

• 综 述 •

数字聚合酶链式反应在临床诊断中的应用研究进展

陈伶行^{1,2}, 陈琳³, 周华^{1,2△}

(1. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310000; 2. 浙江大学医学院附属第一医院呼吸内科, 浙江 杭州 310000; 3. 宁波市第二医院感染科, 浙江 宁波 315000)

[摘要] 数字聚合酶链式反应(dPCR)是继第一代普通聚合酶链式反应(PCR)和第二代荧光定量 PCR(qPCR)之后的第三代核酸检测技术,具有检测周期短、灵敏度高、优势。dPCR 既往研究主要应用在环境和农业相关检测。随着近些年新型冠状病毒感染疫情流行,越来越多研究关注 dPCR 在疾病诊断与预后方面的作用,此后该技术在感染性疾病、寄生虫疾病和肿瘤中均有研究。该文综述了 dPCR 在上述疾病诊断中的应用现状,以及与其他检测方法进行比较,同时总结 dPCR 在诊断疾病方面目前存在的问题及展望未来发展,供同行参考。

[关键词] 数字聚合酶链式反应; 临床诊断; 感染性疾病; 肿瘤; 遗传性疾病; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.04.041 **中图法分类号:**R446

文章编号:1009-5519(2025)04-1010-05 **文献标识码:**A

Application research progress of digital polymerase chain reaction in clinical diagnosis

CHEN Lingxing^{1,2}, CHEN Lin³, ZHOU Hua^{1,2△}

(1. Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, The First Hospital Affiliated Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310000, China; 3. Department of Infectious Diseases, Ningbo Second Hospital, Ningbo, Zhejiang 315000, China)

[Abstract] Digital polymerase chain reaction(dPCR) is the third generation of nucleic acid detection technology following the first generation of conventional polymerase chain reaction(PCR) and the second generation of fluorescent quantitative PCR(qPCR). It boasts advantages such as a short detection cycle and high sensitivity. Previous research on dPCR was primarily focused on environmental and agricultural-related detections. With the prevalence of the COVID-19 pandemic in recent years, an increasing number of studies have highlighted the role of dPCR in disease diagnosis and prognosis. Since then, this technology has been studied in infectious diseases, parasitic diseases, and tumors. This article reviewed the current status of dPCR in the diagnosis of the aforementioned diseases and compared it with other detection methods. Additionally, it summarized the current issues with dPCR in disease diagnosis and outlines the future development prospects for reference by peers.

[Key words] Digital polymerase chain reaction; Clinical diagnosis; Infectious diseases; Tumors; Genetic diseases; Review

数字聚合酶链式反应(dPCR)技术具有高通量、高灵敏度、低试剂消耗、低交叉污染和绝对定量能力等优点,在环境或食品领域进行单细胞分析、临床疾病诊断和病原体检测方面具有一定优势。本文综述了 dPCR 的在各种疾病诊断中应用的研究进展。尽管 dPCR 要像荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)一样普遍使用存在一些挑战,但随着更成熟的新技术的发展,这些缺点将被克服。

1 dPCR 发展历史及现状

聚合酶链式反应(PCR)由 MULLIS 于 1980 年代发明。从第一代基于凝胶的常规 PCR^[1-2]到第二代

qPCR,最后到第三代 dPCR。“dPCR”一词于 1999 年在论文中首次出现,作者通过对样品进行重新分配来定量样本中的 RAS 基因突变,以便在 384 孔微孔板中进行一系列 PCR。但 SAIKI 学者却是使用 dPCR 技术的第一人^[3]。他通过限制样本中含有 β -珠蛋白基因的稀释浓度,证明单个珠蛋白分子可以被扩增和被检测。当进行泊松分布分析时,使用正趋势扩增的频率表明,几乎每个珠蛋白分子都可以通过 PCR 扩增。因此,他们是第 1 个使用 PCR 来分离和分析单个分子的团队,但他们没有在此方向上进行概念化,而是使用单个分子的检测频率作为定量工具^[4]。

△ 通信作者, E-mail: zhouhua1@zju.edu.cn.

