

实时荧光定量及数字PCR技术在病毒检测中的应用及研究进展

王金林¹, 史亚茹¹, 王文韬¹, 高西壮¹, 于龙庆¹, 姜晓宇¹, 陈宗兰^{2*}

¹济宁医学院临床医学院, 山东 济宁

²济宁医学院附属医院内分泌遗传代谢科, 山东 济宁

收稿日期: 2023年7月21日; 录用日期: 2023年8月25日; 发布日期: 2023年9月1日

摘要

实时荧光定量PCR是在传统PCR技术基础上发展而来的一种通过收集荧光信号来进一步检测目的基因扩增数量的定量PCR技术, 较传统PCR技术有着灵敏度高, 特异性高和准确度高优点, 广泛应用于病毒的快速分型, 相似病毒的鉴别诊断等。同时随着微流控技术的逐渐发展, 数字PCR技术以其绝对定量及更高的灵敏度准确度等优势, 在病毒DNA定量检测、基因突变检测等领域得到广泛应用。本文将对两种PCR技术的原理、分类、各自在病毒检测领域中的前沿应用及优势对比进行了详细综述。

关键词

实时荧光定量PCR, 数字PCR, 病毒, 聚合酶链式反应

Application and Research Progress of Real-Time Fluorescence Quantitative PCR and Digital PCR Techniques in Virus Detection

Jinlin Wang¹, Yaru Shi¹, Wentao Wang¹, Xizhuang Gao¹, Longqing Yu¹, Xiaoyu Jiang¹, Zonglan Chen^{2*}

¹College of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining Shandong

²Department of Endocrinology, Genetics and Metabolism, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

Received: Jul. 21st, 2023; accepted: Aug. 25th, 2023; published: Sep. 1st, 2023

*通讯作者。

文章引用: 王金林, 史亚茹, 王文韬, 高西壮, 于龙庆, 姜晓宇, 陈宗兰. 实时荧光定量及数字 PCR 技术在病毒检测中的应用及研究进展[J]. 医学诊断, 2023, 13(3): 320-327. DOI: 10.12677/md.2023.133049

Abstract

Real-time fluorescence PCR is a quantitative PCR technique developed on the basis of traditional PCR technology, which collects fluorescent signals to further detect the number of target genes amplified. It has the advantages of high sensitivity, high specificity and high accuracy compared to traditional PCR techniques, and is widely used for rapid typing of viruses and differential diagnosis of similar viruses. Meanwhile, with the gradual development of microfluidic technology, digital PCR techniques have been widely used in the fields of viral DNA quantification and gene mutation detection with its advantages of absolute quantification and higher sensitivity and accuracy. In this paper, a detailed review of the principles and classification of the two PCR techniques, their respective cutting-edge applications in the field of virus detection and comparison of their advantages are presented.

Keywords

Real Time Fluorescence PCR, Digital PCR, Virus, Polymerase Chain Reaction

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

病毒性流行病在世界范围内迅速传播，在短时间内造成高死亡率。我们迫切需要开发一种快速、敏感、经济、高效的病毒检测方法。常规病毒诊断方法主要有：病毒分离培养、抗原抗体检测、电子显微镜检测、组织病理切片检查、核酸检测等。近年来，在传统 PCR 技术基础上发展而来的实时荧光定量 PCR 及基于微流控技术发展而来的数字 PCR 因其具有特异、敏感、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点被广泛应用于病毒核酸检测。此外，新型数字 PCR 灵敏度更高且可以实现病毒核酸检测的绝对定量，更加适用于罕见基因突变检查及低载量病毒核酸检测[1]。因此本文将对两种 PCR 技术的原理、分类、各自在病毒检测领域中的前沿应用及优势对比进行综述。

2. 实时荧光定量 PCR

2.1. 实时荧光定量 PCR 原理

实时荧光定量 PCR 修饰语：实时、荧光、定量。即在传统 PCR 体系中加入荧光物质，在 PCR 扩增过程中，它可以与每一次循环后的产物结合，我们通过收集其发出的荧光信号生成特定的扩增曲线来检测是否有目的基因及推测目的基因的起始拷贝数。

