

简 报

基于双重芯片式数字 PCR 快速鉴定 KPC 型碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌的方法

台萃*, 张薇, 许杰, 欧一新, 罗倩

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

台萃, 张薇, 许杰, 欧一新, 罗倩. 基于双重芯片式数字 PCR 快速鉴定 KPC 型碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌的方法[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3058-3072.

TAI Cui, ZHANG Wei, XU Jie, OU Yixin, LUO Qian. Simultaneous rapid identification of *bla*_{KPC}-coding carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by duplex chip digital PCR[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3058-3072.

摘要:【背景】由于碳青霉烯类药物的泛用和滥用,致使肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药株与日俱增,产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药的主要原因。目前对肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药株的检测方法存在费时费力、特异性差、灵敏度低等问题。【目的】建立一种能同时检测肺炎克雷伯菌和碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的双重芯片式数字 PCR 方法。【方法】依据肺炎克雷伯菌的特有基因 *yhaI* 和碳青霉烯耐药基因 *bla*_{KPC} 保守序列设计特异性引物和探针,确定双重芯片式数字 PCR 同时对 *yhaI* 和 *bla*_{KPC} 两个基因核酸浓度绝对定量的检测范围、检出限和最佳实验体系,并进行方法特异性、灵敏度、重复性分析及临床菌株的检测。【结果】双重芯片式数字 PCR 检测灵敏度比双重实时荧光定量 PCR 提高了约 1.5 个数量级,在两基因同时检出的情况下,最低检出限分别为 3.74 copies/μL (*yhaI* 基因)和 1.93 copies/μL (*bla*_{KPC} 基因);优化后的双重芯片式数字 PCR 对参考菌株检测特异性的结果与双重实时荧光定量 PCR 结果一致;利用优化后的双重芯片式数字 PCR 方法共检测 58 株临床菌株,其中肺炎克雷伯菌 43 株,属肺炎克雷伯菌且含有 *bla*_{KPC} 基因的菌株 13 株,这与质谱及耐药谱检测结果一致。【结论】利用双重芯片式数字 PCR 技术建立了产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的绝对定量检测方法。该方法特异性强、灵敏度高、准确度高,可用于检测具有碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的肺炎克雷伯菌的核酸检测和定量分析,也为产其他类型碳青霉烯酶的病原菌检测提供了新的技术参考。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC}; 双重芯片式数字 PCR; 绝对定量; 病原菌检测

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFE0102400); 上海交通大学决策咨询课题

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0102400) and the Decision-making Consultation Project of Shanghai Jiao Tong University.

*Corresponding author. E-mail: ctai@sjtu.edu.cn

Received: 2022-09-26; Accepted: 2022-10-09; Published online: 2022-11-25

Simultaneous rapid identification of *bla*_{KPC}-coding carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by duplex chip digital PCR

TAI Cui*, ZHANG Wei, XU Jie, OU Yixin, LUO Qian

School of Life Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains have been on the rise with the extensive use and abuse of carbapenems. The production of carbapenemase is a common mechanism by which these strains resist killing by the carbapenems. The available detection methods for carbapenemase-producing *K. pneumoniae* are time- and labor-intensive, with poor specificity and sensitivity. [Objective] To develop an assay for the detection of *K. pneumoniae* with *bla*_{KPC} gene based on duplex chip digital PCR (duplex-cdPCR). [Methods] The specific primers and probes for the detection of the characteristic gene *yhaI* of *K. pneumoniae* and the carbapenem resistance gene *bla*_{KPC} were designed. The range of absolute quantification of nucleic acids, detection limit and optimal reaction conditions of the duplex-cdPCR for *yhaI* and *bla*_{KPC} were determined simultaneously. The specificity, sensitivity, and precision of the method were analyzed and the clinical strains were detected. [Results] Compared with duplex-qPCR, duplex-cdPCR had the sensitivity of about 1.5 orders of magnitude higher and the detection limit was 3.74 copies/μL (*yhaI*) and 1.93 copies/μL (*bla*_{KPC}), respectively. The optimized duplex-cdPCR showed the specificity consistent with that of duplex-qPCR. In this report, a total of 58 clinical strains were detected by the optimized duplex-cdPCR, of which 43 strains were detected as *K. pneumoniae* and 13 were *K. pneumoniae* harboring *bla*_{KPC} gene. This demonstrated 100% concordance with the results of mass spectrometry and drug resistance profile. [Conclusion] A duplex-cdPCR assay capable of simultaneously detecting the characteristic gene *yhaI* of *K. pneumoniae* and the carbapenem resistance gene *bla*_{KPC} in the same target was established. This assay appears to be highly specific, sensitive, and accurate. The duplex assay is suitable for nucleic acid detection and quantitative analysis of *K. pneumoniae* with *bla*_{KPC} gene. Moreover, it also provides a new technical reference for the detection of carbapenem-resistant pathogenic bacteria carrying other carbapenemase gene types.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase gene *bla*_{KPC}; duplex chip digital PCR; absolute quantification; pathogen detection

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, *kpn*)是医源性感染最重要的革兰氏阴性菌之一,是肠杆菌科克雷伯氏菌属中最为重要的一类病原菌,可引起呼吸、泌尿等多个系统感染类疾

病^[1-2]。碳青霉烯类药物是治疗肺炎克雷伯菌感染的常用药物,但近年来肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药菌株的检出率不断升高。据中国细菌耐药监测网(<http://www.chinets.com>)报道,肺炎克

雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物美罗培南的耐药率从 2005 年的 2.9% 上升至 2021 年的 24.4%，肺炎克雷伯菌耐药问题已得到全球公共卫生的共同关注。

肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药的主要机制是产碳青霉烯酶^[3]。2001 年, Yigit 等在肺炎克雷伯菌中发现了一种新型的非金属碳青霉烯酶并命名为 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), 此酶可水解碳青霉烯类、青霉素类、头孢菌素类和氨基糖苷类等抗生素^[4]。在此前后还发现了其他几种与耐药相关的碳青霉烯酶 IMP、VIM、NDM-1 和 OXA-48^[5-7]等。目前我国报道的肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)流行株主要是由 *bla*_{KPC} 基因介导的 KPC 型碳青霉烯酶菌株^[8]。研究发现, *bla*_{KPC} 基因常位于接合质粒上, 该质粒可接合转移至其他细菌, 形成多重耐药菌, 使耐药性广泛传播^[9]。因此, 针对产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌, 在病原菌感染早期探究一种灵敏度高、特异性强的检测方法, 对于临床有针对性地选择抗生素进行抗感染治疗、降低患者病死率、有效防范耐药菌株的散播至关重要。目前对碳青霉烯酶的检测方法主要是从耐药表型方面进行检测, 包括改良霍奇试验(modified Hodge test, MHT)、Carba NP 试验、碳青霉烯灭活试验(carbapenem inactivation method, CIM)等。这些方法的弊端在于检测周期长、操作烦琐、有漏检的可能, 无法满足临床快速检测的需要^[10]。有研究者利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)等方法从分子水平检测碳青霉烯酶耐药基因^[11-13], 但受检出限的限制, PCR、RT-qPCR 对病原菌早期感染时低拷贝样品检测显得力不从心。

