

微滴数字聚合酶链反应技术在感染性疾病病原学诊断中的应用进展

Progress in the application of droplet digital PCR technology in the etiological diagnosis of infectious diseases

陈宛璐¹, 谢依婷², 奉婷², 耿晓霞^{2△}

CHEN Wan-lu, XIE Yi-ting, FENG Ting, GENG Xiao-xia

1. 电子科技大学医学院, 四川 成都 610072; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)老年感染科, 四川 成都 610072

【摘要】 微滴式数字聚合酶链反应(droplet digital PCR, ddPCR)是对传统聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法的改进。该技术将含有脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)模板的反应体系分配到大量独立的反应单元中进行PCR扩增,根据泊松分布和统计阳性信号来计算DNA拷贝数。与传统的分子检测方法相比,ddPCR具有较高的准确度和重复性,可以实现绝对定量,在可疑病原体筛查方面具有显著优势。此外,ddPCR可一次性检测大量特异性病原体以及常见耐药基因,并及时提供准确的致病病原体绝对定量负荷数据,在一定程度上反映感染的严重程度。因此,ddPCR具有实时监测患者病情和为临床医生提供早期预警的潜力。本文综述了ddPCR技术在各种细菌、病毒、真菌等感染性疾病病原学检测中的应用进展,有望为感染性疾病病原学的诊治提供新的思路和方法。

【关键词】 微滴数字PCR; 感染性疾病; 病原学检测

【中图分类号】 R373

【文献标志码】 B

【文章编号】 1672-6170(2026)04-0198-06

感染性疾病是全球公共卫生的重要问题,需通过培养、分子生物学、测序技术等明确病原体。传统诊断方法耗时且阳性率低,因此需发展快速准确的诊断技术。分子生物学和宏基因组二代测序技术在诊断中具优势,但存在成本高、耗时长等问题。微滴式数字聚合酶链反应(droplet digital PCR, ddPCR)技术,作为一种新兴核酸定量检测技术,因其高灵敏度和特异性,在感染性疾病的诊断和治疗中发挥了重要作用。ddPCR技术于1992年首次提出,它通过微孔板、毛细血管或油乳稀释传统PCR混合物,形成小反应体系^[1]。利用泊松分布原理,通过阳性微滴数量和比例,精确计算目标分子拷贝数或浓度^[2]。ddPCR在绝对定量、高灵敏度和高精度方面表现突出,在早期癌症识别和产前诊断等领域显示出巨大潜力。它能快速检测大量病原体和耐药基因,并提供精确的定量信息,有助于实时监测患者病情和为临床医生提供早期预警。本文综述了ddPCR在感染性疾病诊断中的应用,并探讨了其问题和发展趋势。

1 ddPCR在不同病原体检测中的应用

1.1 细菌感染 近年来,多项研究分析了ddPCR

在细菌感染诊断的应用。使用16S核糖体RNA(16S ribosomal RNA, 16S rRNA)编码DNA为靶向基因已广泛用于定量细菌DNA检测研究。Ziegler等^[3]采用16S rRNA的引物及探针,建立了ddPCR用于血液感染患者的检测与监控,83例患者的总阳性率达60%,对不同种属特异基因如金葡菌、肺炎链球菌和大肠杆菌的ddPCR检测,其总阳性率高达61%。Wounters等^[4]利用16S rRNA验证了ddPCR检测血流感染中革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的可行性,结果显示敏感性为80%,特异性为87%。Tedim等^[5]使用ddPCR定量血液中的大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和肠球菌属,证明了ddPCR能够实现这4种主要致病菌灵敏、快速的检测。Zheng等^[6]开发了一种基于ddPCR检测鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌的方法应用于170例疑似血流感染患者的病原学检测。研究结果发现,血培养检测到鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌的阳性率分别为2.4%(4例)和4.1%(7例),而ddPCR检测到鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌的阳性率分别为13.5%(23例)、15.3%(26例),另有4例(2.4%)合并感染病例。同时,在这两种检测方法阳性的患者

[42] Gula A, Li X, Su B, et al. Effect of Mongolian warm acupuncture on the gene expression profile of rats with insomnia[J]. *Acupunct Med*, 2019, 37(5): 301-311.

[43] 王曼雅, 叶红, 施科军, 等. 中医药治疗失眠的研究进展[J]. *首都食品与医药*, 2024, 31(18): 8-11.

