应用数字PCR检测环境中微量新型冠状病毒残留

孙婷婷¹, 姜艳芳², 宫平¹, 于源华^{1*}

1. 长春理工大学理学院, 长春 130022;

2. 吉林大学白求恩第一医院, 长春 130022

* 联系人, E-mail: 2019200032@mails.cust.edu.cn

2020-11-17 收稿, 2021-01-12 修回, 2021-01-12 接受, 2021-01-13 网络版发表

吉林省新冠肺炎疫情防控应急科研攻关专项(20200901014SF)资助

摘要 新型冠状病毒(2019-nCoV)席卷全球, 目前仍处于高发阶段. 高灵敏、高准确率的核酸分子诊断技术及方法, 成为全球攻关热点. 本研究基于微滴式数字PCR检测技术, 利用巢式PCR原理, 开发了检测试剂, 建立了检测方法. 对333个新型冠状病毒肺炎临床患者及所在环境样本进行了应用检测, 与实时荧光定量PCR(RT-PCR)进行对比分析. 本研究建立的微滴式数字PCR方法的线性范围在25~5 copies/ μ L之间, 最低检出限可达0.5 copies/ μ L, 高于市售实时荧光定量PCR检测技术的2~3个数量级. 在333例样本中, 环境样本197例中检测出7例阳性, 人源样本136例中检测出9例阳性, 检测准确度可达100%, 并且检测出了RT-PCR无法检测的环境中微量病毒残留. 本研究建立的数字PCR检测方法具有高度特异性, 最低检出限远远低于RT-PCR. 对疑似2019-nCoV感染者、早期感染者以及环境中微量病毒灵敏准确检测具有重大意义.

关键词 新型冠状病毒(2019-nCoV), 微滴式数字PCR, 巢式PCR, 早期2019-nCoV感染者, 微量病毒残留

2019年12月病毒肺炎大量出现, 经高通量测序分析该肺炎是由新型冠状病毒(2019-nCoV)引起的呼吸综合征, 因此被称为新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)^[1,2]. 2019-nCoV是一种RNA病毒, 它与中东呼吸综合征相关冠状病毒(Middle East respiratory syndrome-related coronavirus, MERSr-CoV)、严重急性呼吸综合征相关冠状病毒(severe acute respiratory syndrome-related coronavirus, SARSr-CoV)同属于 β 冠状病毒属^[1], 但基因特征具有明显差异, 导致传染性、致病严重性等方面的不同. 《第六版新冠肺炎诊疗指南》表明, 2019-nCoV主要通过呼吸道飞沫传播和密切接触传播, 长时间暴露于封闭空间内的高浓度气溶胶亦有传播的可能性, 传染性较强, 对公共卫生安全和人类健康有很大的威胁. 其感染的临床症状主要是发热, 可合并干咳、乏力、呼吸不畅等症状, 流涕、咳

嗽等其他症状少见^[3], 严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出现凝血功能障碍等^[4].

目前对病毒RNA检测方法有很多种, 包括实时荧光定量PCR(RT-PCR)^[5]、胶体金检测^[6]、化学发光检测^[7]等. 其中胶体金检测和化学发光检测需要使用2019-nCoV的单克隆抗体, 而对2019-nCoV单克隆抗体的制备存在周期长、制备复杂和易污染等问题, 因此对检测2019-nCoV, 上述两种方法不易建立. PCR技术因其具有的优越性, 广泛地应用在辅助医学临床诊断^[4]、海关检验检疫^[8]、新型农业发展^[9]、国防军事防御^[10]和生物科学^[11]的基础研究等方面. 但是RT-PCR技术中对目的DNA片段的定量仍旧属于相对定量. 由于该技术在实验进行中主要依靠CT值和标准曲线来对目

引用格式: 孙婷婷, 姜艳芳, 宫平, 等. 应用数字PCR检测环境中微量新型冠状病毒残留. 科学通报, 2021, 66: 1653–1662

Sun T T, Jiang Y F, Gong P, et al. Detection of microamounts of novel coronavirus residues in environment by digital PCR (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 1653–1662, doi: 10.1360/TB-2020-1026

