓度 DNA 且应用范围广泛,如检测病原体、基因突变、基因拷贝数表达变异、mRNA 表达水平和 DNA 修饰等^[2]。如今,越来越多研究证明 ddPCR 将在临床上广泛应用,其不仅在病原体检测上有特殊优势,还在肿瘤早

期相关基因筛查及肿瘤复发风险预测、产前诊断等领域具有潜在优势。

2 ddPCR 的优势

2.1 更高的精密度和灵敏度 在精准医学的要求下,对病原体核酸的精确测量越来越重要。目前临床上应用广泛的 qPCR 通过测量 PCR 扩增物来评估 DNA 的数量在一定时间点(周期阈值、CT)的荧光信号,将模板分为单个的反应系统,然后在单个孔和 DNA 中进行过渡 PCR,可通过直接计数 PCR 阳性率进行 DNA 定量。传统的 qPCR 通过将样本的 CT 值与定义明确的样本生成的标准曲线进行比较来定量样本。因此,qPCR 通过一种“模拟”方法来确定样品的浓度。利用信号的存在和缺失来指示目标 DNA,使样本的“数字”直接测量。相较于 qPCR,ddPCR 的优势是其测量是绝对定量的,不需要标准曲线,不是通过“模拟”方式得到最终结果,因此结果是高度可复制的^[3-4]。由于样品制备和 PCR 条件的多样性,即使有一个标准曲线显示,qPCR 的数据多样性仍高于 ddPCR,这导致结果的精密度下降。ddPCR 通过直接计数阳性孔来计数绝对 DNA 数量,这在不同的检测中提供了更好的可比性结果。qPCR 的灵敏度因使用的样本类型而差异很大^[6],ddPCR 具有较高的灵敏度,不需要对极低浓度下的模板进行预富集^[3],因为 ddPCR 将样本分成若干个小 PCR 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灵敏度,也有实验用于对低浓度的样本进行检测,获得了理想的检测效果^[7]。

2.2 更高的重复性及通用性 ddPCR 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,重复性高^[8]。因此 ddPCR 可用于常规 qPCR 所需的标准品定量,具有计量学意义。ddPCR 通用性强,适用样本广泛,ddPCR 技术正在各种生物液体中进行研究,例如脑脊液、尿液、粪便、眼液、痰液、唾液、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、血清黏蛋白液、腹膜液、细针吸液、胆汁或胰液等。高重复性及高通用性也为其将来运用于临床上提供了更大的可能性。

2.3 更高的抗干扰能力和稳定性 靶 DNA 的区室化相对于其他基因通过放大靶基因信号来提高信噪比^[9]。在正常的批量 PCR 中,抑制剂或过多的背景 DNA(噪音)会影响扩增效果。ddPCR 通过增强对 PCR 抑制剂的耐受性,可以帮助评估一些易被抑制的病毒感染的样本,包括粪便、痰和组织,以及无需通过 RNA

分离可实现病毒核酸的直接定量。即使在存在抑制剂的情况下,无需核酸纯化的直接病毒定量将最大限度地降低成本并改善病毒的鉴定^[10]。Pavšič 等^[11]的研究显示,病毒的直接定量与临床样本中准确的病毒载量具有良好的相关性。在 ddPCR 中,作为二元系统,通过计数阳性和阴性荧光液滴的数量来获得绝对定量。由于液滴 PCR 是一种终点测量,液滴通常被明确标记为荧光的阳性或阴性形式,并且识别含有 DNA/RNA 病毒的液滴更不容易出错。而在 qPCR 中,作为模拟系统,荧光信号与复制的 DNA 量成比例增加,结果会受反应的 DNA 浓度影响。因此与 qPCR 方法相比,液滴 PCR 对反应效率及反应背景的依赖性较小,受反应条件影响小,抗外界干扰能力强。有研究表明,与 qPCR 相比,在样本 DNA 浓度不定及存在抑制剂情况下,ddPCR 检测对于定量的抗干扰能力及稳定性更好^[12]。