数字 PCR (digital PCR, dPCR)作为第 3 代 PCR 技术, 具有极高灵敏度, 核酸含量低至单拷贝仍可检出, 在检测病原菌早期感染方面具有很大的优势。其原理是通过稀释含有核酸模板的标准 PCR 体系, 将反应分散成皮升级反应单位, 每个反应尽可能只含 1 个待测靶标核酸分子, 实现单分子核酸模板 PCR 扩增, 利用泊松分布原理, 根据反应结束后阴、阳性微滴比例关系计算待测靶标核酸分子的拷贝数, 实现单分子核酸的绝对定量^[14]。根据反应单元形成方式的不同, dPCR 分为芯片式数字 PCR (chip digital PCR, cdPCR)和微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)^[15]。该方法实现了 PCR 反应中核酸样品的分离, 减轻了反应的背景信号, 极大地提高了低拷贝样品的检测灵敏度, 因此非常适合核酸痕量样品的定量检测。此外, dPCR 操作简便、实验周期短、特异性较强, 无需标准曲线和内参基因即可实现绝对定量, 能够在一定程度上解决传统检测方法的不足。

数字 PCR 技术现已广泛应用于各类病原微生物检测诊疗上, 包括乙型肝炎病毒^[16]、冠状病毒^[17]、人类免疫缺陷病毒^[18]、伤寒沙门氏菌^[19]、结核分枝杆菌^[20]、大肠埃希菌^[21]等, 但利用双重数字 PCR 同时检测肺炎克雷伯菌及其碳青霉烯耐药基因 *bla*_{KPC} 的方法研究还未见报道。因此, 本研究利用双重芯片式数字 PCR (duplex chip digital PCR, duplex-cdPCR)方法, 依据肺炎克雷伯菌特有基因 *yhaI* 和碳青霉烯耐药基因 *bla*_{KPC} 的保守区域设计一套特异性较强的引物和探针, 通过对反应体系优化, 建立含有碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的肺炎克雷伯菌的检测方法, 以期提高肺炎克雷伯菌早期感染的检测效率, 及时确定是否属 KPC 型碳青霉烯耐药株, 还可以从分子水平上为其他类型的碳青霉烯酶鉴定提供技术参考。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株

参考菌株 7 株、临床分离株 58 株均由上海交通大学保藏(表 1)。

1.1.2 主要试剂和仪器

引物、探针及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; PerfeCTa[®] MultiPlex qPCR ToughMix、荧光素钠盐, 北京深蓝云生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2×Hieff[®] HotStart PCR Genotyping Master Mix, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司。芯片式数字 PCR 系统, Stilla

Technologies 公司;全自动微生物质谱检测系统, 郑州安图生物工程股份有限公司; VITEK[®] 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏系统, 生物梅里埃公司; 超微量核酸蛋白分析仪(NanoDrop), 基因有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Analytik-jena 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 抽提

将实验用菌株(7 株参考菌株和 58 株临床菌株)在 LB 琼脂平板上挑取单菌落接种至 LB 液体培养基, 在 37 °C、220 r/min 培养条件下振荡培养过夜。取 1 mL 菌液用细菌基因组 DNA 提取试剂盒抽提菌体基因组 DNA, 用超微量核酸蛋白分析仪测定提取的基因组 DNA 的浓度和纯度。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains subjected in this study

Species	Strain	GenBank accession No.	Note	Number of strains
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HS11286	CP003200.1	Reference strain	2
	RJF999	CP014010.1	Reference strain	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606	CP045110.1	Reference strain	1
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	CP026085.1	Reference strain	2
	EC600-KPC		Reference strain	
<i>Staphylococcus aureus</i>	N315	BA000018.3	Reference strain	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	AE004091.2	Reference strain	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP21113, KP21101, KP21114, KP21115, KP21116, KP21117, KP21109, KP21118, KP21119, KP21120, KP21103, KP21105, KP21110, KP21121, KP21122, KP21123, KP21124, KP21125, KP21126, KP21127, KP21128, KP21129, KP21130, KP21131, KP21132, KP21133, KP21134, KP21135, KP21136, KP21137, KP21138, KP21139, KP21140, KP21141, KP21142, KP21143, KP21144, KP21145, KP21146, KP21147, KP21148, RJA166, RJF293		Clinical strain	43
<i>Escherichia coli</i>	EC21303, EC21304		Clinical strain	2
<i>Salmonella enterica</i>	SE21401, SE21402, SE21403		Clinical strain	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB21501, AB21502, AB21503		Clinical strain	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA21604, PA21603, PA21605, PA21606, PA21607		Clinical strain	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA21701, SA21702		Clinical strain	2

EC600-KPC 为 KPC 耐药质粒 pKPHS2 从肺炎克雷伯菌 HS11286 接合转移至大肠埃希菌 EC600 所得的接合子

EC600-KPC is the *Escherichia coli* EC600 transconjugant obtained the KPC plasmids pKPHS2 from *Klebsiella pneumoniae* HS11286.

1.2.2 特异性引物、探针设计与筛选

利用在线引物设计程序 Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)对肺炎克雷伯菌参考菌株 HS11286 的特有基因 *yhaI* 和碳青霉烯耐药基因 *bla_{KPC}* 保守区设计引物,以表 1 中 7 株参考菌株的基因组 DNA 作为反应体系模板,包括 2 株肺炎克雷伯菌(HS11286, RJF999)及 5 株其他菌株(鲍曼不动杆菌 ATCC19606, 大肠埃希菌 DH5 α 、EC600-KPC, 铜绿假单胞菌 PAO1, 金黄色葡萄球菌 N315),筛选特异性较好的引物、探针。

1.2.3 PCR 标准品梯度稀释

利用双重 PCR 方法,以肺炎克雷伯菌 HS11286 的基因组 DNA 为模板,用筛选的引物 *yhaI*-F: (5'-CGGCATCCTCAGTTTTGTTGT-3')和 *yhaI*-R (5'-GCACAGAGCCAGCGAAATAAT-3'),以及 KPC-F (5'-GGCACGGCAAATGACTATGC-3')和 KPC-R (5'-CGCTGTGCTTGTTCATC CTTG-3')扩增 *yhaI* 基因和 *bla_{KPC}* 基因获得两条目的片段。双重 PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times Hieff[®] HotStart PCR Genotyping Master Mix 10 μ L, *yhaI*-F (10 μ mol/L) 0.8 μ L, *yhaI*-R (10 μ mol/L) 0.8 μ L, KPC-F (10 μ mol/L) 0.8 μ L, KPC-R (10 μ mol/L) 0.8 μ L, RNase-Free ddH₂O 5.8 μ L, 模板 DNA 1 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将扩增的两条目的片段测序后进行序列比对,结果表明,扩增所得序列与肺炎克雷伯菌 HS11286 的 *yhaI* 基因和 *bla_{KPC}* 基因序列的一致性为 100%。将此基因组 DNA 作为实验标准品原液使用, NanoDrop 测得浓度为 60.2 ng/ μ L。