的DNA进行定量,影响整个体系的扩增效率,使反应体系的灵敏度和精确度都受到很大的影响。

由于2019-nCoV病毒的传染性极强^[12,13],因此在检测时要求检测方法的灵敏度,这符合数字PCR(droplet digital PCR system, ddPCR)的特点。ddPCR具有绝对定量、高特异性、高灵敏度和较强的抗干扰能力等优点,可以更好地将分子生物学和医学紧密地结合起来,在检测2019-nCoV方面具有巨大优势。而巢式PCR^[14]是一种PCR的变式,使用两对引物扩增完整的片段。在第一对普通引物的基础上,设计巢式引物使得此次扩增的片段短于第一次扩增。可以达到如果第一次扩增产生了错误片段,则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低的效果。本研究建立的ddPCR检测方法最低检出限可达到0.5 copies/ μ L,比市面上现有的RT-PCR试剂盒高出的2~3个数量级,同时成功应用于临床样本的检测。

1 材料与方法

(i) 2019-nCoV样本来源。333个样本来自吉林大学白求恩第一医院,均为2020年1~5月基因诊断中心核酸检测后剩余样本,使用该样本同时进行数字PCR及荧光定量PCR检测。其中环境样本197例,人源样本136例。环境样本为新型冠状病毒肺炎患者隔离区内空气、墙壁物体表面等。人源主要样本类型为鼻咽拭子、咽喉拭子、痰液、血浆、全血、眼结膜和口咽拭子等。

(ii) 引物、探针序列。根据中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供的新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列。Target 1(*ORF 1ab*): (F), CCCTGTGGGTTTACACTTAA; (R), ACGATTGTGCATCAGCTGA, (P), 5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGGBHQ1-3'。Target 2(*N*): (F), GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAT; (R), CAGACATTTTGTCTCTCAAGCTG; (P), 5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'。内参: (F), TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG; (R), CAGCGTCAAAGGTGGAGGAGT, (P), 5'-VIC-CCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACT-BHQ2-3'。上述引物和探针均由生工生物工程有限公司(以下简称上海生工)合成。

(iii) 质控品制备。在上海生工合成分别带有*ORF 1ab*(675 bp)和*N*基因(1260 bp)的质粒作为阳性质控品,质粒分别稀释为50、25、10、5、2 copies/ μ L灵敏度质

控品。取患有病毒性流感患者的基因组作为特异性质控品进行检测。将拷贝数稀释到1000 copies/ μ L。

(iv) RNA提取。口咽拭子和鼻咽拭子可直接用于核酸提取;血液1500 $\times$ g离心10 min,离心后冰浴3~5 min,吸取血浆提取核酸;痰液:先在55 $^{\circ}$ C下孵育15 min后再进行病毒灭活。使用核酸自动提取仪EX3600(之江生物,上海)进行RNA提取。

(v) 实时荧光定量PCR检测。使用新型冠状病毒WH2019核酸测定试剂盒(荧光PCR法)进行样本检测。

(vi) ddPCR反应体系和反应条件。预扩增总反应体系25 μ L, 1.25 μ L CS-SARS-COV-2(引物100 μ mol/L), 12.5 μ L CS-mix, 1.25 μ L CS-酶, 10 μ L RNA。预扩增程序为: (55 $^{\circ}$ C 15 min); (95 $^{\circ}$ C 30 s); (95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s) $\times$ 8循环; (12 $^{\circ}$ C 5 min)。

ddPCR反应体系20 μ L, 4 μ L ddPCR-A或B(*ORF 1ab*或*N*, 引物100 μ mol/L, 探针10 μ mol/L), 10 μ L ddPCR MIX3, 预扩增产物3 μ L, 补水至20 μ L。20 μ L反应体系与70 μ L的探针型微滴发生油(bio-rad)生成微滴进行扩增。扩增程序: (95 $^{\circ}$ C 10 min); (94 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 60 s) $\times$ 40循环,升降温速度应 $\leq$ 2 $^{\circ}$ C/s; (98 $^{\circ}$ C 10 min); (4 $^{\circ}$ C 5 min)。结束后将微滴全部注入平铺芯片(长春技特生物技术有限公司,长春)中密封并读取。