[44] 任为联, 鹿洪秀, 刘容容, 等. 颊针联合右美托咪定对腰椎全麻术后谵妄及恢复质量的影响分析[J]. *中国现代药物应用*,

2025, 19(13): 1-6.

[45] Alimoradi Z, Jafari E, Broström A, et al. Effects of cognitive behavioral therapy for insomnia (CBT-I) on quality of life: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sleep Med Rev*, 2022, 64: 101646.

(收稿日期: 2025-07-20; 修回日期: 2026-01-12)

(本文编辑: 侯晓林)

中,仅 ddPCR 检测阳性的患者临床症状较轻、临床结果较好,提示这些患者可能受益于 ddPCR 早期及时的病原学诊断及相应治疗。因此,ddPCR 可以作为一种快速可靠的方法,在血流感染的早期阶段识别致病病原体并指导治疗决策。

Liu 等^[7]通过 ddPCR 和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)准确定量全血样本中布鲁氏菌 DNA 载量,61 例试管凝集试验阳性患者中病原体检测阳性率分别为 88.5% 和 75.4%。Maggi 等^[8]构建了一种检测巴尔通体的 ddPCR 方法,其灵敏度(53/112)显著优于 qPCR(6/112),可以检测出 16 种不同的巴尔通体菌种/菌株。Ramírez-Lázaro 等^[9]发现 ddPCR 能在通过传统方法检测幽门螺旋杆菌阴性的患者中检测到隐匿性幽门螺杆菌感染。Zhou 等^[10]用 ddPCR 检测胸水及腹水标本,其病原学检测阳性的敏感性分别为 96% 和 92.86%,特异性分别为 86.67% 和 60.00%。

结核病是全球最致命的传染性疾病之一。目前已有研究采用 ddPCR 对痰液样本中的结核杆菌进行检测。Luo 等^[11]使用 ddPCR、Xpert、qPCR、MGIT 960 检测 102 份痰液标本中的结核分枝杆菌,ddPCR 对结核分枝杆菌的敏感性最高,为 95.7%。Zheng 等^[12]采用 ddPCR、qPCR 及荧光 PCR 探针溶解曲线对结核分枝杆菌进行耐药分析,并对 21 例痰标本进行药敏试验。结果表明,ddPCR 能检出约 0.01% 的基因突变。

在细菌耐药检测方面,ddPCR 可以广泛应用于靶向检测革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的多种抗生素耐药基因,包括 MRSA (nuc 和 mecA)、VRE (vanA)、ESBL (blaCTX-M-1 和 blaCTX-M-2 家族)和 CRE (blaOXA-48 和 blaKPC),以及细菌形态(大肠杆菌和克雷伯氏菌属)和泛细菌检测^[13]。在一项前瞻性研究中,使用 ddPCR 对 12 种常见病原菌和 3 种抗生素耐药基因进行检测,共检测到 40 个 blaK-PC、3 个 blaNDM 和 38 个 mecA 基因^[14]。

上述研究结果为 ddPCR 在细菌感染性疾病病原学诊断的应用方面提供了新的思路:①可应用于检测低载量、不易到达病灶(如肺结核、脑膜炎、心内膜炎),或现有的检测方法检出率不高的病例。②对细菌耐药基因或位点变异进行检测并量化,将检测时间由 24~48 小时缩短到数小时,实现早诊早治。③应用于疾病的严重程度分层。在血流感染

患者中,高病原体载量与更快的疾病进展及更高的死亡率相关。④区分定植与感染:ddPCR 可以精确定量血液中细菌 DNA 含量,从而有助于判断某种机会性病原体定植或致病。有研究^[5]使用 ddPCR 技术检测下呼吸道感染患者的细菌病原体,发现该方法比传统培养法更敏感,能够检测到更多的细菌共存病例。研究者指出,通过对病原体的定量,可以为临床区分定植和感染提供科学依据。例如,对于肺炎链球菌,已有研究报道将细菌定量 $\geq 10^4$ copies/ml 或 ≥ 105 copies/ml 作为区分定植和感染的阈值。

ddPCR 技术在细菌感染的诊断和病原学检测中展现了重要应用价值。其高灵敏度和高特异性使其在低载量感染、血流感染、结核等难以通过传统方法检测的病例中具有明显优势。ddPCR 能够精确地定量细菌 DNA,帮助识别致病菌并监控病原体载量,进而为临床决策提供科学依据。特别是在抗生素耐药基因的检测中,ddPCR 为耐药菌株的早期识别和及时治疗提供了强有力的支持。