利用超纯水对肺炎克雷伯菌 HS11286 基因组 DNA 标准品原液 5 倍比梯度稀释:取上述混匀的标准品原液 10 μ L 加入 40 μ L 超纯水中,混匀后取 10 μ L 至含有 40 μ L 超纯水的 2 号管中,

依次稀释。HS11286 基因组 DNA 标准品原液标记为 S0 号,后续样品编号从高浓度至低浓度依次为 S1-S10。

1.2.4 标准曲线建立及检测范围和检出限测定

分别以经过梯度稀释的标准品为模板,通过 duplex-cdPCR 对标准品核酸浓度进行测定做标准曲线以验证其与 duplex-qPCR 在检测范围及检测限等方面的差异,每个梯度标准品重复 3 次。duplex-cdPCR 反应体系 (7 μ L): PerfeCTa[®] MultiPlex qPCR ToughMix (5 \times) 1.4 μ L, *yhaI*-F (10 μ mol/L) 0.7 μ L, *yhaI*-R (10 μ mol/L) 0.7 μ L, KPC-F (10 μ mol/L) 0.7 μ L, KPC-R (10 μ mol/L) 0.7 μ L, 荧光素钠盐(1 μ mol/L) 0.7 μ L, *yhaI*-P (10 μ mol/L) 0.175 μ L, KPC-P (10 μ mol/L) 0.175 μ L, RNase-free ddH₂O 0.75 μ L, 模板 DNA 1 μ L。*yhaI*-F、*yhaI*-R、KPC-F 和 KPC-R 引物序列见 1.2.3, *yhaI*-P: 5'-FAM-CAAACCACGGAAT GATAACCCCCAACACAA-BHQ1-3'; KPC-P: 5'-CY5-TCTGGCCCCACTGGGCGCGCACCTAT-BHQ2-3'。反应条件: Partition 25 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环。反应结束后,选择最佳核酸浓度的标准品进行优化反应体系实验。

1.2.5 双重芯片式数字 PCR 反应体系的优化

在无抑制因子的情况下,扩增反应中荧光信号的累积、反应体系中引物、探针浓度都与反应扩增效率紧密相关^[22-23]。优化反应体系实验以 duplex-cdPCR 最适浓度标准品为模板,通过改变引物浓度 (0.7-1.1 μ mol/L)、探针浓度 (0.1-0.3 μ mol/L)比较荧光信号强度、微滴分布状态以确定 duplex-cdPCR 检测标准品的最佳反应体系。

1.2.6 特异性检测

分别提取表 1 中 7 株参考菌株(肺炎克雷伯菌 HS11286、RJF999, 大肠埃希菌 DH5 α 、EC600-KPC, 鲍曼不动杆菌 ATCC19606、铜绿

假单胞菌 PAO1、金黄色葡萄球菌 N315)的基因组 DNA 作为模板,用优化后的反应体系分析 duplex-cdPCR 检测肺炎克雷伯菌和 *bla*_{KPC} 基因的特异性。

1.2.7 重复性、精密度测试

按优化好的 duplex-cdPCR 方法分别对经过梯度稀释的标准品进行 3 次重复性测试,通过计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)等数据分析测试方法的重复性、精密度。

1.2.8 临床菌株的检测

为检测方法的应用潜力,分别以 58 株临床菌株的基因组 DNA 作为 duplex-cdPCR 的模板,标准品 HS11286 基因组 DNA 为阳性对照, no template control (NTC)为阴性对照,通过质谱及耐药谱检测的结果评价 duplex-cdPCR 方法检测临床菌株的应用潜力。

1.3 数据统计

利用 Excel 2016 进行标准曲线线性回归分析;采用 R 软件包(<https://www.r-project.org/>)进行统计学数据分析;使用 Crystal Miner for the Naica™ System 软件进行 duplex-cdPCR 数据采集和分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 引物筛选结果

根据肺炎克雷伯菌参考菌株 HS11286 (GenBank 登录号为 CP003200.1)的特有基因 *yhaI* 和碳青霉烯耐药基因 *bla*_{KPC} 的保守区设计引物,取表 1 中 7 个参考菌株(2 株肺炎克雷伯

菌 HS11286、RJF999 和 5 株其他菌株 DH5 α 、EC600-KPC、ATCC19606、PAO1、N315)的基因组 DNA 作为模板筛选特异性较好的引物。结果表明,表 2 中的两对引物对 *yhaI* 基因和 *bla*_{KPC} 基因有特异性扩增,选取作为后续实验引物。两对引物对 *yhaI* 基因和 *bla*_{KPC} 基因的扩增片段大小分别为 172 bp 和 100 bp。

2.2 双重芯片式数字 PCR 的检测范围及检测限的确定

分别以经过梯度稀释的标准品为模板,重复检测 3 次,确定 duplex-cdPCR 核酸浓度检测范围。结果显示(图 1),S1 标准品 *yhaI* 基因核酸浓度平均值为 170 734 copies/ μ L,阳性微滴(12 199 个)占全部微滴(12 244 个)的 99.63%;*bla*_{KPC} 基因核酸浓度平均值为 206 294 copies/ μ L,其中阳性微滴(12 230 个)占全部微滴(12 244 个)的 99.89%,说明该浓度下几乎所有微滴都为阳性微滴,阴性微滴所占比例极小。此时,微滴分布不满足泊松分布原理,定量结果偏离真实值,说明 S1 号标准品 DNA 浓度超出了 duplex-cdPCR 的检测范围。对于 *bla*_{KPC} 基因,S9、S10 号标准品均检测不到,*yhaI* 基因的 S9、S10 号标准品 3 次检测中均有无法取到核酸样品的情况,考虑样品浓度极低,结果准确性难以保证,且实验目的是需要同时检测出两个目的片段。因此,S1、S9、S10 号标准品核酸浓度超出了检测范围,这一点从图 2 标准曲线也能看得出来。因此,双重芯片式数字 PCR 后续核酸检测在 S2-S8 号标准品范围内进行。

表 2 引物和探针

Table 2 Primers and probes

Primer and probe	Sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>yhaI</i> -forward primer: yhaI-F	CGGCATCCTCAGTTTTGTTGT	21
<i>yhaI</i> -reverse primer: yhaI-R	GCACAGAGCCAGCGAAATAAT	21
<i>bla</i> _{KPC} -forward primer: KPC-F	GGCACGGCAAATGACTATGC	20
<i>bla</i> _{KPC} -reverse primer: KPC-R	CGCTGTGCTTGTCATCCTTG	20
<i>yhaI</i> -probe: yhaI-P	FAM-CAAACCACGGAATGATAACCCCCAACACAA-BHQ1	30
<i>bla</i> _{KPC} -probe: KPC-P	CY5-TCTGGCCCCACTGGGCGCGCACCTAT-BHQ2	25