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250319.1038.020\(2025-03-19\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250319.1038.020(2025-03-19))

从广义上讲,经典 PCR 方法常用于定性或定量,用于研究目标分子的性质或确定目标分子的数量。dPCR 将样品分割到单个分子的水平,随后进行 PCR 扩增,获得全有或全无(即数字 1,0)信号,并通过分析目标分子的性质或使用泊松分布计算目标分子的数量^[5]。与 qPCR 不同,dPCR 不依赖于校准曲线进行样品定量。dPCR 在理论上效率优于 qPCR,因为其可以有效地进行样品分配和单分子的靶标扩增。在临床实践中,qPCR 灵敏度更高,因此在特定应用中仍能胜过 dPCR。目前,已经开发了各种商业化的 dPCR 平台,具有不同的技术特点:基于微流控室(BioMarkdPCR,Fluidigm,Boise,ID,USA)、基于微孔芯片(QuantStudio3D dPCR,Life Technologies,Carlsbad,CA,USA)、基于微滴(ddPCR QX100 和 QX200,Bio-Rad 和 RainDrop,RainDance),以及微信道和基于微滴的晶体数字 PCR(NAICA 系统,Stilla)^[4]。作者查找文献中发现,在临床研究中使用最多的为 ddPCR。

2 dPCR 在细菌性感染中的应用

致病菌感染对个人还是公共社会造成严重负担。细菌的早期检测对预防疾病至关重要。迄今为止,dPCR 技术已经在包括食源性致病菌在内的多种细菌检测中得到了应用,如大肠杆菌、幽门螺杆菌、肺炎球菌、金黄色葡萄球菌和结核分枝杆菌等。dPCR 检测大肠杆菌 DNA 研究对象是饮用水和食物等农业和环境领域,故本文不再详述。在临床感染中,结核病(TB)是由结核分枝杆菌(MTB)引起的传染性疾病,具有高发病率、高传染性和高死亡率的特点,是全球重要的传染病杀手。与实时荧光定量 PCR 方法相比,dPCR 可以检测 TB 患者全血样本中低水平循环 MTB DNA 的潜在替代方法。除了 dPCR 在诊断中的重要作用外,在抗结核治疗中,早期诊断和药敏试验同样重要。LUO 等^[6]使用联合培养法和微滴式数字 PCR(dPCR)从痰液中快速检测耐多药结核病(MDR-TB)和 MTB,灵敏度可以达到 95.7%[95%可信区间(95%CI)80.0~99.2]。同时,ZHANG 等^[7]证实了在疑似 TB 活动的 236 例患者中,发现 dPCR 相比于宏基因组学下一代测序(mNGS)具有更好的敏感性(99%vs. 86%)。肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)是一种荚膜的革兰阴性杆菌,可引起人类尿路感染、肺炎、血流感染和败血症。在粪便样本中,dPCR 要比 qPCR 和传统微生物培养在检测疑似肺炎克雷伯菌患者时具有更好的特异性^[8]。目前,针对呼吸系统感染患者早期诊断与耐药,如耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌^[9],具有部分临床证据能够证明 ddPCR 在诊断细菌一致性和特异性上具有优势^[10]。但是仍需要更多的临床样本量来支持 dPCR 在检测临床细菌感染中的优势。

3 dPCR 在病毒性感染中的应用

病毒的特性使其成为人类生命健康的主要威胁

之一,几千年来,人们一直在与病毒作斗争。病毒是大多数通常只有一种核酸(DNA 或 RNA)作为其遗传物质。病毒在宿主中具有潜伏期,离开宿主后可以在环境中存活数天至数月,使其成为传染病的重要来源。近年来,随着检测技术的进步,dPCR 在病毒检测中的使用越来越多。新兴的 dPCR 技术满足了这些特点,为早期诊断提供了有用的工具。许多 dPCR 研究已用于病毒检测,特别是在人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、人乳头状病毒(HPV)和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)中,并显示出卓越的性能^[11]。