3 ddPCR 应用于病原体检测的范围

3.1 病毒学检测 近年来,ddPCR 技术的使用率在病毒性疾病诊断中逐渐上升。ddPCR 技术对于检测低病毒载量样本具有优势,对于病毒的诊断性能及分析性能也较强,有望成为临床实验室中一种强大的诊断方法。例如识别和检测病毒、病毒载量测定、单拷贝病毒基因组分析、单核苷酸多态性和病毒-宿主相互作用^[13-14]。虽然 ddPCR 仍处于早期阶段,与其他常规方法相比,具有更高的灵敏度和特异度,检测的窗口期更短,意味着能早期明确诊断疾病,为临床治疗带来福音,为疾病防控争取时间。此外,在检测病毒感染疾病中,ddPCR 在判断疾病严重程度、监测病程、预测治疗效果及预后方面也发挥着重要作用。在这里,我们列举了一些例子来说明 ddPCR 在快速准确地检测病毒病原体方面的优势。

3.1.1 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 于 2020 年宣布新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 为全球大流行病。及时准确地检测 SARS-CoV-2 是有效控制这一流行病的第一步。此外,有证据表明 SARS-CoV-2 病毒载量在患者住院期间会波动^[15],而更高的 SARS-CoV-2 水平与疾病严重程度和死亡率增加有关^[16]。同时,SARS-CoV-2 病毒载量水平与其在接种疫苗和未接种疫苗个体中的传播率密切相关^[17]。值得注意的是,病毒载量水平可用于预测患者对治疗的反应。因此准确检测病原体 SARS-CoV-2 对于防控 COVID-19 流行和疾病治疗至

关重要。目前定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 被 WHO 和疾病预防控制中心视为诊断 SARS-CoV-2 的参考标准测试。然而,它的局限性促使人们采用更准确的检测方法检测 SARS-CoV-2,量化其水平和评估预后。大多数研究报告称,在检测和量化 SARS-CoV-2 水平方面,ddPCR 比 RT-qPCR 诊断更准确,尤其是在病毒载量低的患者中。ddPCR 还被发现在量化住院患者的 SARS-CoV-2 RNAemia 水平、监测病程和预测其对治疗的反应方面非常有效^[18]。这些发现表明,ddPCR 可以作为 SARS-CoV-2 检测工具的补充或替代工具,具有良好的诊断、预后和治疗价值,尤其是在医院环境中。但仍需要进一步的研究来对其实验室方案进行标准化,并准确评估其在监测 COVID-19 治疗反应和识别 SARS-CoV-2 新兴变体中的作用。越来越多的证据表明,ddPCR 对 SARS-CoV-2 RNA 血浆水平的动态监测与疾病状态(进展或缓解)和对治疗的反应相关。值得注意的是,有研究表明,患者血浆中较高水平的 SARS-CoV-2 RNA 与疾病进展具有较高的相关性^[19]。Szwebel 等^[20]的研究揭示了 ddPCR 能够通过检测升高的 SARS-CoV-2 RNA 血浆水平来预测患者的病情恶化,表明 ddPCR 可用于监测 COVID-19 疾病的病程且从血浆中清除病毒有助于患者的临床康复。其研究表明 ddPCR 能够在 74% 的住院 COVID-19 患者中检测到 SARS-CoV-2 RNA 血症,而就诊时 RNA 血症的存在与疾病严重程度、住院时间延长、疾病进展和肺外并发症有关^[20]。由此表明,ddPCR 是一种高性能模式,对 COVID-19 患者具有潜在的诊断、预后和治疗价值。但其也有不足之处,ddPCR 的灵敏度在不同样本来源之间存在差异,鼻咽拭子中的阳性检出率最高,因此需要进一步关注 ddPCR 在不同样本中的诊断性能。

3.1.2 人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 导致获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 的 HIV 在初次感染期间会引起 CD4⁺ T 细胞的大量损失,这与一般流感没有明显差异^[2]。CD8⁺ T 细胞随后被激活,同时产生抗 HIV 抗体,如 p24 抗体,用作 HIV 感染的临床标志物。由于 HIV 原发感染期和无症状潜伏期有流感样症状,直到晚期 HIV 感染发生机会性感染,患者就医后才被诊断出 HIV 感染。血清学方法在初级或潜伏期有用,但是其难以成为高危人群的日常测试^[21]。基于 qPCR 的方法广泛用于 HIV 检测,包括线性拷贝 DNA (complementary DNA, cDNA)、2-LTR 环和整合