1.2 病毒感染 ddPCR 已被用于许多病毒检测,如乙肝病毒^[15]、人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)^[16]、新型冠状病毒(SARS-CoV-2)^[17]、寨卡病毒^[18]、登革热病毒^[19]、多瘤病毒^[20]、人巨细胞病毒^[21]、流感病毒^[22]等,在快速准确检测病毒方面具有优势。

在一项检测乙肝病毒核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)的研究^[15]中发现,ddPCR 的病毒检测下限为 102 copies/ml, qPCR 的病毒检测下限为 103 copies/ml, ddPCR 方法具有更高的检测敏感性。另外, Sedlak 等^[16]证明 ddPCR 可快速定量核酸内切酶处理的 HIV 前病毒中的一系列插入缺失突变体,在野生型背景下检测到低至 0.02% 的突变体。

大约 20% 的寨卡病毒感染者会出现与其他黄病毒相似的症状,这对临床诊断提出了相当大的挑战。Hui 等^[18]构建了寨卡病毒 NS5 基因的特异性引物及分子探针,利用 ddPCR 和 qPCR 等技术,初步证实了 ddPCR 在检测低病毒浓度血清样本中的寨卡病毒时表现出优于 qPCR 的性能。然而,高浓度的总 DNA 会影响水相的粘度,并使液滴的形成复杂化。因此,ddPCR 不适用于定量高浓度样品,尤其是靶基因浓度高于 105 拷贝的样品。而 qPCR 和 ddPCR 在临床检查中可以相互补充。在寨卡病毒浓度较低的临床样本中,例如在感染后 1~3 天获得的样本中,应使用 ddPCR 以达到最佳的诊断准确性和灵敏度。对于常规实验室检测寨卡病毒,包括对感染后大于 3 天获得的临床样本进行分析,应使用

qPCR。

Abachin 等^[19]建立了 ddPCR 检测减毒登革热病毒核酸的方法,并与传统的 qPCR 技术进行了对比,两者具有相似的特异性。Giovannelli^[20]等用 ddPCR 及 qPCR 测定了 150 例脑脊液及 100 例血清的 JC 多瘤病毒 DNA (JCPyV-DNA),结果显示 ddPCR 的检测阳性率分别为 13%、50%,检测下限为 30 copies/ml。利用 ddPCR 方法得到的各样本中的 JCPyV-DNA 平均值与 qPCR 相比无明显差异。Sedlak 等^[21]比较 qPCR 和 ddPCR 在患者血浆样本中对人类巨细胞病毒的定量检测,ddPCR 在病毒载量 $\geq 4 \log_{10}$ 时展现出了更高的精确度。Taylor 等^[22]通过 qPCR 和 ddPCR 技术对甲型 H1N1 流感 pdm09 病毒的 H275 野生型 (WT) 和 H275Y 点突变 (MUT) 毒株进行定量检测,与 qPCR 相比,ddPCR 能有效地提高突变病毒的检测敏感性 (>30 倍) 和精确度 (>10 倍)。

ddPCR 技术对新型冠状病毒的诊断具有重要意义。Yu 等^[23]分析了 76 例确诊患者的 323 份样本 (包括鼻拭子、咽拭子、痰液、血液和尿液),发现 qPCR 和 ddPCR 在高病毒载量样本中给出一致的结果,而对于低病毒载量样本中 ddPCR 检测效果更好。其中痰液比咽拭子和鼻拭子的检测结果更能反映病毒在体内的复制。根据新冠病毒感染过程中病毒载量和胸部 CT 的变化,病毒的高水平复制可能表明疾病的进展。有效的抗病毒治疗可以缩短病程并降低严重程度。ddPCR 可以通过动态检测病毒载量,在评估抗病毒药物的疗效方面发挥重要作用。对新冠肺炎出院患者,ddPCR 比 qPCR 能更好地对低病毒负荷的新型冠状病毒进行定量,并且显著提高了对反复感染新型冠状病毒患者的诊断准确率^[17]。

