

微滴数字聚合酶链反应在脓毒症治疗中的应用

贾宜煊¹ 仲盛年² (通讯作者)

1.青海大学研究生院 青海 西宁 810000

2.青海大学附属医院 青海 西宁 810000

【摘要】：脓毒症是一种严重的全身性炎症反应，可能会导致器官功能损伤，休克甚至多器官功能衰竭，严重时可危及患者的生命。治疗脓毒症的关键在于早期精准识别病原体，这对于降低患者死亡率具有至关重要的意义^[1]。本文主要以确诊脓毒症患者感染的病原体方法进行阐述，结合其原理、优缺点和临床应用现状进行研究综述，为临床应用提供更可靠的参考依据。

【关键词】：脓毒症；微滴数字聚合酶链反应；血培养

DOI:10.12417/2705-098X.26.02.017

1 引言

脓毒症常常是由于体内的感染引起的一种严重的全身性炎症反应。当身体对感染产生过度的炎症反应时，可能会导致器官功能损伤，休克甚至多器官功能衰竭，严重时可危及患者的生命。治疗脓毒症的关键在于早期识别、早期干预和早期治疗，这对于降低患者死亡率具有至关重要的意义^[2]。

近年来，一系列新的检测手段不断出现，本文旨在全面解析微滴数字聚合酶链反应（Droplet Digital PCR, ddPCR）的技术优势及其对脓毒症诊疗模式的革新为临床治疗方式选择提供方案。

2 微滴数字聚合酶链反应的概述及重要性

根据脓毒症相关指南的要求，确诊脓毒症后要在1小时内使用经验性抗生素治疗^[3]，然而，指导精准治疗的传统血培养及药敏试验过程耗时较长^[9]，研究表明其报阳中位时间约需14.5小时^[4]，而获得完整的病原学鉴定和药敏报告则通常需要3至5天^[5]。而在此期间使用经验性抗生素可能会存在一定的不足和风险。

有研究表明，血流感染每延迟治疗1个小时，患者死亡率增加7.8%；延迟治疗6小时，死亡率达到58%^[6]。为了解决这一诊断与治疗时间节点的矛盾，研究人员开始探索微滴数字聚合酶链反应（ddPCR）在脓毒症患者中的应用。ddPCR技术具有高灵敏度和高速度的特点，能够更加快速地检测细菌的存在并进行定量分析。

相比传统的血培养和药敏培养方法，ddPCR技术的检测时间最快可以大大缩短至3小时^[7]，灵敏度高达83-91%^[15]，使临床医生能够更早地获取细菌信息并准确选择抗生素。基于此，通过ddPCR技术在脓毒症患者中实现早期细菌检测和抗生素选择，有望为临床提供更为精准的个体化治疗方案，避免不必要的经验性抗生素使用，降低患者的治疗延误和并发症发生的风险，最终有望显著降低脓毒症患者的死亡率。

3 微滴数字聚合酶链反应的技术原理与血培养的技术原理及对比

3.1 微滴数字聚合酶链反应的技术原理

微滴数字聚合酶链反应（ddPCR）反应系统中包含嵌入染料的荧光DNA和荧光染料标记的探针，在传统的PCR扩增前将一个大的反应体系进行微滴化处理，即利用油包水技术将其“分割”为数万个纳升级的微滴，每个微滴或含有至少一个待检核酸靶分子，或不含待检核酸靶分子，通过稀释至微孔板中的每个微滴都是一个独立的PCR反应体系。PCR扩增完成后，利用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测，有荧光信号微滴判读为“1”，没有荧光信号微滴判读为“0”，根据泊松分布定律可以准确地计算出每个微滴中目标核酸的数量和拷贝数，实现了对核酸拷贝数的绝对定量^[8]。此外，ddPCR通过直接计数阳性孔来实现定量目标核酸，具有更高的灵敏性和特异性^[8]。对于浓度极低的核酸定性定量时，ddPCR不需要额外的预富集病原菌，具有检测稳定性高、变异系数小等优点^{[16][17]}。