HIV DNA^[22]。自2012年以来,有研究证明 ddPCR 可用于检测总 HIV DNA、2-LTR 环和病毒 RNA^[23]。使用 ddPCR 检测血浆 HIV RNA 可以更好地早期诊断 HIV 感染。与 qPCR 相比,ddPCR 在通过总 HIV DNA 和 2-LTR 环确定疾病进展和抗病毒治疗效果中的应用显示出更高的灵敏度和准确性^[24-26]。ddPCR 还可通过测量 CCL4L 的拷贝数来预测 HIV 感染和疾病进程的结果,CCL4L 编码 CCR5 的配体并作为 HIV 感染的抑制剂^[27]。但在检测 HIV 病毒载量时,仍有一些无法解释的假阳性事件被报告^[28]。显然,通过个性化检测,ddPCR 将成为诊断 HIV 的强大而有效的平台。WHO 报告称,截至2018年底,全球有3 790万人被诊断出感染 HIV,其中62% (2 330万人)正在接受抗逆转录病毒治疗。根据 WHO 指南,抗病毒治疗旨在减少病毒的拷贝数低于1 000 copies/ml^[29]。病毒载量监测是验证抗逆转录病毒治疗效果的推荐筛查方法^[30]。虽然 ddPCR 在 HIV 检测及治疗监测上都有重要意义,但其在 HIV 病毒载量中的应用仍存在争议,需要更多的实验研究去证明其具有灵敏性和稳定性等优势,才能普遍应用于诊断实验室。

3.1.3 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 病毒性肝炎乙型肝炎是由 HBV 引起的传染病,通过接触受感染的血液或体液传播。大多数慢性病患者没有症状,然而有些患者最终会发展成肝硬化和肝细胞癌。对早期感染 HBV 的患者进行可靠诊断可以有效防止患者病情恶化。乙型肝炎抗原或抗体是现代医院诊断 HBV 感染最常见的生物标志物。乙型肝炎表面抗原 是 HBV 感染期间第一个可检测到的病毒抗原,但它可能既不存在于感染早期,也不存在于感染后期,因为宿主免疫系统一直在持续清除它^[2]。因此,需要一种可用于改善 HBV 检测的新颖、灵敏且特异的检测手段。ddPCR 为肝炎病毒核酸的鉴定和定量提供了新的视野。ddPCR 的使用为监测接受联合治疗的肝炎感染者提供了一种有前景的方法。ddPCR 是一种强大的检测工具,甚至可以测量低至一个拷贝的 HBV DNA^[31-32],其低检测限和定量限分别为 0.8 拷贝/ 10^5 个细胞和 3.8 拷贝/ 10^5 个细胞;而对于 qPCR 相应的检测指标分别为 19.1 拷贝/ 10^5 个细胞和 71.1 拷贝/ 10^5 个细胞。根据欧洲肝脏研究协会 (European Association for the Study of the Liver, EASL) 2017 临床实践指南,治疗期间的病毒学应答被定义为无法检测到的 HBV DNA,其检测限为 10 IU/ml^[33],这是传统检测方法可检测到的最低实际值。HBV 的共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA),

已成为隐匿性乙型肝炎病毒感染 (occult hepatitis B virus infection, OBI) 和肝细胞癌的新型预后生物标志物。所有 HBV RNA 分子均来源于 cccDNA,其存在于慢性 HBV 感染患者的肝细胞中。ddPCR 可以提高 HBV DNA 的 DNA 检测限,且线性度较高^[31,34]。和其他病毒相似,通过 RT-ddPCR 和 RT-qPCR 检测 HBV RNA 拷贝数证明了高度的线性和定量相似性。越来越多的证据表明,ddPCR 是一种高度准确的技术,其精准度和重现性较传统的 qPCR 方法更高。对此进行进一步优化仍然需要确定该方法对低病毒载量临床样品的性能,特别是在 OBI 和细胞治疗方法中的性能,这也将为 HBV 感染的诊断与治疗带来巨大前景。