我们以探针法为例解释荧光信号的发出及收集过程：将加入荧光标记的探针与模板 DNA 混合后，高温变性解螺旋，低温复性再配对，探针与模板 DNA 配对的同时被切断，释放荧光素，在紫外线的激发下发出荧光，收集每一次 DNA 复制时的荧光信号进一步形成扩增曲线；一般而言，荧光扩增曲线可分为 4 个时期，即基线期、指数增长期、线性增长期与平台期[2]。最适合分析荧光信号的时期为指数增长期，基线期荧光信号太低，无法分析模板起始拷贝数。线性增长期虽然正在复制，但非指数式增长，相比指数增长期，分析难度更大。平台期同一模板不同条件下的梯度曲线，相对来说更为混乱，不利于分析数

据。相反,在指数增长期,曲线重复率更高且产物对数值与初始模板量存在线性关系,因此,分析数据更为准确可靠。数据分析需要了解两个重要概念:1) 荧光阈值:是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值,它可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上,但一般荧光阈值的缺省设置是 PCR 反应前 3~15 个循环荧光信号标准偏差的 10 倍[3]。2) CT 值(Cycle threshold, 循环阈值):指荧光信号超过阈值时对应的循环数[4]。从某种程度上来说,阈值的设定决定了 CT 值,而 CT 值可以反映目的基因起始拷贝数的大小,两者成负相关[5]。

2.2. 实时荧光定量 PCR 的分类

2.2.1. 实时荧光定量 PCR 定量方法分类

实时荧光定量 PCR 定量方法可以分为绝对定量法和相对定量法。绝对定量主要用于微生物学量化其拷贝数、食品和生物技术量化商品、掺杂物数量等领域,而相对定量主要用于基因组学和转录组学,以及在生物实验中进行基因表达分析等[6]。绝对定量法需要将标准品梯度稀释,待测样本初始拷贝数主要通过将样本 CT 值代入标准曲线来获取,标准曲线横坐标为标准品核酸浓度,纵坐标为标准品相应的 CT 值,通过线性关系代入获得样本起始拷贝数。相对定量法主要原理为将靶基因 Ct 值与对照组的 Ct 值进行对比,结果用靶基因量与对照组靶基因量的比值或差异倍数来表示。现在主要方法有 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法[7] [8], 双标准曲线法[9]等。杨振苹等人[9]建立了一种利用 Taq Man 探针,绘制双标准曲线,检测重组 CHO 细胞中外源基因起始模板量的方法,可用于高重组 CHO 细胞株的筛选和细胞库传代稳定性的检测。

2.2.2. 实时荧光定量 PCR 检测方法分类

实时荧光定量 PCR 检测方法现在主要有染料法、探针法、分子信标法、核酸类似物法等,其中前三种应用更为广泛。常用的 DNA 染料主要有 Hoechst 33258、SYBR Green I、溴化乙锭、SYBR Gold、PicoGreen 等。SYBR Green 因其经济、简便,被广泛应用,其作用原理为 SYBR Green 染料会与每一个新产生的双链 DNA 分子进行结合,荧光强度也会随着 PCR 产物的增加而增加。SYBR Green 染料法的最大缺点在于可能会产生假阳性信号;因为 SYBR Green 染料可与任何的双链 DNA 发生结合,因此也会与非特异性的双链 DNA 序列发生结合,因此应注意做熔融曲线增强其特异性。现在陆续研制出新型染料例如 EvaGreen 染料[10]等,其稳定性,特异性相比 SYBR Green 更强。探针法中目前常用 TaqMan,该探针两端分别为淬灭基团和荧光基团的寡核苷酸,正常情况下两个基团互相抵消,发出的荧光被淬灭,当 DNA 在引物引导下复制时,探针被酶切降解导致荧光基团和淬灭基团分离,荧光信号被释放。分子信标法是 TaqMan 探针的衍生产物,是一种类似发卡结构的茎环寡核苷酸,中间的环序列与目标核酸序列互补,荧光基团和淬灭基团分别连在茎的两端,发光原理类似于 TaqMan 探针。Harsheni 等人[11]发现添加 PCR 增强剂可以增强 PCR 的性能。每种 PCR 添加剂都具有独特的性质,因此启发我们选择合适 PCR 增强剂及更为匹配的 PCR 检测方法也许更有利于 PCR 扩增及目的基因的检测。