ddPCR 技术在病毒检测领域展现出显著的优势,特别是在高敏感度、低病毒载量样本的检测中,比传统的 qPCR 方法更为有效。其在乙肝、HIV、新型冠状病毒、寨卡病毒、登革热病毒、流感病毒及其他多种病毒的定量检测中,都表现出了更高的灵敏度和准确性。尽管 ddPCR 在高浓度样本的检测中可能面临挑战,但其在低病毒载量样本、早期感染样本及动态病毒载量监测中的应用潜力巨大。总体来说,ddPCR 为病毒感染的诊断提供了一种高效、精确的技术手段,尤其适用于临床上对低病毒浓度和反复感染病例的快速检测。

1.3 真菌感染 近年来,真菌感染日趋严重,全球超过 1/4 的人受到感染^[24]。由于诊断延迟,侵袭性真菌病的死亡率超过 50%。真菌培养被认为是诊

断真菌感染的金标准,但由于真菌的生长速度一般较细菌缓慢,依赖培养结果进行诊断常常延误最佳救治时机。为实现对真菌的快速、准确检测,国内外已有学者提出将 ddPCR 用于临床诊断。

Wounters 等^[4]设计了针对真菌 28S rRNA 的引物和探针检测真菌感染,采用 ddPCR 技术可在 4h 内检出 1~2 个真菌菌株。Li 等^[25]以 18S rRNA 为靶点,采用真菌特异引物,评估 ddPCR 用于新生儿侵袭性真菌感染的快速、准确诊断,结果显示 ddPCR 检测的灵敏度为 3.2 copies/ μ l,特异性高达 100%。另外,也有部分研究采用 ddPCR 来检测曲霉属。Poh 等^[26]评价了 ddPCR 与 qPCR 对人气道标本中曲霉菌的定量分析。研究发现,ddPCR 对土曲霉检测具有较高的敏感性和较高的抗 PCR 抑制能力。

Chen 等^[27]评价了 ddPCR 技术用于检测疑诊念珠菌病人血液样本中假丝酵母 DNA 的灵敏度及特异性。与常规培养法及 qPCR 方法比较,该方法具有较高的敏感性,可达 94%。因此,ddPCR 的高特异性和敏感性有助于其在念珠菌血症早期诊断中的应用。Yi 等^[28]评估了 ddPCR 在检测呼吸道标本中耶氏肺孢子菌 DNA 方面的性能,在痰液和支气管肺泡灌洗液标本中,ddPCR 的检测阳性率 (分别为 43.90%、100.00%) 均高于 qPCR。有研究采用标准的显微检测和 ddPCR 方法,对 54 名免疫功能低下的成年肺炎患者的支气管肺泡灌洗液进行卡氏肺孢子菌 MSG 基因定量检测,后者对含靶 DNA 的样品更敏感^[29]。

1.4 寄生虫感染 目前 ddPCR 已用于疟原虫、血吸虫等寄生虫感染的诊断。Koepfli 等^[30]评估了 ddPCR 在疟疾患者及无症状带虫者中定量检测恶性疟原虫和间日疟原虫的能力,结果发现 ddPCR 能够获得比 qPCR 更精确的检测结果。Weerakoon 等^[31]开发了一种对人粪便、血清、尿液和唾液中血吸虫 DNA 进行定量检测的 ddPCR 方法,与基于显微镜的 Kato-Katz 试验相比,前者提供了更高的检测灵敏度和特异性。

1.5 其他病原学感染 Zhao 等^[32]开发了一种用于准确定量肺炎支原体的 ddPCR 方法,对 178 个临床样本进行检测,并与 qPCR 进行比较,ddPCR 的检测下限为 2.9 拷贝/反应,共检测出 80 个阳性样本,而 qPCR 的检测下限为 10.8 拷贝/反应,共检测出 79 个阳性样本。Roberts 等^[33]评估了 ddPCR 对沙眼衣原体的定量检测,ddPCR 检测敏感性为 73.3%,特异性为 99.1%。Peh 等^[34]探讨了使用 ddPCR 技术检测尿液、肛门和泌尿生殖器拭子样本中生殖支原