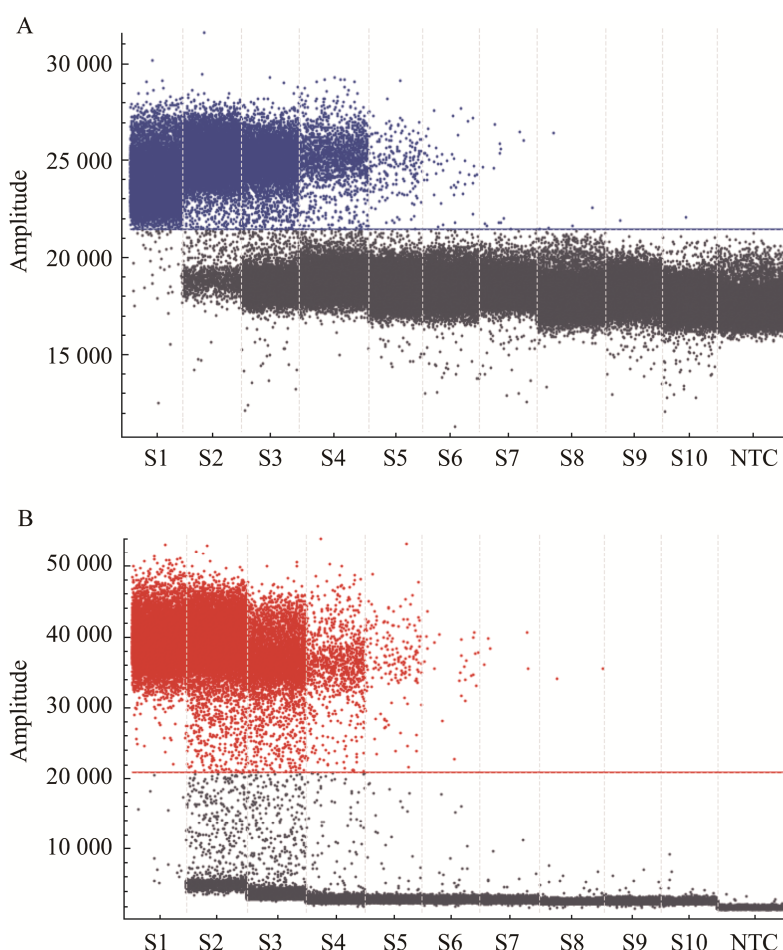


图 1 Duplex-cdPCR 对不同稀释度标准品的 *yhaI* 基因(A)和 *bla_{KPC}* 基因(B)灵敏度测试结果 蓝色/红色: 阳性微滴; 灰色: 阴性微滴; NTC: 阴性对照

Figure 1 Sensitivity of the duplex-cdPCR for the HS11286 genomic DNA with different dilution ratios for the *yhaI* gene (A) and the *bla_{KPC}* gene (B). Blue/Red: Positive droplets; Gray: Negative droplets; NTC: No template control.

此外,当模板 DNA 浓度为 6 000 copies/ μ L 左右时定量结果较准确,这点将在重复性分析中予以阐述。因此将 S3 号标准品稀释 2 倍,制备 S3-2 号标准品,后续优化实验体系模板选用 S3-2 号样品(*yhaI*: 6 104.67 copies/ μ L; *bla_{KPC}*: 5 288.67 copies/ μ L)。

从 duplex-cdPCR 对 *yhaI* 基因和 *bla_{KPC}* 基因的标准曲线可以看出(图 2A、2B),S1 号和 S9 标准品的检测范围已经超出了标准曲线的检测范围,这与前面的检测结果一致。因此, duplex-cdPCR 对本实验标准品的检测范围为 S2–S8 号

标准品,对于 *yhaI* 基因,核酸定量范围为 3.74–44 403.33 copies/ μ L,最低检出限为 3.74 copies/ μ L (S8 号);对于 *bla_{KPC}* 基因,核酸定量范围为 1.93–39 020 copies/ μ L,最低检出限为 1.93 copies/ μ L (S8 号),两标准曲线的 R^2 分别为 0.996 1 和 0.996 4,具有良好的线性关系。此外,实验选择 duplex-qPCR 方法来评估 duplex-cdPCR 检测方法的灵敏度。结果表明, duplex-qPCR 同时检出两个基因的最低检出限为 S6 号标准品, duplex-cdPCR 的检测灵敏度要比 duplex-qPCR 高出约 1.5 个数量级。

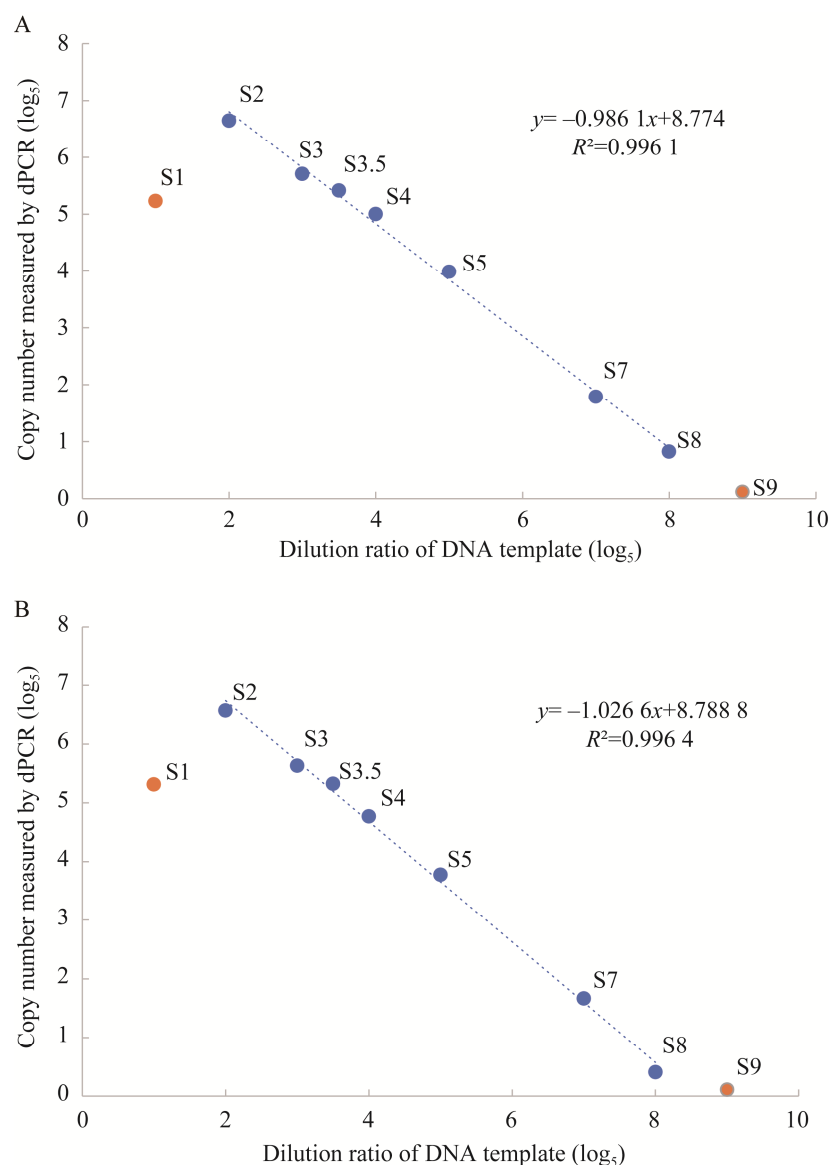


图2 Duplex-cdPCR 对不同稀释度标准品的 *yhaI* 基因(A)和 *bla*_{KPC} 基因(B)的标准曲线

Figure 2 Standard curves of the duplex-cdPCR for the HS11286 genomic DNA with different dilution ratios for the *yhaI* gene (A) and the *bla*_{KPC} gene (B).