3.2 血培养的技术原理

血培养通过将血液样本接种于富营养培养基，血液中的微生物在培养基中生长繁殖，通过监测微生物代谢产物（如CO₂）的变化间接判断感染。其核心局限包括：血培养的技术原理主要是通过从患者血液中捕获和培养微生物，以检测血液中是否存在病原菌。

具体步骤包括：

- （1）采样：无菌取血，避免外源菌污染。
- （2）预处理：血样加入到培养基中，促进微生物生长。
- （3）培养：在特定的培养箱内，监测微生物的生长，常用的培养基包括血液琼脂和脑心浸液琼脂等。
- （4）检测：采用自动化仪器检测微生物的生长，通常通过检测二氧化碳产生、颜色变化或微生物的生长迹象。
- （5）鉴定：对阳性标本进行微生物鉴定，确定病原菌。

3.3 总结对比

微滴数字聚合酶链反应 (ddPCR) 其技术优势体现在:

- (1) 直接检测核酸: 无需微生物培养, 规避生长依赖性。
- (2) 绝对定量: 无需标准曲线, 可直接计算病原体拷贝数。
- (3) 多重检测能力: 单次反应可同时检测 70 余种细菌、20 余种真菌及耐药基因。

血培养受限体现在:

- (1) 病原体浓度低于 1 CFU/mL 时易漏检。
- (2) 耗时长: 需 1-5 天完成微生物扩增与鉴定。
- (3) 假阴性风险: 抗生素预处理、苛养菌生长条件不足可抑制微生物增殖。
- (4) 耐药检测滞后: 需额外药敏试验 (AST), 延长诊断周期。

4 微滴数字聚合酶链反应的检测范围

血培养需依赖不同培养基分离特定微生物进行检测, 而微滴数字聚合酶链反应 (ddPCR) 可进行多病原体与耐药基因同步检测, 可单次检测包括:

- (1) 广谱病原覆盖: 70 种细菌 (如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)、20 种真菌 (如念珠菌) 及疱疹病毒 1-6 型。
- (2) 耐药基因靶标: blaKPC (碳青霉烯酶基因)、mecA (甲氧西林耐药)、vanA (万古霉素耐药) 等。

以下将从细菌感染、病毒感染、真菌感染、耐药基因检测等角度详细阐述 ddPCR 在各种感染检测中涵盖的范围, 并说明其临床和科研中的价值。

4.1 细菌感染

微滴数字聚合酶链反应 (ddPCR) 在细菌感染检测中的应用范围极为广泛, 涵盖了从常见病原菌到罕见、难培养菌株的高灵敏度检测, 其优势在于其极高的灵敏度、及时性以及定量能力。ddPCR 广泛应用于检测引起各类常见感染的细菌, 包括但不限于以下几类:

- (1) 革兰阳性菌: 如金黄色葡萄球菌 (包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, MRSA)、链球菌 (A 组、B 组等) 和肺炎链球菌。这些菌株是社区获得性和医院获得性感染中的常见病原体。
- (2) 革兰阴性菌: 如大肠杆菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌、志贺氏菌、弯曲菌属、阴沟肠杆菌科菌株等, 它们通常引起泌尿系统感染、腹腔感染、败血症等。

此外, 某些菌株在样本中的浓度极低, 难以通过传统培养法检测, 而 ddPCR 可灵敏检测到极少量的细菌 DNA^[9]。

4.2 病毒感染

微滴数字聚合酶链反应 (ddPCR) 在病毒感染检测中的应用范围极为广泛, 凭借其高灵敏度、高特异性和绝对定量能力, 成为病毒性疾病的诊断、监测和研究的重要工具。ddPCR 对多种病毒都具有出色的检测能力, 包括但不限于:

- (1) 呼吸道病毒: 流感病毒 (A、B、C 型): 对流感病毒核酸的快速检测和载量监测。呼吸道融合病毒 (RSV)、冠状病毒 (如 SARS-CoV-2、MERS-CoV、SARS-CoV): 特别是在 COVID-19 疫情中, 成为检测的重要技术之一^[20]。副流感病毒。