dPCR 可以检测外周血单核细胞(PBMCs)中的 HIV-DNA,病毒库和其中的 HIV-DNA 总量极少,是治疗患者疾病进展的重要参考依据。通过 dPCR 测量 HIV 病毒库已被用于测量评估早期治疗起始阶段、治疗性疫苗接种结构化治疗中断、广泛中和抗体免疫、潜伏期逆转剂和其他新型治疗药物的效果^[12]。dPCR 在使用液滴 dPCR 定量检测 HIV-DNA 或血清 miRNA 时表现出更高的精密度和更低的变异系数。患者继续接受抗反转录病毒治疗(ART)并监测 HIV-DNA 水平,确定残留的 HIV-DNA 是一项挑战。接受 ART 的儿童也是如此,他们可能在出生后早期根据母亲的 HIV 状况开始 ART,而如果病毒感染是由母亲传给孩子的,则可能存在结果差异。在这些血清阴性儿童中,HIV-DNA 是 HIV 感染的唯一证据,同时也是接受 ART 的唯一理由。然而,证明 HIV-DNA 的存在具有一定难度,因为已知在感染后早期开始 ART 后患者病毒存储库小,并且幼儿的样本量较少,这降低了 HIV-DNA 存在的检出效率。假阳性出现会导致 HIV 感染的确诊和不合理的 ART。因此,BOSMAN 等^[13]在检测是否存在 HIV-DNA 时,不建议使用 dPCR。

目前,诊断 SARS-CoV-2 感染患者的“金标准”是实时反转录定量 PCR(qRT-PCR)。虽然这种检测方式具有较好的临床效果,但其同时会受到假阴性和假阳性结果的影响,从而影响其准确度,特别是对于检测样品中的低病毒载量情况下^[14]。dPCR 已被证明在检测样本中的 SARS-CoV-2 低病毒载量方面比“金标准”qRT-PCR 更有效。这意味着 dPCR 是一种可以在较低靶标浓度下的标本中具有较高特异性的技术,并可以用作 qRT-PCR 的验证性测试或替代选择,特别是在分析低病毒载量样品时。鉴于其优点,dPCR 已被一些研究人员用于检测 qRT-PCR 阴性的 SARS-CoV-2 样本^[15]。LI 等^[16]中国学者利用 dPCR 分析了感染 SARS-CoV-2 的患者身体不同部位的临床样本,结果提示鼻咽拭子阳性检出率最高,其次是肛拭子和唾液血等体液样本,这一结论为制定 SARS-CoV-2 检测标准提供了很好的参考。目前,SARS-CoV-2 处于不断变异的过程,仍需检测和检测最近的变异体单核苷酸多态性(SNP)。ZHANG 等^[17]目前