2.3 双重芯片式数字 PCR 反应体系的优化

通过改变引物浓度(0.7–1.1 μmol/L)、探针浓度(0.1–0.3 μmol/L)以确定 duplex-cdPCR 对两基因检测的最佳反应体系。从荧光信号强弱、微滴分布状态,综合 *yhaI* 基因和 *bla*_{KPC} 基因扩增情况来看,当引物浓度为 1.1 μmol/L、探针浓度为 0.3 μmol/L 时,反应的荧光信号最强且阴阳性微滴荧光信号差异最大。

经过优化的 duplex-cdPCR 反应体系对实验标准品(S3-2 号)两个目标片段的扩增结果显示(图 3A、3B),阳性微滴(蓝色/红色)和阴性微滴(灰色)明显分成两簇且弥散在中间微滴较少,说明优化后的反应体系对含碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的肺炎克雷伯菌的 DNA 定量分析是合适的。综合扩增的荧光强度和微滴分布状态,确定 duplex-cdPCR 对两基因检测的优化反应体系

(7 μL): PerfeCTa[®] MultiPlex qPCR ToughMix (5 \times) 1.4 μL , *yhaI*-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.77 μL , *yhaI*-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.77 μL , *KPC*-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.77 μL , *KPC*-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.77 μL , 荧光素钠盐 (1 $\mu\text{mol/L}$) 0.7 μL , *yhaI*-P (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.21 μL , *KPC*-P (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.21 μL , RNase-free ddH₂O 0.4 μL , 模板 DNA 1 μL 。最佳反应条件: Partition 25 $^{\circ}\text{C}$; 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环。

2.4 双重芯片式数字 PCR 对 *yhaI* 和 *bla*_{KPC} 扩增特异性实验

运用 duplex-cdPCR 方法按照优化后的反应

体系分别对表 1 中 7 株参考菌株(肺炎克雷伯菌 HS11286、肺炎克雷伯菌 RJF999、大肠埃希菌 DH5 α 、大肠埃希菌 EC600-KPC、鲍曼不动杆菌 ATCC19606、铜绿假单胞菌 PAO1、金黄色葡萄球菌 N315)的基因组 DNA 进行特异性扩增检测, S3-2 (HS11286 标准品 S3-2 号样品)为阳性对照, NTC 为阴性对照, 以测试 duplex-cdPCR 方法检测含有碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的肺炎克雷伯菌的特异性。图 4A 结果显示, 对于肺炎克雷伯菌特有基因 *yhaI*, 只有 1-3 道(S3-2、肺炎克雷伯菌 HS11286、肺炎克雷伯菌 RJF999)有特异性扩增, 其他非肺炎克雷伯菌无扩增; 对碳青

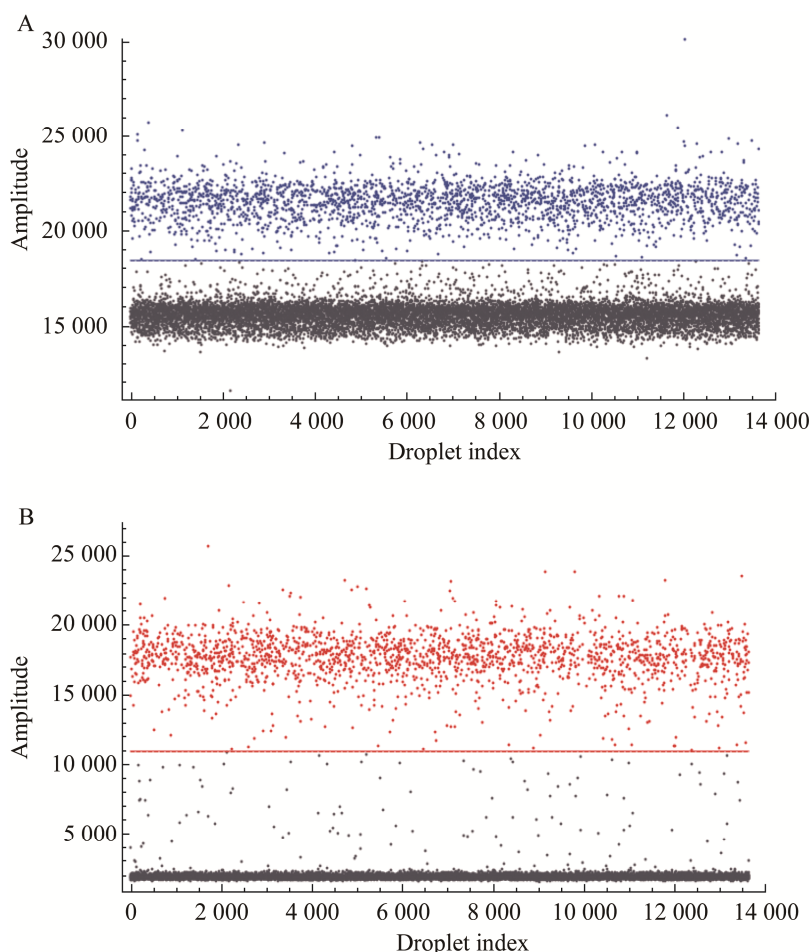


图 3 Duplex-cdPCR 对 *yhaI* 基因(A)和 *bla*_{KPC} 基因(B)的优化扩增结果 蓝色/红色: 阳性微滴; 灰色: 阴性微滴

Figure 3 Optimization of the duplex-cdPCR results for the *yhaI* gene (A) and the *bla*_{KPC} gene (B). Blue/Red: Positive droplets; Gray: Negative droplets.

霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 扩增结果显示(图 4B), duplex-cdPCR 只对含有 *bla*_{KPC} 基因的 S3-2、肺炎克雷伯菌 HS11286、大肠埃希菌 EC600-KPC 有特异性扩增,这个检测结果与 duplex-qPCR 检测结果一致。此外,扩增结果显示阴、阳性微滴显著分开,荧光信号较强,说明 duplex-cdPCR 方法对含有碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的肺炎克雷伯菌的特异性检测是有效的。

2.5 双重芯片式数字 PCR 的重复性和精密度测试

为了评估 duplex-cdPCR 方法的重复性和精密度,将 7 组不同稀释倍数的标准品 DNA 作为反应体系模板进行检测。由表 3 可知, *yhaI* 基因的 7 组标准品的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 1.47–8.66 之间, *bla*_{KPC} 基因的 7 组标准品的 RSD 在 2.11–12.20 之间,均在可接

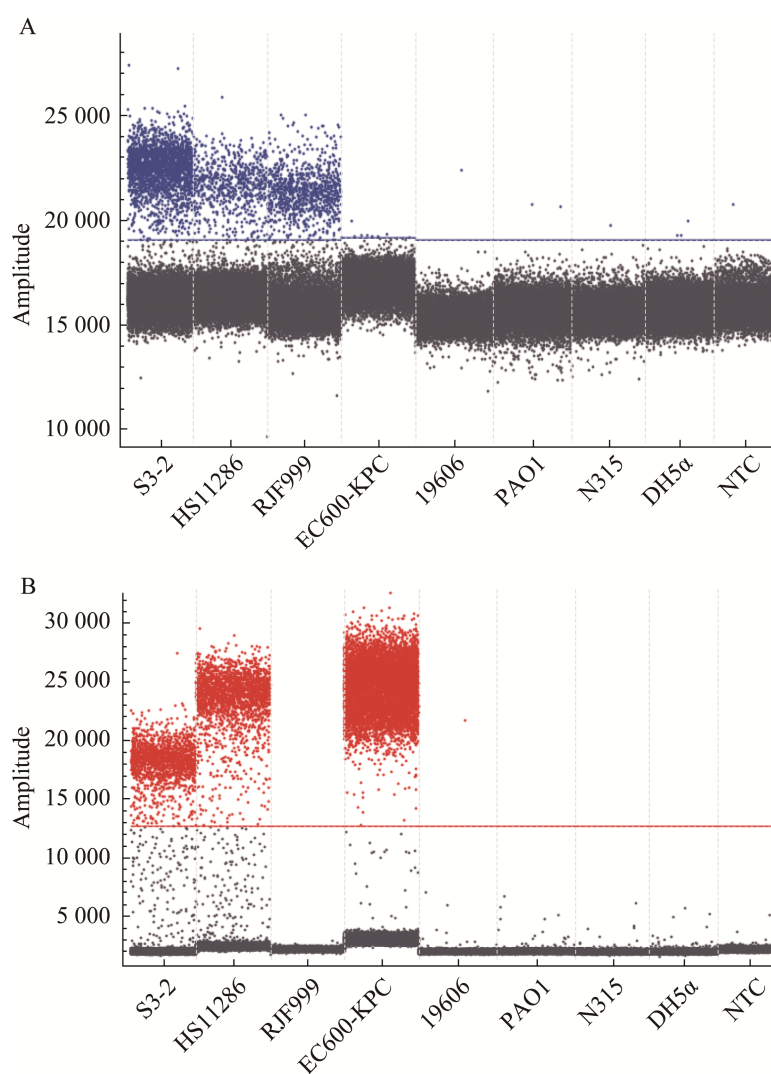


图 4 Duplex-cdPCR 对 *yhaI* 基因(A)和 *bla*_{KPC} 基因(B)特异性检测结果 蓝色/红色: 阳性微滴; 灰色: 阴性微滴; NTC: 阴性对照

Figure 4 Specificity assay of the duplex-cdPCR for the *yhaI* gene (A) and the *bla*_{KPC} gene (B). Blue/Red: Positive droplets; Gray: Negative droplets; NTC: No template control.

受范围,以上结果说明该方法在检测范围内反应体系稳定、重复性较好。

从表 3 还可以看出,当 DNA 模板浓度为 6 000 copies/ μ L 左右时(S3-2 号标准品),测量结果的 RSD 最低,方法精密度最高,所以前面将 S3-2 号标准品作为最适浓度模板进行优化实验是合适的。因此,采用 duplex-cdPCR 进行绝对

定量时,将模板浓度控制在 6 000 copies/ μ L 左右可保证测量结果的精密度更好、准确度更高。

2.6 双重芯片式数字 PCR 对临床菌株的检测

利用 duplex-cdPCR 对 58 株临床菌株(表 1)进行检测以评估方法的应用潜力。以 S3-2 号标准品为阳性对照,以 NTC 为阴性对照,结果表明(表 4),58 株临床菌株中有 43 株为肺炎克雷

表 3 Duplex-cdPCR 对 *yhaI* 和 *bla_{KPC}* 检测的方法重复性分析

Table 3 Repeatability of the duplex-cdPCR for the *yhaI* gene and the *bla_{KPC}* gene

Standard	Average (copies/ μ L)		SD		RSD (%)	
	<i>yhaI</i> gene	<i>bla_{KPC}</i> gene	<i>yhaI</i> gene	<i>bla_{KPC}</i> gene	<i>yhaI</i> gene	<i>bla_{KPC}</i> gene
S2	44 403.33	39 020.00	1 120.89	994.40	2.52	2.55
S3	9 723.00	8 625.00	660.47	763.68	6.79	8.85
S3-2	6 104.67	5 288.67	89.48	111.63	1.47	2.11
S4	3 148.67	2 168.33	145.71	157.80	4.63	7.28
S5	613.40	438.63	53.10	24.43	8.66	5.57
S7	17.77	14.67	1.31	1.79	7.35	12.20
S8	3.74	1.93	0.08	0.10	2.02	5.26

表 4 双重芯片式数字 PCR 对不同菌株的检测结果

Table 4 Results of the duplex-cdPCR assay for the different bacterial strains

No.	Strain	Number of droplets	<i>yhaI</i> gene	<i>bla_{KPC}</i> gene	Maldi-TOF MS	Carbapenem resistance
1	S3-2	15 559	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
2	KP21113	14 302	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
3	KP21101	15 273	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
4	KP21114	14 743	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
5	KP21115	13 574	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
6	KP21116	14 123	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
7	KP21117	13 684	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
8	KP21109	13 917	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
9	KP21118	14 579	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
10	KP21119	11 500	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
11	KP21120	11 833	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
12	KP21103	15 030	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
13	KP21105	15 463	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
14	KP21110	13 882	+	+	<i>K. pneumoniae</i>	R
15	KP21121	14 938	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
16	KP21122	15 231	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
17	KP21123	12 997	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
18	KP21124	15 031	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
19	KP21125	11 102	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S

(待续)

(续表 4)