体,结果证明 ddPCR 对生殖支原体可进行精确和可重复的定量。

2 ddPCR 与其他病原体检测方法的比较

2.1 ddPCR 与血培养的比较 血培养检测耗时较长且敏感性较低(10%~30%)^[35],尤其对于已使用抗生素患者。因此,血培养无法在疾病早期进行病原学诊断,延误针对性的抗感染治疗。ddPCR 具有较高的灵敏度和特异性,可以检测低拷贝数的目标序列,并且不易受样本中其他干扰物质的影响。Wouters 等^[4]对疑似血流感染患者的 45 份血样进行了 ddPCR 检测,与血培养相比,ddPCR 检测的总体敏感性和特异性分别为 80% 和 87%,明显高于血培养。Abram 等^[36]开展了基于 ddPCR 技术的单中心、前瞻性队列研究,并与常规血液培养方法进行对比。结果发现,122 例疑似血流感染患者的 169 份血液标本中,血培养检测阳性率为 11.27%,而 ddPCR 的检测阳性率为 30.28%,明显高于血培养。

2.2 ddPCR 与宏基因组二代测序的比较

2.2.1 应用范围 宏基因组二代测序(metagenomics next generation sequencing, mNGS)是近年来广泛应用于病原体精准诊断的新型检测技术。它可以分析临床样品中的整个微生物菌落,而无需依赖培养富集和扩增^[37]。近年来研究表明^[35],在 ddPCR 靶标的检测范围内,ddPCR 的检出率明显高于 mNGS,但 ddPCR 只能用现有的探针检测靶标病原体。因此,ddPCR 无法实现 mNGS 检测方法对病原进行全面的检测。

2.2.2 灵敏度和特异性 mNGS 目前最快可在 30 h 内获得微生物种类及耐药性的结果^[35],主要优势在于其极高的灵敏度和特异性。而 ddPCR 能在大约 4 小时内实现极高的检测灵敏度,能够检测低至 10 CFU/ml 的低浓度病原体^[36],且检测速度明显提高。Hu 等^[35]对 45 例危重患者进行了 ddPCR 和 mNGS 的头对头比较,发现 ddPCR 检测方法在目标病原体范围内,血源性致病菌的检出率明显高于 mNGS 法(ddPCR 法检测病原体总数为 88 个,mNGS 法为 53 个),但 mNGS 检测的病原体范围比 ddPCR 检测到的病原体范围更广(mNGS 法检测病原体总数为 126 个,ddPCR 法为 88 个)。然而,目前对于 ddPCR 在可疑血液感染的诊断精度及其在临床上的应用价值尚缺乏深入研究。

2.3 ddPCR 与 qPCR 的比较

2.3.1 灵敏度比较 由于 ddPCR 采用了双特异性引物体系,使其能够准确地鉴定不同种类微生物。Wang 等^[37]设计了在模拟群落和真实环境样品中检测细菌和真菌的 qPCR 和 ddPCR 方法,ddPCR 的定

量结果明显更接近预期值,变异系数比 qPCR 检测结果小。在一项采用 qPCR 和 ddPCR 检测 SARS-CoV-2 的研究中,qPCR 的检测灵敏度和特异性为 40%、100%,而 ddPCR 达到了 94%、100%^[38]。另外,在低样本浓度条件下,ddPCR 也无需预先对目标 DNA 进行富集操作^[39]。这意味着 ddPCR 能有效地提高目标基因在低丰度样品中的检出灵敏度。

2.3.2 精确度比较 ddPCR 在检测精确度上超过了 qPCR。在一些采用 qPCR 技术的实验室里,变异系数通常落在 20%~30% 的范围内^[3],而采用 ddPCR 方法时,无论是在不同检测批次之间还是同一批次内部,变异系数值都明显偏低^[40]。因此,相较于 qPCR,ddPCR 具有更高的检测精确度。

2.3.3 PCR 抑制剂耐受性比较 与 qPCR 方法相比,ddPCR 在耐受 PCR 抑制物质方面表现得更为出色^[41],它可以辅助评估一些易被抑制的病原体感染的样本,包括粪便、痰液和组织,且无需通过 RNA 分离可直接定量核酸。实际上,既往研究已经证实 ddPCR 对于肝素、十二烷基硫酸钠等 DNA 提取过程中常用的抑制剂显示出更高的抗药性^[42]。与 qPCR 相比,在样本 DNA 浓度不定及存在抑制剂情况下,ddPCR 检测对于定量的抗干扰能力及稳定性更好。