使用肽-核酸钳辅助光热 dPCR 检测 SARS-CoV-2 变种具有很好的效果。

4 dPCR 在寄生虫疾病中的应用

dPCR 在寄生虫疾病中的主要应用以下 3 个方面:原生动物、蠕虫和节肢动物。在日常临床中,原生动物中最重要的就是疟原虫的早期诊断与治疗,传统方法是使用显微镜检及商业化快速诊断试剂盒进行检测。在急性疟疾发作期间,由于较高的寄生虫载量,传统方法具有一定的优势。但是在“慢性疟疾”和高反应性疟疾脾肿大,无症状感染情况下及需要改善疟疾流行和非流行国家的献血者疟疾筛查,传统方法具有一定的局限性。此时,高灵敏度的 dPCR 测定可能为作为检测的标本中极低寄生虫含量提供有效的方式^[18]。dPCR 同时可以给出精确的寄生虫定量结果,此外还可以通过 pfcarl 突变检测对多种抗疟化合物的耐药性^[19]。在蠕虫的研究中主要集中在人蛔虫、血吸虫病、棘球蚴病和钩端螺旋体病。早期 dPCR 主要用于农业生产和饮用水检测蠕虫类动物。后来也逐渐发展应用到动物模型的粪便、血清、尿液和唾液中^[20],对低水平的寄生虫 DNA 成分具有很高的灵敏度。还可以将 dPCR 应用于检测肺泡型棘球蚴病患者血清和粪便中的多房棘球绦虫血清游离 DNA(cfDNA),表明 dPCR 在研究 cfDNA 作为诊断绦虫感染和评估治疗效果的标志物方面具有潜在作用,尤其是其灵敏度可以达到 90.51%(95%CI 82.50%~96.92%)^[21]。在节肢动物中,dPCR 主要通过检测酶的表达情况,而这些酶是有希望成为抗寄生虫药物靶点。FERNANDO 等^[22]推测,疥螨灭活半胱氨酸蛋白酶(SMIPP-Cs)基因家族已经进化为对疥螨生活方式的适应,可以参与宿主免疫应答的控制。该研究作者开发了一种 dPCR 检测方法,用于扩增 SMIPP-Cs 家族的不同转录本。dPCR 分析能够提供有关阶段特异性 SMIPP-Cs 基因转录水平的相关信息,以及每个生命阶段的基因转录拷贝数的计算。并在感染性成年雌性生活阶段的消化系统中高度表达,这一发现可能突出了使用 dPCR 检测 SMIPP-Cs 在疥螨中的重要作用。

5 dPCR 在肿瘤诊断应用中的应用

近年来,dPCR 技术除了应用于感染性疾病的检测,基于 ddPCR 也越来越成为关注的热点。目前主要集中在三大方面研究:(1)作为寻找肿瘤患者血液中循环肿瘤 DNA(ctDNA)作为早期的检测手段;(2)某些病毒引起相关肿瘤,如 HPV 等^[23],可以检测病毒核酸含量对患者进行早期诊断与治疗;(3)可以检测某些常见的肿瘤突变基因^[24]。

目前,肿瘤研究中 ctDNA 在指导治疗决策、监测治疗反应、检测微小残留病和识别新的耐药特征方面具有较强的临床意义。因此,选择合适的检测方法尤为重要,除了常规 PCR 方法外,比较常用的便是 mNGS 测序和 dPCR 方法。在非小细胞肺癌患者中,

使用 dPCR 技术和 NGS 测序均是检测 ctDNA 有前景的检测方式。但是目前仍缺少在肿瘤早期患者中诊断准确性的比较,其可能原因有:二者在检测技术造价较高,不适用于早期筛查;目前有一些多中心研究,但是由于随访时间限制,目前无法获得这些结果。目前,dPCR 在肿瘤中残余病变检测取得了良好的效果^[25]。在宫颈癌患者中,HPV 感染的早期检测是预防早期癌症发生和影响预后的主要因素^[26],在 HPV16、18 型的患者中检测循环血液中 HPV E7 基因结果能较好地预测宫颈癌复发的发生。山东大学 LV 等^[27]设计了针对中国人高危型 HPV(HPV16、52、58、56、18、33 和 45)的 ddPCR 的检测方法,结果提示对诊断高危型 HPV 的灵敏度、特异度和准确性分别能够达到 100.0%、91.3%和 92.0%。同样在鼻咽癌患者中,使用 ddPCR 检测循环血中游离 DNA 的含量,其准确度可以达到 98.4%,特异度可以达到 98.6%^[28]。在急性髓系白血病(AML)中,FLT3 的基因突变(TKD 和 IKD)在 AML 中能够很好地反映肿瘤的残留情况,澳大利亚学者 LI 等^[29]发现,ddPCR 在检测 FLT3-TKD 突变中,其准确度与 mNGS 的效率几乎一致,同时在检测不同突变情况下这个结论仍然可靠。