No.	Strain	Number of droplets	<i>yhaI</i> gene	<i>bla_{KPC}</i> gene	Maldi-TOF MS	Carbapenem resistance
20	KP21126	15 112	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
21	KP21127	15 383	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
22	KP21128	16 425	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
23	KP21129	15 892	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
24	KP21130	17 193	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
25	KP21131	16 732	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
26	KP21132	16 751	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
27	KP21133	10 162	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
28	KP21134	14 260	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
29	KP21135	15 000	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
30	KP21136	15 511	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
31	KP21137	16 323	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
32	KP21138	16 726	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
33	KP21139	17 184	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
34	KP21140	15 880	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
35	KP21141	14 451	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
36	KP21142	15 730	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
37	KP21143	14 888	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
38	KP21144	13 844	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
39	KP21145	14 924	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
40	KP21146	16 786	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
41	KP21147	15 741	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
42	KP21148	14 650	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
43	RJA166	16 351	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
44	RJF293	16 500	+	—	<i>K. pneumoniae</i>	S
45	EC21303	15 200	—	—	<i>E. coli</i>	S
46	EC21304	15 446	—	—	<i>E. coli</i>	S
47	SE21401	16 702	—	—	<i>S. enterica</i>	S
48	SE21402	17 349	—	—	<i>S. enterica</i>	S
49	SE21403	17 295	—	—	<i>S. enterica</i>	S
50	AB21501	12 957	—	—	<i>A. baumannii</i>	S
51	AB21502	16 366	—	—	<i>A. baumannii</i>	S
52	AB21503	16 449	—	—	<i>A. baumannii</i>	S
53	PA21604	16 626	—	—	<i>P. aeruginosa</i>	S
54	PA21603	16 696	—	—	<i>P. aeruginosa</i>	S
55	PA21605	16 783	—	—	<i>P. aeruginosa</i>	S
56	PA21606	16 991	—	—	<i>P. aeruginosa</i>	S
57	PA21607	15 183	—	—	<i>P. aeruginosa</i>	S
58	SA21701	16 146	—	—	<i>S. aureus</i>	S
59	SA21702	15 619	—	—	<i>S. aureus</i>	S
60	NTC	17 293	—	—		

1 号为阳性对照; 2–44 号为肺炎克雷伯菌; 45–46 号为大肠埃希菌; 47–49 号为肠道沙门氏菌; 50–52 号为鲍曼不动杆菌; 53–57 号为铜绿假单胞菌; 58–59 号为金黄色葡萄球菌; 60 号为阴性对照

No.1: Positive control; No. 2–44: *Klebsiella pneumoniae*; No. 45–46: *Escherichia coli*; No. 47–49: *Salmonella enterica*; No. 50–52: *Acinetobacter baumannii*; No. 53–57: *Pseudomonas aeruginosa*; No. 58–59: *Staphylococcus aureus*; No. 60: No template control.

伯菌, 15 株为其他种属菌株, 在 43 株肺炎克雷伯菌中有 13 株为含有 *bla*_{KPC} 基因的碳青霉烯耐药菌株, 这些检测结果与菌株种属的质谱鉴定和菌株的耐药谱检测结果一致, 说明 duplex-cdPCR 方法对含有碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的肺炎克雷伯菌株的检出是准确可靠的, 具有应用的潜力。

3 讨论与结论

近年来, 随着碳青霉烯类药物的广泛使用, 产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌检出率与日俱增, 肺炎克雷伯菌的耐药问题日趋严重, 这给临床治疗带来了极大的困难。因此, 在感染早期, 快速灵敏地检测碳青霉烯酶基因型将有助于对肺炎克雷伯菌的精准治疗。数字 PCR 具有特异性强、灵敏度高的特点, 适合早期病原菌分子水平核酸检测, 双重 PCR 技术使检测实验更加高效、经济、简便。目前, 双重数字 PCR 已经广泛应用于病原菌检测方面。如 2013 年, Kelley 等利用双重数字 PCR 方法对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌进行检测, 其最低检出限为 6 copies/20 μ L, 在 qPCR 比较的基础上, 对 397 个临床菌株进行检测, 结论显示两者没有差异^[24]。2021 年, Raguseo 等利用双重数字 PCR 方法建立了定量果霉和松霉的新方法。在优化反应条件后, 发现 dPCR 检测的灵敏度比 qPCR 高 200 多倍^[25]。2021 年, 王一萍等利用双重数字 PCR 方法建立了检测副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌的方法, 结果表明, 双重数字 PCR 方法对副溶血弧菌 *Tlh* 基因的最低检出限为 16.8 copies/20 μ L, 对鼠伤寒沙门氏菌 *InvA* 基因的最低检出限为 8.6 copies/20 μ L, 得出了双重数字 PCR 方法特异性强、灵敏度高且重复性好的结论^[26]。本研究利用双重芯片式数字 PCR 方法, 依据肺炎克雷伯菌特有基因 *yhaI* 和碳青霉烯耐药基因 *bla*_{KPC} 筛选特异性引物及探针, 通过优化反应体系完成对参考菌株、临床

菌株特异性检测, 通过验证方法的灵敏度和重复性, 建立了快速鉴定 *bla*_{KPC} 基因型肺炎克雷伯菌的检测方法。

就核酸检测灵敏度而言, 在同时检出 *yhaI* 基因和 *bla*_{KPC} 基因的情况下, 该方法对 *yhaI* 基因和 *bla*_{KPC} 基因的检出限分别为 3.74 copies/ μ L 和 1.93 copies/ μ L, 比相应的 qPCR 的检测限提高了约 1.5 个数量级, 这与我们前期关于数字 PCR 对肺炎克雷伯菌的检测研究结果^[27]一致, 这对于病原菌早期感染的及时检出具有很大优势; 就可检测的核酸浓度范围来看, 该方法对 *yhaI* 基因和 *bla*_{KPC} 基因的检测范围分别在 3.74–44 403.33 和 1.93–39 020 copies/ μ L (S2-S8 号标准品), 而 qPCR 的检测范围在 S1-S6 号标准品, 可见从核酸浓度检测范围来看, 该方法同样更偏向应用于核酸较低浓度范围的检测, 更适合低浓度或痕量样品的核酸检测; 从方法的重复性、精密度来看, S2-S8 号标准品 RSD 值均在可接受范围, 说明该方法在检测范围内实验反应体系稳定。当模板浓度为 6 000 copies/ μ L 左右时 (S3-2 号标准品), 该方法的重复性最好, RSD 分别为 1.47% (*yhaI* 基因) 和 2.11% (*bla*_{KPC} 基因), 精密度最高; 就核酸检测特异性而言, 该方法对两个基因的检测特异性良好, 检测结果与 qPCR、质谱及耐药谱检测结果一致。尤其对 *bla*_{KPC} 基因扩增特异性较强, 阴阳性微滴区分明显, 微滴弥散程度较少。这些结果说明将双重芯片式数字 PCR 方法应用于病原菌及耐药基因的分子检测是可行的。

综上所述, 本研究建立了能同时检测肺炎克雷伯菌和碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 的双重芯片式数字 PCR 方法, 反应体系中微滴数量、质量较好, 检测结果可靠。该方法可对所测核酸精确定量, 具有较好的数据重复性, 当核酸浓度低至单拷贝依然可以准确检出, 在稀有样品或痕量样品的检测方面具有独特的优势, 且该方法在核酸检

测时无需标准曲线和内参,操作相对简单。因此,该方法为产 KPC 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌早期检测提供了新的技术手段,也为具有其他类型碳青霉烯酶的病原菌分子检测提供了新的技术参考。