3. 数字 PCR 的原理及分类

早在 1992 年, Sykes [12]等人就报道过一种无限稀释模板 PCR,依靠泊松数据统计来更加准确定量样本初始拷贝数的方法,后不断发展创新。数字 PCR 主要原理是:极限稀释模板(当然模板浓度不能过高)分成很多个小的反应单位,每个反应单位都有一个特殊的封装区域,以防止反应器之间的交叉污染。每个反应单位独立进行 PCR 反应,有荧光信号的反应单位标记为 1,无荧光信号的反应单位标为 0,然后收集统计数据[1] [13]。在极限稀释的过程中,不可能每个反应单位恰好为 1 个 DNA 分子,也有可能为 0 或是多个,但是它们的分布符合泊松分布,根据泊松公式[14]即可算出。数字 PCR 目前的分类主要有基于微反应腔室的数字 PCR 系统、基于集成化微流控芯片的数字 PCR 系统以及基于液滴的数字 PCR

系统等[1],随着微流控技术的发展,基于液滴的数字 PCR 系统在提高诊断测试性能方面取得了显著进展,与传统方法相比,液滴的生产更方便,更快速,更精确,成本更低,使得基于液滴的微流体数字 PCR 在过去的几年迅速发展[15]。

4. 普通 PCR 与实时荧光定量 PCR 与数字 PCR 特点对比

普通 PCR、实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 是分子生物学中常用的三种 PCR 技术,它们在核酸扩增及检测方面存在一些不同之处。三种 PCR 技术各自优势对比及主要应用见表 1 [13] [16] [17]。

Table 1. Comparison of normal PCR, real-time fluorescence quantitative PCR and digital PCR

表 1. 普通 PCR、实时荧光定量 PCR 与数字 PCR 的对比

方法	优点	缺点	主要应用
普通 PCR	<ul style="list-style-type: none"> 经典且最为成熟的方法 PCR 所需试剂等经济 PCR 产物及电泳产物可继续做其他分子生物学实验 	<ul style="list-style-type: none"> 准确度低 灵敏度低 操作繁琐 易污染 只能定性分析数据 PCR 后需配备电泳 容易出现假阳性, PCR 产物与目的条带大小相似时难以区分。 	<ul style="list-style-type: none"> 基因测序 分子克隆(例如质粒构建) 基因分型
实时荧光定量 PCR	<ul style="list-style-type: none"> 技术较为成熟,现已广泛应用。 商品化试剂盒很多 准确度、灵敏度、特异度进一步提升 操作简便 可以相对定量分析,可以分析两倍的浓度差别 无需 PCR 后处理 检测初始模板浓度范围大 	<ul style="list-style-type: none"> 依赖于标准曲线定量,误差相对较大 起始拷贝数小的模板检测灵敏度低甚至无法检测 目的基因突变易导致检测失败 受抑制剂影响较大 	<ul style="list-style-type: none"> 病原体检测 病毒的早期分型鉴别 病毒相对定量
数字 PCR	<ul style="list-style-type: none"> 不依赖于标准曲线误差小 实现绝对定量,可以分析微小浓度差别。 对于起始拷贝数低的模板检测效果好 高精密度、高灵敏度、高特异度 受抑制剂影响较小 	<ul style="list-style-type: none"> 由于高精密度的确保,所以极易污染 起始拷贝数不能过高 仪器和试剂昂贵 技术不如前两者成熟,还有许多实验出现假阳性有待考证。 	<ul style="list-style-type: none"> 病毒载荷绝对定量 核酸标准品绝对定量 细菌活菌计数 早期检测罕见基因突变检查 精准分子诊断 肿瘤个性化诊断 食品安全检测 基因表达分析、基因检测、全细胞扩增