(vii) ddPCR反应体系及反应程序优化。根据巢式PCR原理,预扩增PCR为常规PCR的退火温度,无须进行优化。ddPCR根据PCR反应体系以准确度质粒、阴性基因组DNA为模板进行复性温度实验。复性温度分别设为: 56、58、60及62 $^{\circ}$ C。比较不同复性温度间检测结果的差异性。

(viii) ddPCR样本检测及方法学对比。根据建立的ddPCR检测方法对333例样本核酸进行检测,同时将检测结果与上海之江新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒的检测结果进行对比。

2 实验结果

2.1 ddPCR结果判读

实验有效性判定: (1) 阴性对照结果的判定。“ch1+ch2-”区的点为0个,且落在“ch2+”区的点 $\leq$ 5个。(2) 阳性对照结果的判定。落在“ch1+ch2-”区的点 $\geq$ 3个。(3) 有效结果的判定。每个反应管的总微滴数应 $\geq$ 8000,若总微滴数 $<$ 8000,该反应孔的微滴生成则不理想,需重新进行微滴生成。样本阳性判断原则如表1。

表 1 2019-nCoV数字PCR检测判断标准^{a)}

Table 1 2019-nCoV digital PCR detection criteria

SARS-COV-2 ddPCR A	SARS-COV-2 ddPCR B	样本结果判定
+	+	+
-	-	低于检出限
SARS-COV-2 ddPCR A或B检测结果一个为阳、一个为阴		复检, 建议对标本重新进行一次核酸提取, 并与该标本前一次提取的核酸同时扩增检测, 结合2次检验, 2个反应液可判断为阳性, 则可报告阳性, 否则应报告“可疑”
SARS-COV-2 ddPCR A或B检测结果一个阳性、一个落在“ch1+ch2-”区的点1~2个		
SARS-COV-2 ddPCR A或B检测结果均为落在“ch1+ch2-”区的点1~2个		
SARS-COV-2 ddPCR A或B检测结果一个阴性、一个落在“ch1+ch2-”区的点1~2个		

a) “+”表示阳性结果; “-”表示阴性结果; 当2个反应液检测的基因位点扩增结果无反应, 可能是病毒载量低于检出限, 应结合临床分析. 当临床体征及其他检查高度怀疑SARS-COV-2感染时, 建议重新采集标本或更换部位采集标本再次检测

2.2 退火温度优化

从图1中可以看出, 退火温度对*ORF 1ab*基因 FAM光影响较小, 3种退火温度没有显著的差异, 而VIC光下58℃时野生型与空微滴区分较为明显. 对*N*基因来说, FAM光和VIC光均在58℃时分散明显, 易划分阈值, 因此决定退火温度定为58℃.

2.3 特异性实验

使用优化好的反应体系对特异性质控品和2019-nCoV阳性患者基因组进行检测, 结果如表2所示.

2.4 重复性实验

通过重复检测进行ddPCR重复性实验, 结合定量分析结果的变异系数(coefficient of variation, CV)对该方法的准确性进行判定. 结果显示, *ORF 1ab*基因CV为0.064, *N*基因CV为0.054, 具有良好的重复性, 如表3所示.

2.5 RT-PCR与ddPCR灵敏度试验与线性关系

根据建立的ddPCR检测方法, 进行了最低检出限的确定试验, 如图2所示. 本方法最低检出限可以达到

图 1 (网络版彩色)退火温度优化. (a) *ORF 1ab*基因FAM光; (b) *ORF 1ab*基因VIC光; (c) *N*基因FAM光; (d) *N*基因VIC光
Figure 1 (Color online) T_m optimization. (a) *ORF 1ab* gene FAM; (b) *ORF 1ab* gene VIC; (c) *N* gene FAM; (d) *N* gene VIC

表 2 数字PCR特异性试验数据结果

Table 2 Results of digital PCR specificity test data

检测类型	FAM		VIC
	拷贝数(copies/ μ L)	Ch1+Ch2-象限点数	拷贝数(copies/ μ L)
特异性质控品	0.00	0	27.5
2019-nCoV阳性基因组	0.00	0	30.6