3 ddPCR 对感染性疾病的治疗指导及预后、疾病严重程度的预测

利用 ddPCR 技术实时检测血液标本中病原体载量及细菌种类的变化,可以帮助我们判断抗菌药物的疗效、监测病情变化,为临床合理用药提供依据。Lin 等^[43]对 122 例疑似血流感染患者进行了前瞻性研究,结果显示,C 反应蛋白和 ddPCR 的阳性率呈正相关,而降钙素原(PCT)与 ddPCR 定量结果呈显著正相关。但是,外周血白细胞和 ddPCR 测定的病原体载量之间的关系不大。随着抗生素的使用,ddPCR 检测的病原体序列读数逐渐降低,同时白细胞、PCT、C 反应蛋白的水平也随之下降。Xu 等^[44]建立了基于 ddPCR 的 HDV RNA 定量检测技术,ddPCR 技术可用于动态监控丁型肝炎病毒感染患者治疗中的病毒定量,指导临床合理用药及监控药物疗效。因此,ddPCR 技术可对患者的病情进行实时监控及早期预警。

ddPCR 检测对判断患者的预后有一定的潜在价值。Colagrossi 等^[45]采用 ddPCR 技术定量分析 41 例确诊 SARS-CoV-2 阳性的成年患者的配对血浆和呼吸道样本中的病毒载量。在 8 例患者的血浆中发现了 SARS-CoV-2 RNA(病毒载量中位数为 694),与没有血浆病毒血症的患者相比,血浆中发现

SARS-CoV-2 RNA 的患者死亡率更高,此外,在血液系统恶性肿瘤的病人中,病毒血症的发生率较高。尽管样本量较小,但为早期识别更有可能发展为 SARS-CoV-2 病毒血症的高风险患者提供了参考,表明血浆 SARS-CoV-2 RNA 的测定可用于预测重症免疫缺陷病人的预后。

ddPCR 在追踪病情的严重性方面表现良好。Ziegler 等^[3]通过 16S rDNA ddPCR 技术对 27 例经血培养证实的金黄色葡萄球菌菌血症成年患者进行监测,发现高载量 16S rDNA 与脓毒症和死亡率密切相关,并且少数 DNA 载量非常高的患者患有严重和复杂的感染。Zhao 等通过对肺炎支原体的拷贝数进行分组,发现 ddPCR 检测到的病原体载量与疾病的严重性及炎症指数呈正相关^[46],致病菌负荷高的患者有高热、高热峰及发热时间延长,C 反应蛋白增高等特点。

4 小结与展望

ddPCR 技术具有快速、灵敏、准确等优点,能在不使用标准曲线的情况下实现对病原体的绝对定量。通过 ddPCR 技术对特定病原体的定量检测以及常见抗生素耐药基因的检测,为制定合理的抗菌药物使用方案提供科学依据。同时,ddPCR 技术的敏感性和特异性不会受到经验性药物的干扰,使其在临床应用中更可靠。

目前 ddPCR 技术还面临以下问题及局限性:第一,ddPCR 所需的仪器、试剂价格昂贵,其复杂的操作需要经验丰富的工作人员来评估结果,这限制了其广泛的临床应用,难以在普通医疗机构开展,尤其在中低收入地区。第二,目前关于 ddPCR 的研究更多是单中心、前瞻性研究,样本数量较少,样本类型较为单一,需要通过扩大样本量来进一步验证结果。第三,在关于 ddPCR 与感染性疾病的研究中,尽管大部分研究表明 ddPCR 技术的敏感性和特异性不会受到抗生素的影响,但仍有研究提出血液样本中的低病原体 DNA 载量可能受抗生素的使用而导致。因此,有关抗生素使用对 ddPCR 结果的影响还需进一步探索。第四,ddPCR 检测的病原种类少于 mNGS,有研究显示 ddPCR 有时会漏检血液中常见的病原菌,因此,必要时需联合 ddPCR 与 mNGS 两种检测方法进行互补。

总之,ddPCR 技术已成为病原微生物检测的一种有前途和可靠的工具,但其在感染性疾病病原学诊断中的临床应用尚不广泛,需要更多的临床样本来检验 ddPCR 的诊断性能。未来,随着 ddPCR 技术的发展,其在感染性疾病病原体的快速、高灵敏度检测和诊断中将发挥重要作用。