5. 实时荧光定量 PCR 及数字 PCR 在病毒检测中的实际应用和对比

5.1. 新型冠状病毒

2019 年 12 月,我国武汉爆发新型冠状病毒肺炎(COVID-19),原因为感染新型冠状病毒(SARS-CoV-2)所致[18],早期感染新型冠状病毒患者会出现急性呼吸窘迫综合征、心脏损害等严重并发症,严重者可致死亡[19] [20] [21]。因此早期和快速诊断在疾病诊治和预防过程中起了重要作用,其中实时荧光定量 PCR

和数字 PCR 在新冠病毒的检测中起了关键作用。实时荧光定量 PCR 因为其技术成熟, 商品化试剂种类多, 灵敏度高, 经济便捷等被认为是新冠病毒检测的“金标准” [22], 但是实时荧光定量 PCR 同样也暴露出了许多问题, 比如: 取样不同而导致病毒检测结果差异、试剂盒不同导致病毒检测结果不同[23]: 例如陈炜等[24]通过使用荧光定量 PCR 对 4 例新冠患者的咽拭子和痰液标本中的基因 ORF 1ab 及 N 基因进行分别检测, 发现咽拭子的基因荧光信号低于痰液标本。Dong 等[25]曾对 75 名密切接触者及 16 例康复者患者做了实时荧光定量 PCR 及数字 PCR 检测比较, 发现对于密切接触者, 其疑似率由 21%显著下降到 1%, 因此数字 PCR 更适合密切接触者和康复者及无症状感染者这种低载量病毒的检测, 同时也可以应用于一些低痕病毒的检测, 比如海关物品表面病毒检测等[26]。Hao Yin 等人[27]率先提出了将液滴数字和快速 PCR 技术结合起来的快速 ddRT-PCR 方法, 能够更为高效、准确、定量地检测 SARS-CoV-2 RNA。此方法通过使用 ORF1ab, N 基因和 RNase P 基因, 优化参考 RNA 样品的快速 ddPCR 的操作参数。对优化系统的性能进行基准测试后发现诊断的准确性与商业检测试剂盒一致。尽管世界卫生组织 5 月 5 日已经宣布新冠病毒感染疫情不再构成“国际关注的突发公共卫生事件”, 但病毒仍在不断变异, 无需 RNA 提取和扩增即可快速、高通量 SARS-CoV-2 RNA 检测仍然是一项关键挑战, Chu Y 等人[28]开发了一种利用微流控生物芯片快速、超灵敏地检测 SARS-CoV-2 的方法, 该方法通过使用多个 DNA 探针对不同浓度 SARS-CoV-2 RNA (10^{-17} , 10^{-18} , 10^{-19} , 10^{-20} M; 50 μ l)进行检测, 发现最低浓度为 10^{-20} M, 大大提高了微流控生物芯片的检测灵敏度, 并且能够满足高通量筛选、低成本、易操作的要求, 有效检测和阻断 COVID-19 的传播。

5.2. 肝炎病毒

在全球超过 350 万人成为乙肝病毒携带者, 约 20 多万人感染乙肝病毒[29], 在我国这个“乙肝大国”的大背景下, 准确检测及治疗乙肝显得尤为重要, 实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 技术都可以应用于对乙肝的确诊, 分型, 以及耐药突变体等检测[30]。其中实时荧光定量 PCR 更适用于乙肝的确诊, 分型等。数字 PCR 因其更高的准确性, 灵敏度, 相比于荧光定量 PCR, 最低检测限度更低, 在慢性肝炎患者中发挥着更重要的作用。丙型肝炎病毒的共价闭合环状 DNA (cccDNA)已成为隐匿性乙型肝炎病毒感染和肝细胞癌的一种新的预后生物标志物[31] [32]。Gian 等人[33]发现在肝内 HBV cccDNA 检测方面, ddPCR 比 qPCR 的灵敏度高 10~100 倍, 所需拷贝数更低, 尽管如此, Yong-Jun Han 等人[34]通过优化双链探针的长度、互补寡核苷酸之间的杂交自由能和粘端长度, 成功利用荧光定量 PCR 检测到了 5 IU/mL 的 HBV DNA, 这表明荧光定量 PCR 对于低拷贝数 DNA 检测仍有一定的潜在价值。