表 3 重复性试验结果

Table 3 Results of repetitive test

质控品拷贝数 (copies/ μ L)	ORF 1ab			N基因		
	拷贝数(copies/ μ L)	微滴数	阳性微滴数	拷贝数(copies/ μ L)	微滴数	阳性微滴数
10	11.66146	24212	284	9.7124	18542	182
10	10.557	19614	206	10.4488	10533	110
10	12.43958	12457	154	10.693	18705	197
10	11.4733	19186	220	9.9931	26031	260
10	12.1603	21394	260	10.683	18723	201
10	10.4723	19108	200	9.2957	20449	190
10	11.157	17910	200	9.5215	21015	204
10	11.799	16951	204	9.6091	17700	176
10	12.716	23593	300	9.8583	16238	160
10	11.9169	23510	280	9.2698	19427	184
CV=0.063851435				CV=0.054017186		

0.5 copies/ μ L, 在此拷贝数下RT-PCR无法检测. 因此对早期无法确诊患者可以达到确诊目的.

根据建立的ddPCR检测方法和RT-PCR对2019-nCoV的ORF 1ab基因和N基因进行检测. 检测核酸的拷贝数分别为25和5 copies/ μ L, 检测结果如图3, 4. 通过实验对比RT-PCR与ddPCR在灵敏度和最低检出限可以看出, ddPCR灵敏度明显高于RT-PCR, 且最低检出限远远低于RT-PCR. 当核酸在25 copies/ μ L时, RT-PCR与ddPCR均能检测出明显阳性信号, 在5 copies/ μ L时RT-PCR检测出阳性信号较弱. 并且CT值较大, 扩增反应发生较晚, 而ddPCR阳性信号依然明显, 且不会因为扩增反应发生时间影响结果.

2.6 临床样本检出分析

在检测的333例样本中, 197例环境样本中检测出7例阳性, 136例人源样本中检测出9例阳性. 其中WK-13、2FHSZLJ、M12、M15和FJXT-5样本经复检确定为阳性, 实验结果见表4. 可以明显看出, ddPCR相比RT-

PCR更加灵敏, 对微量病毒残留也可以检测.

3 讨论与结论

本研究采用微滴式数字PCR技术结合巢式PCR原理, 用于体外定性检测2019-nCoV感染的肺炎疑似及其各类需要进行冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者的咽拭子、痰液、咽拭子、痰液、血液或眼结膜样本中的新型冠状病毒(SARS-COV-2)ORF 1ab和N基因. 在对临床样本检测时发现, 由于环境样本中病毒微量的特殊性, 只有当病毒达到一定量时使用RT-PCR可以检测出. 对ddPCR来说, 这个检测的最低检出限比RT-PCR低, 因此可以检测出环境中极微量的病毒残留. 另外, 对新型冠状病毒肺炎的患者来说, 人体不同组织中病毒含量不同, 并不是所有部位都可以检测. 例如使用RT-PCR, 同一个阳性患者不同样本类型的鼻咽拭子和口咽拭子等可以检测出阳性信号, 对血浆和痰液来说使用该方法则无法检测, 而ddPCR则可以在血浆和痰液等样本类型中检测出阳性信号.

图 2 (网络版彩色)最低检出限对比。(a) ddPCR中*ORF 1ab*特异性区域;(b) ddPCR中*N*特异性区域;(c) RT-PCR中*ORF 1ab*特异性区域和*N*特异性区域

Figure 2 (Color online) Comparison of minimum detection limit. (a) *ORF 1ab* specific region in ddPCR; (b) *N* specific region in ddPCR; (c) *ORF 1ab* specific region and *N* specific region in RT-PCR

图3 (网络版彩色)核酸拷贝数为25 copies/ μ L时的灵敏度对比. (a) ddPCR中ORF1ab特异性区域; (b) ddPCR中N特异性区域; (c) RT-PCR中ORF1ab特异性区域和N特异性区域