6 dPCR 在遗传性疾病诊断中的应用

遗传性疾病的诊断主要是通过检测母体内血液或羊水中游离的胎儿 DNA 成分。dPCR 因其较好的灵敏度主要应用在无创产前检测。

遗传性疾病可以大致分为染色体病和基因遗传疾病两大类。染色体病(常染色体和性染色体)中主要表现为染色的数目和结构异常。常见的染色体病有 21(Down's 综合征,T21)、13-三体综合征(Patau 综合征)和 18-三体综合征(Edwards 综合征)。目前,dPCR 主要集中在染色体病异常研究,相关研究仍需要进行大规模的验证。PARSAEI 等^[30]对近些年关于染色体病 meta 分析表明,dPCR 在对 T21 检测结果的灵敏度可以达到 98%(95%CI 94%~100%),特异度可以达到 99%(95%CI 99%~100%),同时作者也指出由于其耗时短、操作相对简单可以未来代替 mNGS 技术进行诊断。dPCR 对染色体倍数改变检测主要有以下 3 个方面(以 21-三体综合征 T21 为例):(1)检测胚胎 21 染色体特异性表达的 PLAC4 mRNA 的 A/G SNP 变化;(2)相对染色体含量,例如正常胎儿中 1 号染色体/21 号染色体为 2:2,T21 中比值可能变为 2:3;(3)表观遗传—遗传比值,例如母体中 HLCS 基因呈现低甲基化,在胎儿中表现为高甲基化,使用 dPCR 技术后确定 HLCS 与 ZFY(胎儿特异性表达参照)拷贝数的比值同样可以确定 21 号染色体的相对数量^[31]。在单基因疾病的诊断中,dPCR 的原理与肿瘤领域诊断应用中的原理相似,检测的是突变位点与连锁平衡的变化。例如可以检测 FGFR3 突变位点或 RASSF1A 甲基化情况来对胎儿的软骨

发育不全进行早期诊断^[32]。目前,对诊断血友病、镰状细胞贫血、甲基丙二酸血症和感觉神经性听力损失等疾病中均有相关的临床研究^[32]。但,作者查阅相关文献后,由于遗传性疾病发病率较低,目前研究中样本量较小,因此在 dPCR 遗传性诊断疾病中需要更多的样本量来验证 dPCR 技术可靠性及其与其他方法的优势。

7 总结与展望

在过去的几十年里,dPCR 技术已经逐渐发展成为一种强大的工具,可以用来解读个体患者的遗传信息。随着近年来对精准医疗的日益关注,dPCR 技术因其对单细胞甚至单分子基因表达的精确检测而在临床治疗和生物医学研究中得到了广泛的应用。尽管同时比较 dPCR 和 qPCR 性能的深入研究数量相对有限,但需要注意的是:(1)较小的分配体积有益于 dPCR 对多种抑制剂的恢复能力;(2)dPCR 对定量相对丰度(如拷贝变异数、突变等位基因负荷)更精确;(3)dPCR 的绝对定量灵敏度较低,可能因其反应体积较小的特点。确保 dPCR 在临床环境中广泛应用的一个较强优势是其预期的技术可重复性;然而,目前 dPCR 在临床诊断和实验室间可重复性尚未得到严格评估,未来仍需要更大的样本量来进一步证实。

PCR 相关技术发展迅速,dPCR 检测机器的更新迭代也很快,但在临床中的广泛应用仍存在一些挑战。首先,dPCR 目前仪器的便利化很低。新型 dPCR 检测仪器仍然依赖于专业学术实验室中复杂而昂贵的平台,这限制了普通医生的使用。此外,对于即时应用,对于热循环模块和荧光读取单元来说,设备通常过于复杂。因此,易于操作和紧凑的机器仍然有望用于广泛的应用。未来,新兴的智能生物传感器和功能材料可以集成到 dPCR 机器中,以进一步增加模式创新。另一个问题涉及 PCR 产物的分类和收集能力,这些产物可用于进一步的测试。在 dPCR 检测中,PCR 后阳性液滴含有数百万个扩增子,可以进行分选以进一步处理,而大多数商业 dPCR 机器在测试后会丢弃所有液滴。可能是由于这些液滴会被化学物质分解并汇集在一起,但副产物或不需要的寡核苷酸会作为一种废液后大量混合在一起。因此,如果将上一步荧光激活的液滴在操作模块集成到 dPCR 中,将非常有助于提高 dPCR 的诊断效率。

综上所述,尽管存在技术挑战,dPCR 可以实现接近单细胞甚至单分子水平的精确基因检测,正是由于这个优点,远远超出了其他类似的 PCR 技术和 mNGS 技术。未来能够并在精准医疗领域完成新的应用。

参考文献

[1] MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol,

1986, 51 Pt 1: 263-273.