【参考文献】

- [1] Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12):5636-5643.
- [2] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1):165-256.
- [3] Ziegler I, Lindström S, Källgren M, et al. 16S rDNA droplet digital PCR for monitoring bacterial DNAemia in bloodstream infections [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11):e0224656.
- [4] Wouters Y, Dalloyaux D, Christenhusz A, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of bloodstream infections [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(3):657-668.
- [5] Tedim AP, Merino I, Ortega A, et al. Quantification of bacterial DNA in blood using droplet digital PCR: a pilot study [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2024, 108(1):116075.
- [6] Zheng Y, Jin J, Shao Z, et al. Development and clinical validation of a droplet digital PCR assay for detecting *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with suspected bloodstream infections [J]. *Microbiologyopen*, 2021, 10(6):e1247.
- [7] Liu J, Song Z, Ta N, et al. Development and evaluation of a droplet digital PCR assay to detect *Brucella* in human whole blood [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2023, 17(6):e0011367.
- [8] Maggi RG, Richardson T, Breitschwerdt EB, et al. Development and validation of a droplet digital PCR assay for the detection and quantification of *Bartonella* species within human clinical samples [J]. *J Microbiol Methods*, 2020, 176:106022.
- [9] Ramírez-Lázaro MJ, Lario S, Quílez ME, et al. Droplet digital PCR detects low-density infection in a significant proportion of helicobacter pylori-negative gastric biopsies of dyspeptic patients [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2020, 11(6):e00184.
- [10] Zhou F, Sun S, Sun X, et al. Rapid and sensitive identification of pleural and peritoneal infections by droplet digital PCR [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2021, 66(2):213-219.
- [11] 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.
- [12] Zheng Y, Xia H, Bao X, et al. Highly sensitive detection of isoniazid heteroresistance in *mycobacterium tuberculosis* by droplet digital PCR [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15:6245-6254.
- [13] Abram TJ, Cherukury H, Ou CY, et al. Rapid bacterial detection and antibiotic susceptibility testing in whole blood using one-step, high throughput blood digital PCR [J]. *Lab Chip*, 2020, 20(3):477-489.
- [14] Wu J, Tang B, Qiu Y, et al. Clinical validation of a multiplex droplet digital PCR for diagnosing suspected bloodstream infections in ICU practice: a promising diagnostic tool [J]. *Crit Care*, 2022, 26(1):243.
- [15] Limothai U, Chuaypen N, Poovorawan K, et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR vs reverse transcriptase quantitative real-time PCR for serum HBV RNA quantification [J]. *J Med Vir*