Figure 3 (Color online) Comparison of sensitivity under nucleic acid copy number 25 copies/ μ L. (a) ORF1ab specific region in ddPCR; (b) N specific region in ddPCR; (c) ORF1ab specific region and N specific region in RT-PCR

图 4 (网络版彩色)核酸拷贝数为5 copies/ μL 时的灵敏度对比。(a) ddPCR中 $ORF1ab$ 特异性区域;(b) ddPCR中 N 特异性区域;(c) RT-PCR中 $ORF1ab$ 特异性区域和 N 特异性区域

Figure 4 (Color online) Comparison of sensitivity under nucleic acid copy number 5 copies/ μL . (a) $ORF1ab$ specific region in ddPCR; (b) N specific region in ddPCR; (c) $ORF1ab$ specific region and N specific region in RT-PCR

表 4 临床样本(环境样本、人源样本)检测结果对比统计^{a)}

Table 4 Comparative statistics of test results of clinical samples (environmental samples, human samples)

			RT-PCR		ddPCR			
		样本名称	CT值		阳性微滴数		拷贝数(copies/μL)	
样本类型			ORF 1ab基因	N基因	ORF 1ab基因	N基因	ORF 1ab基因	N基因
环境样本	污染区1空气	WK-13	No Cq	No Cq	6	0	0.26	0
	污染区2空气	WK-16	+	No Cq	6	6	0.343	0.896
	污染区3空气	2FHSZWB	+	No Cq	4	11	0.416	0.954
	污染区垃圾桶	2FHSZLJ	No Cq	No Cq	2	0	0.166	0
	污染区1马桶按钮	M12	No Cq	No Cq	2	0	0.0547	0
	污染区2马桶按钮	M14	No Cq	No Cq	3	14	0.0363	0.51
	污染区3马桶按钮	M15	No Cq	No Cq	8	0	0.55	0
	剩余190例		No Cq	No Cq	0	0	0	0
人源样本	患者1鼻咽拭子	BY1	+	+	3445	8640	327.5	564.9
	血浆	XJ1	No Cq	No Cq	3	59	0.133	2.955
	患者2鼻咽拭子	BY2	+	+	71	130	4.464	6.674
	患者1口咽拭子	FJXKY2	+	+	4	7	0.178	0.326
	患者1痰拭子	FJXT2	+	+	9653	11998	840.936	908.756
	患者2口咽拭子	HXYKY2	No Cq	No Cq	14	61	0.623	2.933
	患者3口咽拭子	WYQKY2	+	+	39	104	2.334	4.806
	患者1口咽	FJXKY-5	No Cq	No Cq	82	103	4.547	7.759
	患者1痰	FJXT-5	No Cq	No Cq	14	1	5.957	0.822
	剩余127例		No Cq	No Cq	0	0	0	0

a) “+”表示阳性结果

本研究建立的数字PCR检测方法可实现对疑似SARS-COV-2感染者、早期感染者以及环境中微量病毒灵敏诊断。该方法对不同样本类型(咽拭子、痰液、血

液或眼结膜样本等)的检测与目前采用的RT-PCR相比可达到准确度高、灵敏度高和特异性强等特点,为今后数字PCR的临床诊断新技术的开发及产业化提供基础。

参考文献

- Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 457–460
- Ji W, Wang W, Zhao X, et al. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol*, 2020, 92: 433–440
- Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*, 2020, 382: 1199–1207
- Shi H S, Han X Y, Fan Y Q, et al. Radiologic features of patients with 2019-nCoV infection. *Clin Radiol*, 2020, 39: 8–11
- Nitsche A, Steuer N, Schmidt C A, et al. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem*, 1999, 45: 1932–1937
- Tan S K, Shen P, Lefterova M I, et al. Transplant virus detection using multiplex targeted sequencing. *J Appl Lab Med*, 2018, 2: 757–769
- Dufour D R, Talastas M, Fernandez M D A, et al. Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis C antibody detection. *Clin Chem*, 2003, 49: 940–944
- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol Med*, 2002, 8: 257–260
- Wei X X, Li X Z, Tong G X, et al. Technique and application of real-time fluorescent quantitative PCR in diagnosis of aquatic animal virosis: A