5.3. 流感病毒

流感病毒可以引起全球急性呼吸道感染, 每年可导致全球 300 万-500 万流感相关住院病例及 25 万~30 万死亡病例[35] [36], 其中包括近 38 万 1 岁以下婴幼儿和 87 万 5 岁以下儿童的住院病例[37]。目前数字 PCR 检测流感病毒的文献相对于实时荧光定量较少, 实时荧光定量在检测流感病毒领域比较成熟, 主要用于流感病毒、禽流感病毒的诊断与分型等[38] [39] [40]。近年来, 新型双重及多重 RT-PCR 被广泛应用于快速检测 SARS-CoV-2、甲型/乙型流感病毒以及呼吸道合胞病毒等[41] [42]。数字 PCR 更适用于流感病毒的绝对定量、低浓度流感样本的检测, 针对流感样本或核酸存在降解的流感样本扩增[43]。Yong Yan 等人[44]通过使用逆转录液滴数字 PCR (RT-ddPCR)来动态监测人类 H7N9 感染的病毒载量, 同步进行实时 RT-PCR 技术对比, 实验结果表明, 与实时 RT-PCR 相比, RT-ddPCR 在不使用标准曲线的情况下量化 H7N9 病毒载量方面更加灵敏和准确。存在天然奥司他韦耐药的季节性 H3N2 流感病毒株, 通常在神经氨酸酶的 119 位基因上发生谷氨酸到缬氨酸的替换(E119V-NA), 早期检测抗奥司他韦性流感病毒对病

人管理和快速遏制抗病毒性非常重要, Laura A E Van Poelvoorde 等人[45]开发了一种逆转录酶数字 PCR 测定(RT-ddPCR)的方法来检测和量化 E119V-NA 突变的频率。其对耐药流感病毒的检测和量化提供了一种新的技术路线。

5.4. EB 病毒

1964 年,在伯基特淋巴瘤的活组织检查中发现并分离出 EB 病毒(epstein-barrvirus, EBV) [46]。EB 病毒与鼻咽癌、淋巴瘤、胃癌等疾病密切相关,目前 EB 病毒的检测技术主要有 EBV 细胞培养检测、EBV 血清学检测、EBV 抗原抗体亲和力和检测、EBV 原位杂交检测、EBV 嗜异性抗体检测、EBV 特异性抗体检测、EBV 核酸载量检测等[47]。其中核酸检测是目前诊断 EB 病毒导致疾病的最常用的方法[48]。荧光定量 PCR 检测 EBV-DNA 已广泛运用于 EBV 相关疾病的诊断、治疗方案的选择、疗效判定、病情检测及预后判定等[49]。林卫虹等人[50]收集 229 例疑似 EB 病毒感染患者的血液标本,对同一份血浆标本的 EB 病毒同时采用数字 PCR 和荧光定量 PCR 两种方法测定其 DNA 载量,结果显示采用 qPCR 方法有 58.26% (67/115) EBV 阳性患者被漏诊,表明对于低载量的 EB 病毒检测, ddPCR 检测灵敏度高于 qPCR。这与王心仪等人检测西南地区 510 例 EB 病毒载量的结果一致[51]。同样, M. C. Siciliano 等人[52]通过使用 ddPCR 方法检测一大型 EBV 阴性 B 细胞淋巴瘤队列中发现,几个传统上被归类为 EBV 阴性的罕见肿瘤细胞中存在 EBV DNA。并推测这种“EB 病毒逃逸机制”可能与 Timp2 和 Eya1 基因的甲基化有关。