[2] HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(9): 1026-1030.

[3] SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. Science, 1988, 239(4839): 487-491.

[4] TAN L L, LOGANATHAN N, AGARWALLA S, et al. Current commercial dPCR platforms: technology and market review[J]. Crit Rev Biotechnol, 2023, 43(3): 433-464.

[5] ZHANG L, PARVIN R, FAN Q, et al. Emerging digital PCR technology in precision medicine[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 211: 114344.

[6] LUO J, LUO M, LI J, et al. Rapid direct drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis based on culture droplet digital polymerase chain reaction[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2019, 23(2): 219-225.

[7] ZHANG D, YU F, HAN D, et al. ddPCR provides a sensitive test compared with GeneXpert MTB/RIF and mNGS for suspected Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1216339.

[8] FENG J, CUI X, DU B, et al. Detection and quantification of Klebsiella pneumoniae in fecal samples using digital droplet PCR in comparison with real-time PCR[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(4): e0424922.

[9] ZENG Y F, CHEN C M, LI X Y, et al. Development of a droplet digital PCR method for detection of streptococcus agalactiae[J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1): 179.

[10] LU L, CHEN Y, WANG Q, et al. To evaluate the performance of simultaneous amplification and testing assay for group B streptococcus detection: comparison with real-time PCR and ddPCR assays[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2024, 23(1): 65.

[11] KOJABAD A A, FARZANEHPOUR M, GALEH H E G, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives[J]. J Med Virol, 2021, 93(7): 4182-4197.

[12] TUMPACH C, RHODES A, KIM Y, et al. Adaptation of Droplet digital PCR-Based HIV transcription profiling to digital PCR and association of HIV transcription and total or intact HIV DNA[J]. Viruses, 2023, 15(7): 1606.

[13] BOSMAN K J, NIJHUIS M, VAN 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: 13811.

[14] RAI P, KUMAR B K, DEEKSHIT V K, et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(2): 441-455.

[15] 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.

[16] LI L,TAN C,ZENG J,et al. Analysis of viral load in different specimen types and serum antibody levels of COVID-19 patients[J]. J Transl Med,2021,19(1):30.

[17] ZHANG L,PARVIN R,LIN S,et al. Peptide nucleic acid clamp-assisted photothermal multiplexed digital PCR for identifying SARS-CoV-2 variants of concern[J]. Adv Sci (Weinh),2024,11(13):e2306088.

[18] DONG L,LI W,XU Q,et al. A rapid multiplex assay of human malaria parasites by digital PCR[J]. Clin Chim Act,2023,539:70-78.

[19] 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.

[20] MU Y,RIVERA J,MCMANUS D P,et al. Comparative assessment of the SjSAP4-incorporated gold immunochromatographic assay for the diagnosis of human schistosomiasis japonica[J]. Front Public Health,2023,11:1249637.

[21] BAGÓ F,HOELZL F,KNAUER F,et al. Rapid and reliable detection of echinococcus multilocularis from faeces using droplet digital PCR [J]. Acta Parasitol,2021,66(2):553-559.

[22] FERNANDO D D,REYNOLDS S L,ZAKRZEWSKI M,et al. Phylogenetic relationships,stage-specific expression and localisation of a unique family of inactive cysteine proteases in Sarcoptes scabiei[J]. Parasit Vectors,2018,11(1):301.

[23] CAMPO F,IOCCA O,PAOLINI F,et al. The landscape of circulating tumor HPV DNA and TTMV-HPVDNA for surveillance of HPV-orpharyngeal carcinoma: systematic review and meta-analysis[J]. J Exp Clin Cancer Res,2024,43(1):215.