- review. *Fish Sci*, 2010, 29: 681–687
- 10 Li J M. Real-time Fluorescent PCR Technique (in Chinese). Beijing: Wilitary Science Publishing House, 2007 [李金明. 实时荧光PCR技术. 北京: 人民军医出版社, 2007]
  - 11 Chen X, Qi F K, Kang L G, et al. Advance and application of real-time fluorescent quantitative PCR. *J Northeast Agric Univ*, 2010, 41: 148–155
  - 12 Li T S, Cao W, Weng L, et al. Diagnosis and clinical management of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infection: An operational recommendation of Peking Union Medical College Hospital (V2.0). *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 582–585
  - 13 Qiu Y Y, Wang S Q, Wang X L, et al. Epidemiological analysis on a family cluster of COVID-19. *J Epidemiol*, 2020, 41: 506–509
  - 14 Zhang M, Li Q, Zhou H J, et al. Establishment and application of nested PCR amplification method for the whole genome of HBV with the low copy. *J Lab Med*, 2018, 33: 44–49

Summary for “应用数字PCR检测环境中微量新型冠状病毒残留”

Detection of microamounts of novel coronavirus residues in environment by digital PCR

Tingting Sun¹, Yanfang Jiang², Ping Gong¹ & Yuanhua Yu^{1*}

¹ School of Sciences, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China;

² The First Bethune Hospital of Jilin University, Changchun 130022, China

* Corresponding author, E-mail: 2019200032@mails.cust.edu.cn

2019 novel coronaviruses (2019-nCoV) swept the world and are still at a high incidence stage. Highly sensitive and accurate nucleic acid molecular diagnostic techniques and methods have become a hot spot of global concern. 2019-nCoV is a kind of RNA virus. At present, there are many methods to detect virus RNA, including real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR), colloidal gold detection, chemiluminescence detection, and so on. Colloidal gold detection and chemiluminescence detection need to use monoclonal antibodies against 2019-nCoV, but there are some problems in the preparation of 2019-nCoV monoclonal antibodies, such as long cycle, complex preparation and easy pollution. So the above two methods are not easy to be established for the detection of 2019-nCoV. The superiority of PCR technology is widely used in auxiliary medical clinical diagnosis, customs inspection and quarantine, the development of new agriculture, national defense military defense, and basic research of bioscience, and so on. However, the quantification of the target DNA fragment in RT-PCR is still relatively quantitative. Because this technique mainly depends on CT value and standard curve to quantify the target DNA in the experiment, which affects the amplification efficiency of the whole system, and the sensitivity and accuracy of the reaction system are greatly affected. Because the 2019-nCoV virus is highly contagious, the detection methodology is required to be highly sensitive, which is in line with the characteristics of digital PCR (droplet digital PCR system, referred to as ddPCR). ddPCR has the advantages of absolute quantification, high specificity, high sensitivity and strong interference ability, which can better combine molecular biology and medicine closely, and has a great advantage in the detection of 2019-nCoV. In this study, based on droplet digital PCR detection technology, the detection reagent and method were established using the principle of nested PCR. The Saliva of 333 2019-nCoV patients and their environmental samples were detected and compared with real-time PCR (RT-PCR). The linear range of the droplet digital PCR method established in this study was between 25–5 copies/ μL , and minimum detection limit was 0.5 copies/ μL , which was 2–3 orders of magnitude higher than that of the commercial real-time fluorescent quantitative PCR detection technology. In 333 samples, 7 were positive in 197 environmental samples, and 9 were positive in 136 human samples. The detection accuracy was 100%, and the environmental micro-virus residues that could not be detected by RT-PCR were detected. The digital PCR detection method established in this study was highly specific, and the minimum detection limit was far lower than that of RT-PCR. It is of great significance for sensitive and accurate detection of 2019-nCoV infection, early infection and environmental microvirus.

2019 novel coronaviruses, droplet digital PCR, nested PCR, early 2019-nCoV infection, microvirus residues

doi: [10.1360/TB-2020-1026](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1026)