6. 结语与展望

实时荧光定量 PCR 以其灵敏度高、特异性强、经济便捷以及成熟商品化试剂盒等优势在病毒的早期检测、病毒分型、病毒鉴别等领域被广泛应用。同时数字 PCR 因其更高灵敏度及特异度、可以实现绝对定量来检测微小浓度差异等新型优势可以弥补甚至代替荧光定量 PCR 技术。但因其成本过高,目前国内成熟商品化试剂盒较少,作为一门新技术,在国内尚有许多不足需要改进,随着科学技术的不断进步,我们可以预测更多基于数字 PCR 的系统将被开发和商业化。同时随着新冠病毒的大流行,为快速进行临床诊断,PCR 试剂盒的小型化以及便携式 PCR 系统的开发将进一步发展。

基金项目

1) 山东省自然科学基金资助项目(ZR2018PH009); 2) 济宁医学院附属医院博士科研启动基金(2017-BS-15)。

参考文献

- [1] 李慧调, 潘建章, 方群. 数字 PCR 技术的发展及应用[J]. 化学进展, 2020, 32(5): 581-593.
- [2] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 1-3+8.
- [3] 安钢力. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用[J]. 中国现代教育装备, 2018(21): 19-21.
- [4] 李萌, 李雪, 郑志强. 实时荧光定量 PCR 技术的应用及研究进展[J]. 饲料博览, 2018, 28(7): 94.
- [5] 王玉倩, 薛秀花. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 生物学通报, 2016, 51(2): 1-6.
- [6] Harshitha, R. and Arunraj, D.R. (2021) Real-Time Quantitative PCR: A Tool for Absolute and Relative Quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **49**, 800-812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>
- [7] Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., et al. (2013) An Improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, **3**, 71-85.
- [8] Feng, S., Tan, H., Ling, H., et al. (2011) Detecting Overexpression Level of HER2 Gene in NSCLC by Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Chinese Journal of Lung Cancer*, **14**, 938-942.
- [9] 杨振苹, 邢体坤, 宋路萍, 等. TaqMan 荧光定量 PCR 法检测 CHO 细胞中外源基因拷贝数的方法建立[J]. 中国当