3.1.4 其他病毒 ddPCR 超灵敏技术是一种通用的方法,除了上述病毒以外,还可以用于检测其他病毒,如巨细胞病毒、流感病毒等。ddPCR 对于低病毒载量的巨细胞病毒样本具有很好的检测效果,因其灵敏度与特异度高,且对于错配引物的抵抗力强,也具有较高的重复性^[35]。流感病毒是临床上常见的病毒,使用 ddPCR 去检测流感病毒技术也很成熟,尤其是最近开发了一种具有成本效益的六重 ddPCR 来检测甲型流感病毒 (H1、H3 和 M) 和乙型流感病毒 (Yamagata HA、Victoria HA 和 M) 单一反应混合物中的片段,推动了快速检测领域的发展^[35]。ddPCR 开辟了病毒检测的新领域,随着技术的不断发展,之后也会用于更多类型的病毒检测。

3.2 细菌学检测 细菌是许多疾病的病原体,可以通过多种方式在正常人体间传播,具有较强的传染性,对社会危害很大,所以从可疑样本中快速准确地检测致病细菌至关重要。然而,传统的基于培养的细菌检测方法时间周期较长,需要更快速的方法来进行检测。目前已经开发了多种诊断技术,特别是基于 PCR 的方法可快速检测病原体。目前应用于检测的常用 PCR 的方法主要有普通 PCR、rt-qPCR 及多重 PCR,普通 PCR 及 rt-qPCR 早已被广泛接受。而相比于普通 PCR 及 rt-qPCR,多重 PCR 能够同时检测多个基因的特点,曾引起广泛关注,但其受到引物及靶标设计等诸多因素影响,限制了其发展^[36]。因常用的 PCR 方法检测细菌的局限性,近几年开发了 ddPCR 以寻求更灵敏、准确及可重复的检测方法。早在 2017 年,就已经有研究组开发了多重单完整细胞 ddPCR 检测技术来检测肠出血性大肠杆菌,这是在单个完整细菌细胞内检测两个遗传靶标的新方法,包括肠出血性大肠杆菌的志贺毒素 stx 和紧密素 eae。将此技术应用于富集培养筛选可以减少假阳性的出现,提高了食品中

肠出血性大肠杆菌检测方法和准确性,降低了检测成本。然而,此研究方法只有双遗传靶标,而且扩增效率较低。之后,Lei等^[37]开发了一种基于 *tlh*、*tdh* 和 *ureR* 基因引物和探针序列的三重 ddPCR 方法,用于对副溶血性弧菌细胞进行检测和基因分型。而后,在此基础上更是建立了一种四重 ddPCR 方法,可以同时检测食品样品中的 *tlh*、*tdh*、*ureR* 和 *orf8* 基因,用于检测具有单个完整细胞的副溶血性弧菌。将这些基因的 4 个探针用 2 种荧光染料标记,探针浓度按比例分布形成 16(2⁴) 簇,从而明确显示和量化含有 1 个/2 个/3 个/4 个特定基因的液滴,对应于单个完整细菌细胞的基因类型。该四重 ddPCR 测定的灵敏度为 39 CFU/ml,灵敏度与传统的平板计数一致,并且比 qPCR 的灵敏度高 10 倍。因此,此四重 ddPCR 方法可以快速准确地检测副溶血性弧菌(包括大流行组菌株),且特异性强、灵敏度高,可用于多种样品中副溶血性弧菌的分化,并为检测其他细菌提供一种新的方法^[38]。之后,更有研究建立了一种多重 ddPCR 方法,可以同时检测 5 种高风险细菌,包括鼠疫耶尔森菌、炭疽芽胞杆菌、布鲁氏菌、类鼻疽伯克霍尔德菌以及土拉弗朗西斯菌。多重检测结果表明,该方法对于 5 种细菌的检测限较低(0.1 ~ 1.0 pg/μl),且特异度高。同时,由于某些菌株中可能不存在质粒,这项研究建立的多重 ddPCR 测定主要集中在染色体上的基因(单拷贝基因)而不是 5 种细菌的质粒基因^[39]。除此之外,ddPCR 检测技术可以对呼吸道标本中结核分枝杆菌进行鉴定及定量,大大改善了涂片检测结核分枝杆菌的诊断^[40];还可以对感染样品中的“亚洲念珠菌”和柠檬螺旋体进行绝对定量和检测^[41];也可以双重检测黄杆菌属及鲁氏耶尔森菌,用于监测水样中的病原体水平^[42]。之后,更有研究人员在此基础上建立了一种四重复合物测定法,包括新西兰立克次氏体类生物体 1(New Zealand rickettsia-like organism 1, NZ-RLO1)、新西兰立克次氏体类生物体 2(New Zealand rickettsia-like organism 2, NZ-RLO2)、海洋屈挠杆菌和鲁氏耶尔森菌,为水产养殖提供了一种快速高效的病原体筛选工具^[43]。