[24] HU L,JI Y Y,ZHU P,et al. Mutation-selected amplification droplet digital PCR;a new single nucleotide variant detection assay for TP53R^{249S} mutant in tumor and plasma samples[J]. Anal Chim Acta,2024,1318:342929.

[25] RASHID S,SUN Y,ALI KHAN SADDOLAI U,et al. Circulating tumor DNA and its role in detection, prognosis and therapeutics of hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Cancer Res,2024,36(2):195-214.

[26] JEANNOT E,LATOUCHE A,BONNEAU C,et al. Circulating HPV DNA as a marker for early detection of relapse in patients with cervical cancer[J]. Clin Cancer Res,2021,27(21):5869-5877.

[27] LV N,ZHAO Y,SONG Y,et al. Development of a sensitive droplet digital PCR according to the HPV infection specificity in Chinese population[J]. BMC Cancer,2023,23(1):1022.

[28] SIRAVEGNA G,O'BOYLE C J,VARMEH S,et al. Cell-free HPV DNA provides an accurate and rapid diagnosis of HPV-associated head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res,2022,28(4):719-727.

[29] LI E W,TRAN N Y K,MCCULLOCH D,et al. FLT3-TKD measurable residual disease detection using droplet digital PCR and clinical applications in acute myeloid leukemia[J]. Int J Mol Sci,2024,25(11):5771.

[30] PARSAEI M,DASHTKOOHI M,SALMANI T A,et al. Potential efficacy of digital polymerase chain reaction for non-invasive prenatal screening of autosomal aneuploidies;a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Pregnancy Childbirth,2024,24(1):472.

[31] LI Y Q,TAN G J,ZHOU Y Q. Digital PCR and its applications in noninvasive prenatal testing [J]. Brief Funct Genomics,2022,21(5):376-386.

[32] TERASAWA S,KATO A,NISHIZAWA H,et al. Multiplex PCR in noninvasive prenatal diagnosis for FGFR3-related disorders[J]. Congenit Anom (Kyoto),2019,59(1):4-10.

(收稿日期:2024-08-05 修回日期:2024-11-25)

(上接第 1009 页)

[33] FUSCO F M,PISAPIA R,NARDIELLO S,et al. Fever of unknown origin(FUO):which are the factors influencing the final diagnosis? A 2005—2015 systematic review [J]. BMC Infect Dis,2019,19(1):653.

[34] WANG Z X,LIU J,TIAN Y,et al. Integrating medical domain knowledge for early diagnosis of fever of unknown origin: an interpretable hierarchical multimodal neural network approach[J]. IEEE J Biomed Health Inform,2023,27(11):5237-5248.

[35] WRIGHT W F,SIMNER P J,CARROLL K C,et al. Progress report:next-generation sequencing,multiplex polymerase chain reaction,and broad-range molecular assays as diagnostic tools for fever of unknown origin investigations in adults[J]. Clin Infect Dis,2022,74(5):924-932.

[36] BECKER K K,SØHOLM J,HESS S. The diagnostic yield of [¹⁸F]FDG-PET/CT in a heterogeneous inpatient population with suspected infection or inflammation is comparable to findings in patients with classic fever of unknown origin[J]. Diagnostics,2024,14(13):1420.

[37] SINGH S B,SHRESTHA N,BHANDARI S,et al. [¹⁸F]FDG PET/CT for identifying the causes of fever of unknown origin(FUO)[J]. Am J Nucl Med Mol Imaging,2024,14(2):87-96.

[38] SANTANA L F E,RODRIGUES M D S,SILVA M P D A,et al. Fever of unknown origin;a literature review[J]. Rev Assoc Med Bras(1992),2019,65(8):1109-1115.

[39] JAFARI S,FATOLLAHZADEH A,GHIASVAND F,et al. Epidemiology of causes of fever of unknown origin in an academic center:a five-year evaluation from 2009 to 2014[J]. Arch Clin Infect Dis,2024:13.

(收稿日期:2024-10-14 修回日期:2025-01-11)