- 代医药, 2023, 30(2): 15-19.
- [10] 康凌宇, 倪忠, 武俊明, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在生物饲料中的应用[J]. 中国饲料, 2021(1): 82-88.
- [11] Karunanathie, H., Kee, P.S., Ng, S.F., *et al.* (2022) PCR Enhancers: Types, Mechanisms, and Applications in Long-Range PCR. *Biochimie*, **197**, 130-143. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>
- [12] Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., *et al.* (1992) Quantitation of Targets for PCR by Use of Limiting Dilution. *Biotechniques*, **13**, 444-449.
- [13] Kojabad, A.A., Farzanehpour, M., Galeh, H.E.G., *et al.* (2021) Droplet Digital PCR of Viral DNA/RNA, Current Progress, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of Medical Virology*, **93**, 4182-4197. <https://doi.org/10.1002/jmv.26846>
- [14] Majumdar, N., Banerjee, S., Pallas, M., *et al.* (2017) Poisson plus Quantification for Digital PCR Systems. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 9617. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09183-4>
- [15] Bai, Y., Gao, M., Wen, L., *et al.* (2018) Applications of Microfluidics in Quantitative Biology. *Biotechnology Journal*, **13**, e1700170. <https://doi.org/10.1002/biot.201700170>
- [16] 田昌敏, 杨祥良, 杨海. 基于微流控技术的数字 PCR 的发展及其应用[J]. 微纳电子技术, 2023, 60(4): 496-507.
- [17] Sidstedt, M., Rådström, P. and Hedman, J. (2020) PCR Inhibition in qPCR, dPCR and MPS-Mechanisms and Solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **412**, 2009-2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- [18] 中华人民共和国国家卫生健康委员会办公厅, 中华人民共和国国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)[J]. 中国医药, 2022, 17(4): 481-487.
- [19] Chen, N., Zhou, M., Dong, X., *et al.* (2020) Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study. *The Lancet*, **395**, 507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- [20] Malik, Y.S., Sircar, S., Bhat, S., *et al.* (2020) Emerging Novel Coronavirus (2019-nCoV)-Current Scenario, Evolutionary Perspective Based on Genome Analysis and Recent Developments. *Veterinary Quarterly*, **40**, 68-76. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1727993>
- [21] Hui, D.S., Madani, T.A., *et al.* (2020) The Continuing 2019-nCoV Epidemic Threat of Novel Coronaviruses to Global Health—The Latest 2019 Novel Coronavirus Outbreak in Wuhan, China. *International Journal of Infectious Diseases*, **91**, 264-266. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009>
- [22] 王雪宁, 朱元首, 江何伟, 等. 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的检测技术[J]. 生命的化学, 2020, 40(8): 1258-1269.
- [23] 胡思宏, 游国叶. 数字 PCR 在新型冠状病毒检测中的应用前景[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6): 674-679.
- [24] 陈炜, 张春阳, 朱颖, 等. 4 例新型冠状病毒感染病例咽拭子与痰标本病毒核酸检测的比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(5): 354-358.
- [25] Dong, L., Zhou, J., Niu, C., *et al.* (2021) Highly Accurate and Sensitive Diagnostic Detection of SARS-CoV-2 by Digital PCR. *Talanta*, **224**, Article ID: 121726. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121726>
- [26] Ternovoi, V.A., Lutkovsky, R.Y., Ponomareva, E.P., *et al.* (2020) Detection of SARS-CoV-2 RNA in Nasopharyngeal Swabs from COVID-19 Patients and Asymptomatic Cases of Infection by Real-Time and Digital PCR. *Kliničeskaja Laboratornaja Diagnostika*, **65**, 785-792. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-785-792>
- [27] Yin, H., Wu, Z., Shi, N., *et al.* (2021) Ultrafast Multiplexed Detection of SARS-CoV-2 RNA Using a Rapid Droplet Digital PCR System. *Biosensors and Bioelectronics*, **188**, Article ID: 113282. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113282>
- [28] Chu, Y., Qiu, J., Wang, Y., *et al.* (2022) Rapid and High-Throughput SARS-CoV-2 RNA Detection without RNA Extraction and Amplification by Using a Microfluidic Biochip. *Chemistry*, **28**, e202104054. <https://doi.org/10.1002/chem.202104054>
- [29] Wu, B., Xiao, F., Li, P., *et al.* (2017) Ultrasensitive Detection of Serum Hepatitis B Virus by Coupling Ultrafiltration DNA Extraction with Real-Time PCR. *PLOS ONE*, **12**, e0170290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170290>
- [30] 徐贺. 实时荧光 PCR 定量检测乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸的检测及临床意义[J]. 心理医生, 2017, 23(28): 171-172.
- [31] Bhat, S.A. and Kazim, S.N. (2022) HBV cccDNA-A Culprit and Stumbling Block for the Hepatitis B Virus Infection: Its Presence in Hepatocytes Perplexed the Possible Mission for a Functional Cure. *ACS Omega*, **7**, 24066-24081. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02216>
- [32] He, P., Zhang, P., Fang, Y., *et al.* (2023) The Role of HBV cccDNA in Occult Hepatitis B Virus Infection. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04660-z>
- [33] Caviglia, G.P., Abate, M.L., Tandoi, F., *et al.* (2018) Quantitation of HBV cccDNA in Anti-HBc-Positive Liver Do-