3.3 真菌学检测 真菌培养是目前鉴定真菌的普通方法,而随着分子生物学的出现,真菌的检测技术有了很大的发展。PCR 检测技术极大地提高了常见致病真菌的检测速度,且特异性较好,敏感度较高。近年来,快速发展的 ddPCR 检测技术也在真菌的鉴定中发挥了巨大的作用。(1)念珠菌是常见的一种真菌,在发病率增高的同时死亡率也逐年增加,对此侵

袭性真菌感染的快速准确诊断有助于感染患者的早期治疗和改善预后。传统的血培养方法周期过长,而在感染后临床通常经验性使用广谱抗生素,这会增加一些不必要的成本以及不良预后。Chen等^[44]通过分析感染小鼠和疑似念珠菌血症患者的血液样本,来评估 ddPCR 方法在体外和体内检测念珠菌 DNA 的敏感度和特异度。结果表明,ddPCR 对念珠菌 DNA 检测的敏感度和特异度均高于传统培养和 qPCR 方法,且重现性好。因此,ddPCR 测定有可能是及时诊断念珠菌血症的有效方法,可以用于监测念珠菌血症的治疗。(2)耶氏肺孢子菌是一种人类特异性机会性真菌,可引起肺孢子虫肺炎,是 HIV 患者常见的机会性感染病原体。但由于耶氏肺孢子菌无法培养,因此确诊需要通过染色法来检测鉴定病原体或者通过呼吸道标本的 PCR 检测,但这些方法都很可能受到病原体载量的影响。有研究开发了一种 ddPCR 方法来检测呼吸道标本中的耶氏肺孢子菌并评估其敏感性。ddPCR 与 qPCR 这两种方法都可以检测耶氏肺孢子菌 DNA,但相较于后者来说,前者对病原体载量较低的标本显示出更好的敏感性^[45]。尽管 ddPCR 具有很多优点,但这两项研究都仅使用一个靶标来评估 qPCR 与 ddPCR 测定的性能。(3)烟曲霉菌和土曲霉菌在支气管扩张症等慢性呼吸道疾病状态中具有重要的作用,目前大多数可用的曲霉菌相关诊断试剂盒不能专门检测生物样品中的烟曲霉菌和土曲霉菌,通常采用全曲霉菌方法的引物和探针,但会在几种曲霉菌物种之间发生交叉反应。该研究开发了双重 TaqMan 引物和探针来评估 ddPCR 技术检测正常及患病人群的呼吸道标本。虽然 qPCR 和 ddPCR 这两种方法都能检测烟曲霉菌和土曲霉菌,但结果表明,相较于 qPCR,ddPCR 对检测这两种曲霉菌具有更高的敏感性,并且对 PCR 抑制更具有抵抗力,尤其在土曲霉菌丰度很低的情况下更加明显^[46]。除上述真菌外,ddPCR 检测技术能联合检测大丽轮枝菌及甘蓝轮枝菌,其准确性及灵敏度都高于 qPCR^[47];还可以分析黄曲霉毒素和非黄曲霉毒素菌株的竞争和相互作用机制^[48];还能检测面包上的异常威克汉姆酵母菌和扣囊复膜酵母菌,灵敏度高,可以用来监测面包质量^[49]。

4 前景与展望

ddPCR 是常规 PCR 方法的生物技术改进,作为一种新技术,近几年发展越来越成熟,应用越来越广泛。其有着高效的诊断性能,有其独特的优势,可用于直接定量和克隆扩增 DNA,对感染性疾病的诊断、病情监测及预后评估有重要作用。尽管如此,ddPCR

在感染性病诊断中还没有实际应用于临床,需要更多的临床样本来测试 ddPCR 的性能。最重要的是,与 qPCR 相比,ddPCR 机器和试剂的成本相对较高,这使得它难以在医院的一般实验室中普及。未来,当 ddPCR 检测成本下降时,其在医院和实验室中的应用将会越来越多。