致谢

感谢上海交通大学生命科学技术学院仪器共享与技术服务平台提供的实验技术支撑和相关仪器设备。

REFERENCES

- [1] 李富祥, 廖德芳, 姚俊, 熊和丽, 李华春. 肺炎克雷伯菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(12): 1231-1235.
LI FX, LIAO DF, YAO J, XIONG HL, LI HC. Development of TaqMan real-time PCR for detection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Veterinary Science, 2014, 44(12): 1231-1235 (in Chinese).
- [2] 王华, 王俊瑞, 郑文琪. 高毒力肺炎克雷伯菌致病及耐药分子机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 288-294.
WANG H, WANG JR, ZHENG WQ. Research progress in the mechanism of molecular pathogenesis and drug resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 288-294 (in Chinese).
- [3] NAVON-VENEZIA S, KONDRATYEVA K, CARATTOLI A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 252-275.
- [4] YIGIT H, QUEENAN AM, ANDERSON GJ, DOMENECH-SANCHEZ A, BIDDLE JW, STEWARD CD, ALBERTI S, BUSH K, TENOVER FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4): 1151-1161.
- [5] PITOUT JDD, NORDMANN P, POIREL L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(10): 5873-5884.
- [6] GRUNDMANN H, GLASNER C, ALBIGER B, AANENSEN DM, TOMLINSON CT, ANDRASEVIĆ AT, CANTÓN R, CARMELI Y, FRIEDRICH AW, GISKE CG, GLUPCZYNSKI Y, GNIADKOWSKI M, LIVERMORE DM, NORDMANN P, POIREL L, ROSSOLINI GM, SEIFERT H, VATOPOULOS A, WALSH T, WOODFORD N, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): A prospective, multinational study[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2017, 17(2): 153-163.
- [7] SAHIN K, TEKIN A, OZDAS S, AKIN D, YAPISLAR H, DILEK AR, SONMEZ E. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2015, 14: 44.
- [8] CHEN SD, HU FP, XU XG, LIU Y, WU WH, ZHU DM, WANG HH. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(5): 2493-2494.
- [9] CHEN L, MATHEMA B, CHAVDA KD, DELEO FR, BONOMO RA, KREISWIRTH BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding[J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(12): 686-696.
- [10] 张青, 陈喆, 李克诚, 夏菲, 戴其锋, 李云丰, 钱定良, 潘晓夫, 李向阳. 改良 Hodge 与 Carba NP 和 mCIM 试验快速检测产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的方法学比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(10): 1441-1446.
ZHANG Q, CHEN Z, LI KC, XIA F, DAI QF, LI YF, QIAN DL, PAN XF, LI XY. A comparative study of modified Hodge test, Carba NP test and mCIM test for rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(10): 1441-1446 (in Chinese).
- [11] HINDIYEH M, SMOLLEN G, GROSSMAN Z, RAM D, DAVIDSON Y, MILEGUIR F, VAX M, BEN DAVID D, TAL I, RAHAV G, SHAMISS A, MENDELSON E, KELLER N. Rapid detection of *bla*_{KPC} carbapenemase genes by real-time PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(9): 2879-2883.
- [12] WEIß D, ENGELMANN I, BRAUN SD, MONECKE S, EHRLICH R. A multiplex real-time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} and

- bla*OXA-48[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 142: 20-26.
- [13] MILILLO M, KWAK YI, SNESRUD E, WATERMAN PE, LESHIO E, MCGANN P. Rapid and simultaneous detection of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} by use of multiplex real-time PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(4): 1247-1249.
- [14] MORISSET D, ŠTEBIH D, MILAVEC M, GRUDEN K, ŽEL J. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62583.
- [15] 詹成, 燕丽, 王琳, 金玉麟, 陈力, 时雨, 王群. 数字 PCR 技术的发展和应[用]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(6): 786-789.
- ZHAN C, YAN L, WANG L, JIN YL, CHEN L, SHI Y, WANG Q. The development and application of digital PCR[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2015, 42(6): 786-789 (in Chinese).
- [16] CAVIGLIA GP, ABATE ML, TANDOI F, CIANCIO A, AMOROSO A, SALIZZONI M, SARACCO GM, RIZZETTO M, ROMAGNOLI R, SMEDILE A. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: a new tool to detect occult infection[J]. Journal of Hepatology, 2018, 69(2): 301-307.
- [17] VASUDEVAN HN, XU P, SERVELLITA V, MILLER S, LIU LQ, GOPEZ A, CHIU CY, ABATE AR. Digital droplet PCR accurately quantifies SARS-CoV-2 viral load from crude lysate without nucleic acid purification[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 780.
- [18] STRAIN MC, LADA SM, LUONG T, ROUGHT SE, GIANELLA S, TERRY VH, SPINA CA, WOELK CH, RICHMAN DD. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e55943.
- [19] 王静, 张慧敏, 魏玮, 贾俊涛, 李春喜, 秦燕. SD-PMA-ddPCR 检测食品中沙门氏菌的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 67-71.
- WANG J, ZHANG HM, WEI W, JIA JT, LI CX, QIN Y. Detection of *Salmonella* cells based on SD-PMA-dd PCR[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 67-71 (in Chinese).
- [20] CHO SM, SHIN S, KIM Y, SONG W, HONG SG, JEONG SH, KANG MS, LEE KA. A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and droplet digital PCR[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2020, 26(7): 942.e1-942.e5.
- [21] VERHAEGEN B, de REU K, de ZUTTER L, VERSTRAETE K, HEYNDRIKX M, van COILLIE E. Comparison of droplet digital PCR and qPCR for the quantification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine feces[J]. Toxins, 2016, 8(5): 157.
- [22] 袁润余, 曾汉日, 苏娟, 黎薇, 莫艳玲, 陆靖, 柯昌文. 一种通用型肠道病毒微滴式数字 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 华南预防医学, 2019, 45(1): 15-20.
- YUAN RY, ZENG HR, SU J, LI W, MO YL, LU J, KE CW. Establishment and application of universal droplet digital polymerase chain reaction method for quantification of enterovirus[J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2019, 45(1): 15-20 (in Chinese).
- [23] 董莲华, 张玲, 姜君, 王江南, 王晶, 陈唯军. 大肠杆菌 O157:H7 微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. 分析化学, 2015, 43(3): 319-324.
- DONG LH, ZHANG L, JIANG J, WANG JN, WANG J, CHEN WJ. Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia coli* O157:H7[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(3): 319-324 (in Chinese).
- [24] KELLEY K, COSMAN A, BELGRADER P, CHAPMAN B, SULLIVAN DC. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(7): 2033-2039.
- [25] RAGUSEO C, GERIN D, POLLASTRO S, ROTOLO C, ROTONDO PR, FARETRA F, DE MICCOLIS ANGELINI RM. A duplex-droplet digital PCR assay for simultaneous quantitative detection of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* on stone fruits[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 747560.
- [26] 王一萍, 段林洁, 曾杰生, 刘华敏, 王哲. 基于双重数字 PCR 检测副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌[J]. 现代食品, 2021(15): 176-181, 185.
- WANG YP, DUAN LJ, ZENG JS, LIU HM, WANG Z. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* by duplex droplet digital PCR[J]. Modern Food, 2021(15): 176-181, 185 (in Chinese).
- [27] 台萃, 旷代, 张萍, 许杰, 张薇, 罗倩. 肺炎克雷伯菌的芯片式数字 PCR 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1200-1213.
- TAI C, KUANG D, ZHANG P, XU J, ZHANG W, LUO Q. Development of a chip digital PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1200-1213 (in Chinese).