- nors by Droplet Digital PCR: A New Tool to Detect Occult Infection. *Journal of Hepatology*, **69**, 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.021>
- [34] Han, Y.J., Liu, L.Y., Liu, Q.Q., *et al.* (2022) Optimization and Performance Evaluation of Double-Stranded Probe in Real-Time PCR. *Analytical Biochemistry*, **650**, Article ID: 114711. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114711>
- [35] Paules, C. and Subbarao, K. (2017) Influenza. *The Lancet*, **390**, 697-708. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30129-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30129-0)
- [36] Nypaver, C., Dehlinger, C. and Carter, C. (2021) Influenza and Influenza Vaccine: A Review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, **66**, 45-53. <https://doi.org/10.1111/jmwh.13203>
- [37] Lafond, K.E., Nair, H., Rasooly, M.H., *et al.* (2016) Global Role and Burden of Influenza in Pediatric Respiratory Hospitalizations, 1982-2012: A Systematic Analysis. *PLOS Medicine*, **13**, e1001977. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002060>
- [38] 陈淑蕾, 张海文, 王学梅, 等. 禽流感病毒的核酸分子诊断技术研究进展[J]. 养禽与禽病防治, 2019(3): 2-8.
- [39] 高鑫, 朱武洋, 卢学新. 实时荧光定量 PCR 在病毒检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(7): 660-667.
- [40] 胡瑞, 张艳亮, 张娟. 甲、乙型流感病毒检测方法的研究进展[J]. 系统医学, 2023, 8(2): 178-182, 198.
- [41] Chung, H.Y., Jian, M.J., Chang, C.K., *et al.* (2021) Novel Dual Multiplex Real-Time RT-PCR Assays for the Rapid Detection of SARS-CoV-2, Influenza A/B, and Respiratory Syncytial Virus Using the BD MAX Open System. *Emerging Microbes & Infections*, **10**, 161-166. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1873073>
- [42] Yun, J., Park, J.H., Kim, N., *et al.* (2021) Evaluation of Three Multiplex Real-Time Reverse Transcription PCR Assays for Simultaneous Detection of SARS-CoV-2, Influenza A/B, and Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Swabs. *Journal of Korean Medical Science*, **36**, e328. <https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e328>
- [43] 冯兆民, 赵翔, 邹晓辉, 等. 基于微滴式数字 PCR 技术的甲型流感病毒绝对定量方法的建立及应用[J]. 病毒学报, 2017, 33(1): 1-5.
- [44] Yan, Y., Jia, X.J., Wang, H.H., *et al.* (2016) Dynamic Quantification of Avian Influenza H7N9(A) Virus in a Human Infection during Clinical Treatment Using Droplet Digital PCR. *Journal of Virological Methods*, **234**, 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.04.001>
- [45] Van Poelvoorde, L.A.E., Dufasne, F.E., Van Gucht, S., *et al.* (2023) Development of Digital Droplet PCR Targeting the Influenza H₃N₂ Oseltamivir-Resistant E119V Mutation and Its Performance through the Use of Reverse Genetics Mutants. *Current Issues in Molecular Biology*, **45**, 2521-2532. <https://doi.org/10.3390/cimb45030165>
- [46] Balfour, H.H., Schmeling, D.O. and Grimm-Geris, J.M. (2020) The Promise of a Prophylactic Epstein-Barr Virus Vaccine. *Pediatric Research*, **87**, 345-352. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0591-5>
- [47] Abusalah, M.A.H., Gan, S.H., Al-Hatamleh, M.A.I., *et al.* (2020) Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein-Barr Virus. *Pathogens*, **9**, 226. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030226>
- [48] 祁春茹, 周向红, 张振兴, 等. 呼吸道感染性疾病患儿 3192 例 EB 病毒血清学和核酸检测结果分析[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(7): 1054-1056.
- [49] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会鼻咽癌标志物专家委员会. 鼻咽癌标志物临床应用专家共识[J]. 中国癌症防治杂志, 2019, 11(3): 183-193.
- [50] 林卫虹, 叶俊凯, 罗景燕, 等. 数字 PCR 和荧光定量 PCR 技术在 EB 病毒核酸定量检测中的应用比较[J]. 中国处方药, 2022, 20(6): 142-144.
- [51] 王心仪, 周娟, 刘颖, 等. 基于 ddPCR 技术分析 EB 病毒载量特征及与 qPCR 技术的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(4): 431-434, 439.
- [52] Siciliano, M.C., Tornambè, S., Cevenini, G., *et al.* (2022) EBV Persistence in Gastric Cancer Cases Conventionally Classified as EBER-ISH Negative. *Infectious Agents and Cancer*, **17**, Article No. 57. <https://doi.org/10.1186/s13027-022-00469-5>