- ol,2020,92(12):3365-3372.
- [16] Sedlak RH, Liang S, Niyonzima N, et al. Digital detection of endonuclease mediated gene disruption in the HIV provirus[J]. *Sci Rep*,2016,6:20064.
- [17] Park C, Lee J, Hassan ZU, et al. Comparison of digital PCR and quantitative PCR with various SARS-CoV-2 primer-probe sets[J]. *J Microbiol Biotechnol*,2021,31(3):358-367.
- [18] Hui Y, Wu Z, Qin Z, et al. Micro-droplet digital polymerase chain reaction and real-time quantitative polymerase chain reaction technologies provide highly sensitive and accurate detection of Zika virus[J]. *Virol Sin*,2018,33(3):270-277.
- [19] Abachin E, Convers S, Falque S, et al. Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid[J]. *Biologicals*,2018,52:49-54.
- [20] Giovannelli I, Ciccone N, Vaggelli G, et al. Utility of droplet digital PCR for the quantitative detection of polyomavirus JC in clinical samples[J]. *J Clin Virol*,2016,82:70-75.
- [21] Sedlak RH, Cook L, Cheng A, et al. Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus[J]. *J Clin Microbiol*,2014,52(8):2844-2848.
- [22] Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, et al. Optimization of droplet digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations[J]. *J Virol Methods*,2015,224:58-66.
- [23] Yu F, Yan L, Wang N, et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients[J]. *Clin Infect Dis*,2020,71(15):793-798.
- [24] Chen B, Jiang Y, Cao X, et al. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases[J]. *Clin Chim Acta*,2021,517:156-161.
- [25] 李辉桃,林冰纯,黄智峰,等.应用微滴式数字 PCR 技术快速诊断新生儿侵袭性真菌病[J]. *中国当代儿科杂志*,2019,21(1):45-51.
- [26] Poh TY, Ali NABM, Chan LLY, et al. Evaluation of droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the absolute quantification of aspergillus species in the human airway[J]. *Int J Mol Sci*,2020,21(9):3043.
- [27] Chen B, Xie Y, Zhang N, et al. Evaluation of droplet digital PCR assay for the diagnosis of candidemia in blood samples[J]. *Front Microbiol*,2021,12:700008.
- [28] Yi J, Wang N, Wu J, et al. Development of a Droplet digital polymerase chain reaction for sensitive detection of pneumocystis jirovecii in respiratory tract specimens[J]. *Front Med (Lausanne)*,2021,8:761788.
- [29] Jitmuang A, Nititammaluk A, Boonsong T, et al. A novel droplet digital polymerase chain reaction for diagnosis of Pneumocystis pneumonia (PCP)-a clinical performance study and survey of sulfamethoxazole-trimethoprim resistant mutations[J]. *J Infect*,2021,83(6):701-708.
- [30] Koepfli C, Nguitragool W, Hofmann NE, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Sci Rep*,2016,6:39183.
- [31] Weerakoon KG, Gordon CA, Williams GM, et al. Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite cell-free DNA detection in diverse clinical samples[J]. *J Infect Dis*,2017,216(12):1611-1622.
- [32] Zhao H, Yan C, Feng Y, et al. Absolute quantification of mycoplasma pneumoniae in infected patients by droplet digital PCR to track disease severity and treatment efficacy[J]. *Front Microbiol*,2023,14:1177273.
- [33] Roberts CH, Last A, Molina-Gonzalez S, et al. Development and evaluation of a next-generation digital PCR diagnostic assay for ocular Chlamydia trachomatis infections[J]. *J Clin Microbiol*,2013,51(7):2195-203.
- [34] Peh CR, Danielewski J, Chua TP, et al. Quantitation of Mycoplasma genitalium using droplet digital PCR[J]. *Lett Appl Microbiol*,2023,76(6):ovad064.
- [35] Hu B, Tao Y, Shao Z, et al. A comparison of blood pathogen detection among droplet digital PCR, metagenomic next-generation sequencing, and blood culture in critically ill patients with suspected bloodstream infections[J]. *Front Microbiol*,2021,12:641202.
- [36] Abram TJ, Cherukury H, Ou CY, et al. Rapid bacterial detection and antibiotic susceptibility testing in whole blood using one-step, high throughput blood digital PCR[J]. *Lab Chip*,2020,20(3):477-489.
- [37] Wang D, Wang S, Du X, et al. ddPCR surpasses classical qPCR technology in quantitating bacteria and fungi in the environment[J]. *Mol Ecol Resour*,2022,22(7):2587-2598.
- [38] Suo T, Liu X, Feng J, et al. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens[J]. *Emerg Microbes Infect*,2020,9(1):1259-1268.
- [39] Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*,2014,14(4):501-507.
- [40] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog realtime PCR[J]. *Nature Methods*,2013,10:1003-1005.
- [41] Hoshino T, Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR[J]. *Systematic and Applied Microbiology*,2012,35:390-395.
- [42] Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances[J]. *Clin Chem*,2013,59(11):1670-1672.
- [43] Lin K, Zhao Y, Xu B, et al. Clinical diagnostic performance of droplet digital PCR for suspected bloodstream infections[J]. *Microbiol Spectr*,2023,11(1):e0137822.
- [44] Xu L, Zhang X, Cao Y, et al. Digital droplet PCR for detection and quantitation of hepatitis delta virus[J]. *Clin Transl Gastroenterol*,2022,13(7):e00509.
- [45] Colagrossi L, Antonello M, Renica S, et al. SARS-CoV-2 RNA in plasma samples of COVID-19 affected individuals: a cross-sectional proof-of-concept study[J]. *BMC Infect Dis*,2021,21(1):184.
- [46] Zhao H, Yan C, Feng Y, et al. Absolute quantification of Mycoplasma pneumoniae in infected patients by droplet digital PCR to track disease severity and treatment efficacy[J]. *Front Microbiol*,2023,14:1177273.

(收稿日期:2025-03-11;修回日期:2025-09-19)

(本文编辑:林 赞)