- (2) 血液和免疫系统病毒: 艾滋病毒 (HIV): 用于早期诊断、病毒载量监控及抗逆转录病毒治疗监测。乙型肝炎病毒 (HBV) 和丙型肝炎病毒 (HCV): 对病毒复制水平的定量分析。人类免疫缺陷病毒 (HIV)、人类疱疹病毒 (HSV)、巨细胞病毒 (CMV)。

- (3) 肿瘤相关病毒 HPV (人乳头瘤病毒): 检测高危型病毒载量及感染状态。EB 病毒 (EBV): 用于判断病毒活性和相关肿瘤患者的感染状态。

- (4) 其他病毒: 猴病毒、疱疹病毒、寨卡病毒、登革病毒、埃博拉病毒等, 用于特殊科研和应急检测^[10]。

此外, ddPCR 可以提供绝对的病毒载量信息, 帮助医生评估病毒复制的强度、疾病严重程度和疗效监测。这在 HIV、HCV、HBV 等慢性病毒感染的管理中尤为重要。而且对于病毒的突变和变异分析, ddPCR 可以通过特异性靶向关键突变区域检测病毒的突变株、耐药基因 (如 HIV 的逆转录酶突变、HCV 的耐药突变) 及变异型病毒, 有助于临床医师精准调整治疗方案。

4.3 真菌感染

微滴数字聚合酶链反应 (ddPCR) 在真菌感染的检测中正逐步展现出其独特优势, 主要体现在其高灵敏度、特异性以及多重检测能力方面, 适用于多种临床和科研场景。ddPCR 对于多种真菌尤其具有检测能力, 覆盖范围广泛, 包括常见的及特殊的真菌病原体, 特别是在复杂或隐性感染、低菌载量情况下显示出优势。其主要涵盖以下方面:

- (1) 常见致病性真菌: 念珠菌属 (Candida spp.): 包括 Candida albicans、Candida glabrata、Candida tropicalis、Candida parapsilosis、其他非 albicans 相关的念珠菌株。念珠菌是医院获得性感染的常见真菌, 特别是在免疫抑制患者中。曲霉属 (Aspergillus spp.): 包括 Aspergillus fumigatus、Aspergillus flavus 等, 是侵袭性曲霉病的主要病原。隐球菌属 (Cryptococcus spp.): 特别是 Cryptococcus neoformans 和 Cryptococcus gattii, 常见于免疫缺陷患者, 导致中枢神经系统和肺部感染。

- (2) 其他重要真菌念珠菌以外的酵母菌: 如 Saccharomyces

cerevisiae 等,用于科研和特殊临床病例^[14]。菌丝型真菌:如 Lomentospora spp.、Fusarium spp.、Scedosporium spp.等,导致复杂的真菌感染,尤其在免疫缺陷或器官移植患者中。某些真菌(如隐球菌、曲霉菌)培养难以快速确认时,ddPCR 的高灵敏度可以弥补这一局限。

4.4 耐药基因检测

随着抗药性菌株的逐渐增加,ddPCR 在检测耐药基因方面显示出巨大潜力,能精准识别菌株中的耐药标志,辅助临床选择合理的抗菌药物,比如:识别氨基糖苷类耐药基因(aac、aph等)、识别β-内酰胺酶基因(bla_KPC、bla_NDM、bla_CTX-M等)、检测 mecA 基因,判断耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。

多病原体与耐药基因同步检测,传统血培养需依赖不同培养基分离特定微生物,而 ddPCR 可单次检测包括:

(1) 广谱病原覆盖:70 种细菌(如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)、20 种真菌(如念珠菌)及疱疹病毒 1-6 型。

(2) 耐药基因靶标:blaKPC(碳青霉烯酶基因)、mecA(甲氧西林耐药)、vanA(万古霉素耐药)等^[11]。

5 微滴数字聚合酶链反应的局限性

微滴数字聚合酶链反应(ddPCR)具有以下局限性:

(1) 成本与操作复杂性:设备昂贵(如 Bio-Rad QX200 系统)^[13],需专业技术人员操作。

(2) 靶标覆盖限制:预设引物探针无法检测未知病原体,

需结合多重染色体非靶向测序(metagenomic Next-Generation Sequencing, mNGS)^[12]。

(3) 样本处理要求:血液中人类 DNA 可能稀释病原信号,需优化核酸提取流程。

6 未来发展方向

微滴数字聚合酶链反应(ddPCR)的未来发展方向有以下几点:

(1) 设备便携化与自动化:研发更小型、自动化程度更高的 ddPCR 平台,提高临床和现场检测能力。

(2) 多重检测技术的融合:结合高通量、微阵列或纳米芯片,实现多目标同时检测。

(3) 高通量平台开发:扩展样本容量和检测速度,满足大规模临床需求。

(4) 标准化和规范化:制定行业统一标准,确保数据的可比性和可重复性。

(5) 临床转化推广:解决临床化验室的实际应用难题,将 ddPCR 更广泛应用于常规检测。

7 总结

微滴数字聚合酶链反应(ddPCR)凭借高灵敏度、快速检测及多靶标分析能力,正在重构血流感染的诊断范式。其优势在危重症、免疫抑制及导管相关感染场景中尤为突出,有望通过缩短诊断周期、精准识别耐药基因改善患者预后。未来需通过技术优化与多平台整合,进一步推动其在临床的普及应用。

参考文献:

- [1] 黄伟.《第三版脓毒症与感染性休克定义国际共识》解读[J].中国实用内科杂志,2016,36(11):959-962.
- [2] 中国医师协会急诊医师分会,中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会.中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J].临床急诊杂志,2018,19(09):567-588.
- [3] 曹钰,柴艳芬,邓颖,等.中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J].感染、炎症、修复,2019,20(01):3-22.
- [4] 刘婧,冯琳琳,张丽帆,等.血培养报阳时间在血流感染诊断及预后中的价值分析[J].中华医院感染学杂志,2021,31(11):1670-1674.
- [5] 马筱玲.如何正确解读血培养结果[J].中华检验医学杂志,2017,40(2):81-84.
- [6] Kumar A,Roberts D,Wood KE,et al.Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock[J].Critical Care Medicine,2006,34(6):1589-1596.
- [7] HINDSON B J,NESS K D,MASQUELIER D A,et al.High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J].Analytical Chemistry,2011,83(22):8604-8610.
- [8] T R H,Z G,J I,et al.Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus.[J].Journal of clinical microbiology,2013,51(2):540-6.
- [9] LI H,BAI R,ZHAO Y,et al.Application of droplet digital PCR for detection of bacterial pathogens in bloodstream infections[J].Frontiers in Microbiology,2018,9:331.
- [10] SEDLAK R H,JEROME K R.Viral diagnostics in the era of digital PCR[J].Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013,75(1):1-4.

- [11] CUZON G, NAAS T, BOGAERTS P, et al. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent carbapenemase genes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(6): 1317-1321.
- [12] GU W, MILLER S, CHIU C Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2019, 14: 319-338.
- [13] BAKER M. Digital PCR hits its stride[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6): 541-544.
- [14] WHITE P L, BARNES R A, SPRINGER J, et al. Clinical performance of droplet digital PCR for the detection of *Aspergillus* DNA in serum[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(8): 2522-2528.
- [15] LI H, BAI R, ZHAO Y, et al. Application of droplet digital PCR for detection of bacterial pathogens in bloodstream infections[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 331.
- [16] Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014, 14(4): 501-7. PMID: 24724628.
- [17] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013, 10(10): 1003-5. PMID: 23995387.
- [18] Zhu H, Zhang H, Xu Y, et al. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020, 69(4): 317-325. PMID: 32815744.
- [19] Pallen MJ. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology*. 2014, 141(14): 1856-62. PMID: 24576467.
- [20] Park C, Lee J, Hassan ZU, et al. Comparison of Digital PCR and Quantitative PCR with Various SARS-CoV-2 Primer-Probe Sets. *J Microbiol Biotechnol*. 2021, 28; 31(3): 358-367. PMID: 33397829.