参考文献

- [1] Kuypers J, Jerome KR. Applications of digital PCR for clinical microbiology[J]. *J Clin Microbiol*, 2017,55(6):1621–1628.
- [2] 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.
- [3] Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014,14(4):501–507.
- [4] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. *Anal Chem*, 2011,83(22):8604–8610.
- [5] Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays[J]. *J Clin Microbiol*, 2004,42(12):5636–5643.
- [6] Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections[J]. *Nat Mater*, 2021,20(5):593–605.
- [7] Cao G, Tan C, Zhang Y, 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]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2019,47(4):513–520.
- [8] Tang L, Sun Y, Buelow D, et al. Quantitative assessment of commutability for clinical viral load testing using a digital PCR-based reference standard[J]. *J Clin Microbiol*, 2016,54(6):1616–1623.
- [9] Zhang Y, Qu S, Xu L. Progress in the study of virus detection methods: the possibility of alternative methods to validate virus inactivation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019,116(8):2095–2102.
- [10] Sahore V, Doonan SR, Bailey RC. Droplet microfluidics in thermoplastics: device fabrication, droplet generation, and content manipulation using integrated electric and magnetic fields[J]. *Anal Methods*, 2018,10(35):4264–4274.
- [11] Pavšič J, Žel J, Milavec M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016,408(1):67–75.
- [12] Vyawahare S, Griffiths AD, Merten CA. Miniaturization and parallelization of biological and chemical assays in microfluidic devices[J]. *Chem Biol*, 2010,17(10):1052–1065.
- [13] Kurosaki Y, Martins DBG, Kimura M, et al. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):13503.
- [14] Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, et al. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70[J]. *J Virol Methods*, 2014,207:169–177.
- [15] Pan Y, Zhang D, Yang P, et al. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples[J]. *Lancet Infect Dis*, 2020,20(4):411–412.
- [16] Fajnzylber J, Regan J, Coxen K, et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1):5493.
- [17] Pouwels KB, Pritchard E, Matthews PC, et al. Effect of delta variant on viral burden and vaccine effectiveness against new SARS-CoV-2 infections in the UK[J]. *Nat Med*, 2021,27(12):2127–2135.
- [18] Ishak A, AlRawahdeh MM, Esagian SM, et al. Diagnostic, prognostic, and therapeutic value of droplet digital PCR (ddPCR) in COVID-19 patients: a systematic review[J]. *J Clin Med*, 2021,10(23):5712.
- [19] Veyer D, Kernéis S, Poulet G, et al. Highly sensitive quantification of plasma severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA sheds light on its potential clinical value[J]. *Clin Infect Dis*, 2021,73(9):e2890–e2897.
- [20] Szwelb TA, Veyer D, Robillard N, et al. Usefulness of plasma SARS-CoV-2 RNA quantification by droplet-based digital PCR to monitor treatment against COVID-19 in a B-cell lymphoma patient[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021,17(1):296–299.
- [21] Salmona M, Delarue S, Delaugerre C, et al. Clinical evaluation of BioPlex 2200 HIV Ag-Ab, an automated screening method providing discrete detection of HIV-1 p24 antigen, HIV-1 antibody, and HIV-2 antibody[J]. *J Clin Microbiol*, 2014,52(1):103–107.
- [22] Alidjinou EK, Bocket L, Hober D. Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: a review of relevant clinical uses and laboratory methods[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2015,63(1):53–59.
- [23] Trypsteen W, Kiselina M, Vandekerckhove L, et al. Diagnostic utility of droplet digital PCR for HIV reservoir quantification[J]. *J Virus Erad*, 2016,2(3):162–169.
- [24] Bosman KJ, Nijhuis M, van Ham PM, 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*, 2015,5:13811.
- [25] De Spiegelaere W, Malatinkova E, Kiselina M, et al. Touchdown digital polymerase chain reaction for quantification of highly conserved sequences in the HIV-1 genome[J]. *Anal Biochem*, 2013,439(2):201–203.
- [26] Strain MC, Lada SM, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR[J]. *PLoS One*, 2013,8(4):e55943.
- [27] Bharuthram A, Paximadis M, Picton AC, et al. Comparison of a quantitative real-time PCR assay and droplet digital PCR for copy number analysis of the CCL4L genes[J]. *Infect Genet Evol*, 2014,25:28–35.
- [28] Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, et al. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999,60(4):687–692.
- [29] Sedlak RH, Cook L, Cheng A, et al. Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus[J]. *J Clin Microbiol*, 2014,52(8):2844–2848.
- [30] Arvia R, Sollai M, Pierucci F, et al. Droplet digital PCR (ddPCR) vs

- quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies [J]. *J Virol Methods*, 2017, 246:15–20.
- [31] van den Berg FT, Makoah NA, Ali SA, et al. AAV-mediated expression of broadly neutralizing and vaccine-like antibodies targeting the HIV-1 envelope V2 region [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 14:100–112.
- [32] Anderson EM, Simonetti FR, Gorelick RJ, et al. Dynamic shifts in the HIV proviral landscape during long term combination antiretroviral therapy: implications for persistence and control of HIV infections [J]. *Viruses*, 2020, 12(2):136.
- [33] Bejarano DA, Puertas MC, Bömer K, et al. Detailed characterization of early HIV-1 replication dynamics in primary human macrophages [J]. *Viruses*, 2018, 10(11):620.
- [34] Pasternak AO, Berkhout B. What do we measure when we measure cell-associated HIV RNA [J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1):13.
- [35] Kojabad AA, Farzanehpour M, Galeh HEG, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(7):4182–4197.
- [36] 李子尧, 鲁炳怀. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及其分子检测 [J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(3):256–261.
- [37] Lei S, Gu X, Zhong Q, et al. Absolute quantification of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex droplet digital PCR for simultaneous detection of *tlh*, *tdh* and *ureR* based on single intact cell [J]. *Food Control*, 2020, 114.
- [38] Lei S, Gu X, Xue W, et al. A 4-plex droplet digital PCR method for simultaneous quantification and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* based on single intact cells [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:1727.
- [39] Du Y, Yan Z, Song K, et al. Development and evaluation of a multiplex droplet digital polymerase chain reaction method for simultaneous detection of five biothreat pathogens [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:970973.
- [40] Zhao Z, Wu T, Wang M, et al. A new droplet digital PCR assay: improving detection of paucibacillary smear-negative pulmonary tuberculosis [J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 122:820–828.
- [41] Maheshwari Y, Selvaraj V, Godfrey K, et al. Multiplex detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and *Spiroplasma citri* by qPCR and droplet digital PCR [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3):e0242392.
- [42] Lewin AS, Haugen T, Netzer R, et al. Multiplex droplet digital PCR assay for detection of *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri* in Norwegian aquaculture [J]. *J Microbiol Methods*, 2020, 177:106044.
- [43] von Ammon U, Averink T, Kumanan K, et al. An efficient tetraplex surveillance tool for salmonid pathogens [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:885585.
- [44] 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.
- [45] Yi J, Wang N, Wu J, et al. Development of a droplet digital polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory tract specimens [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8:761788.
- [46] Poh TY, Ali NABM, Chan LLY, et al. Evaluation of droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the absolute quantification of *Aspergillus* species in the human airway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3043.
- [47] Wang D, Jiao X, Jia H, et al. Detection and quantification of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* by droplet digital PCR versus quantitative real-time PCR [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:995705.
- [48] Schamann A, Schmidt-Heydt M, Geisen R. Analysis of the competitiveness between a non-aflatoxigenic and an aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strain on maize kernels by droplet digital PCR [J]. *Mycotoxin Res*, 2022, 38(1):27–36.
- [49] Cremonesi P, Garofalo C, Picozzi C, et al. Development of quantitative real-time PCR and digital droplet-PCR assays for rapid and early detection of the spoilage yeasts *Saccharomycopsis fibuligera* and *Wickerhamomyces anomalus* in bread [J]. *Food Microbiol*, 2022, 101:103894.

[收稿日期 2022-09-28] [本文编辑 吕文娟 余 军]

本文引用格式

周玉麟, 刘 妍, 夏 勇, 等. 微滴式数字聚合酶链反应在病原体检测中的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2022, 15(10):914–920.