

# 多重液滴数字 PCR 用于疑似浓度症患者的临床诊断价值

吴静, 汤斌, 邱毓祯, 瞿洪平, 王晓丽, 孙景勇

(上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海, 20000)

**摘要:** 液滴式数字 PCR (ddPCR) 技术成为重症疑似血流感染 (BSIs) 病原体检测中有潜在推广前景的临床诊断工具。然而, 不同 ddPCR 平台对于不同感染部位的不同病原微生物诊断的敏感性 & 特异性存在差异。目前仍缺乏前瞻性的临床研究验证并准确解读重症感染患者的 ddPCR 检测结果。自 2021 年 5 月 21 日到 12 月 22 日, 瑞金医院重症医学科实施了一项前瞻性多重 ddPCR 病原体核酸测试剂盒的临床应用诊断研究。对于疑似血流感染患者, 同步留取标本进行血培养 (BCs) 和 ddPCR 检测, 其中 ddPCR 可以在 2.5 小时实现 BSI 中最常见的 12 种病原菌和 3 种关键耐药基因的快速检测。首先, ddPCR 结果与确诊的 BSI 检测结果进行比较; 其次, ddPCR 结果与临床综合感染诊断结果进行比较。分析两种情况下 ddPCR 检测的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值; 最后, 阐述 3 种关键耐药基因检测的阳性率并进行相关分析。结果: 研究共纳入了 150 名重症患者 438 次疑似血流感染事件。结果显示血培养与 ddPCR 对目标病原菌的阳性检出率分别为 9.1% 及 41.1%。其中 280 次疑似血流感染事件中血培养及 ddPCR 检测结果一致, 158 次事件中检测结果不一致。1) 同血培养检测结果相比, 在不同病原菌中, ddPCR 诊断敏感性范围为 58.8%-86.7%, 总体为 72.5%; 诊断特异性范围为 73.5%-92.2%, 总体为 63.1%。2) ddPCR+/BC-事件的检出率为 33.6% (147/438), 其中 87.1% (128 of 147) 的事件经临床综合评估判定为疑似 (n = 108) 或可能 (n = 20) 的 BSIs。当临床综合判定的 BSI 为真阳性时, ddPCR 的最终诊断敏感性和特异性上升至 84.9% 和 92.5%。3) 研究共检测出 40 次 blaKPC, 3 次 blaNDM, 和 38 次 mecA 耐药基因。其中, 90.5% 的样本经病原菌基因检测明确为 blaKPC 阳性, 65.8% 的样本根据所有葡萄球菌属微生物及药敏检测结果预测为 mecA 阳性。

**关键词:** 临床验证; 液滴数字 PCR; 血流感染 (BSIs); 重症患者; 差异结果

## 1 检测方法

### 1.1 核酸提取

取待检样本 (包括阴性质控品) 各 2mL, 每个样本中加入 10uL 内对照, 使用领航基因科技 (杭州) 有限公司生产的核酸提取试剂进行核酸提取, 操作步骤按照核酸提取试剂说明

书进行。

## 1.2 微滴生成

(1) 体系配制：确定所需的检测数量  $N$  (样本数+2) 后，对每个引物探针组合，均取  $N \times 5.6 \mu\text{L}$  aTaq buffer (不含酶)、 $N \times 0.4 \mu\text{L}$  酶混合液、 $N \times 4 \mu\text{L}$  引物探针混合液，混合均匀，瞬时离心，按  $10 \mu\text{L}/\text{管}$  分装。

(2) 每管分别加入待检样本、阴性质控品和 MDC-阳性质控品的核酸提取产物各  $5 \mu\text{L}$ ，涡旋混匀，避免气泡产生，瞬时离心。

(3) 取加样后的反应液各  $14 \mu\text{L}$ ，分别加入到数字 PCR 微滴式芯片的各通道进样杯中。

(4) 使用液滴生成仪 DG32 进行液滴生成，操作步骤按照液滴生成仪 DG32 说明书进行。

## 1.3 PCR 扩增

将液滴生成后的芯片放入 PCR 扩增仪 TC1，按照以下 PCR 参数进行反应。37°C 2min; 95°C 5min; [95°C 15s, 60°C 30s]\*40cycles; 25°C 10min

## 1.4 芯片扫描

PCR 结束后，将芯片放入生物芯片阅读器内，选择荧光通道，设置芯片孔位，进行芯片扫描和分析。

# 2 试剂和设备

## 2.1 试剂及耗材

ddPCR 检测使用领航基因科技（杭州）有限公司生产的二十二种血流感染病原体核酸及耐药基因检测试剂盒（数字 PCR 法）、领航基因科技（杭州）有限公司生产的数字 PCR 微滴式芯片。

## 2.2 仪器设备

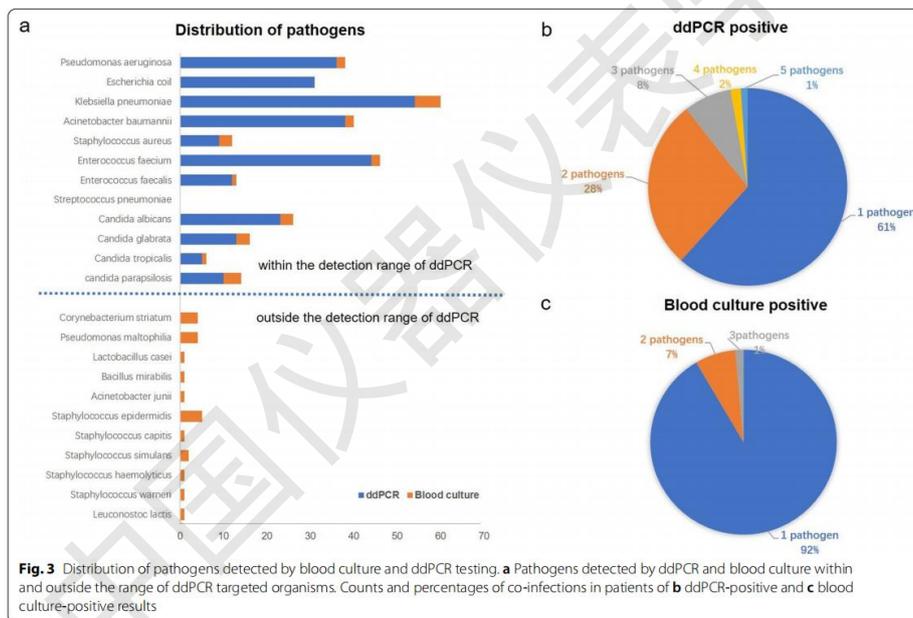
ddPCR 检测使用领航基因科技（杭州）有限公司生产的半自动微滴式数字 PCR 系统 D3200，包括样本制备仪 DG32、PCR 扩增仪 TC1、生物芯片阅读器 CS5。

# 3 实验结果

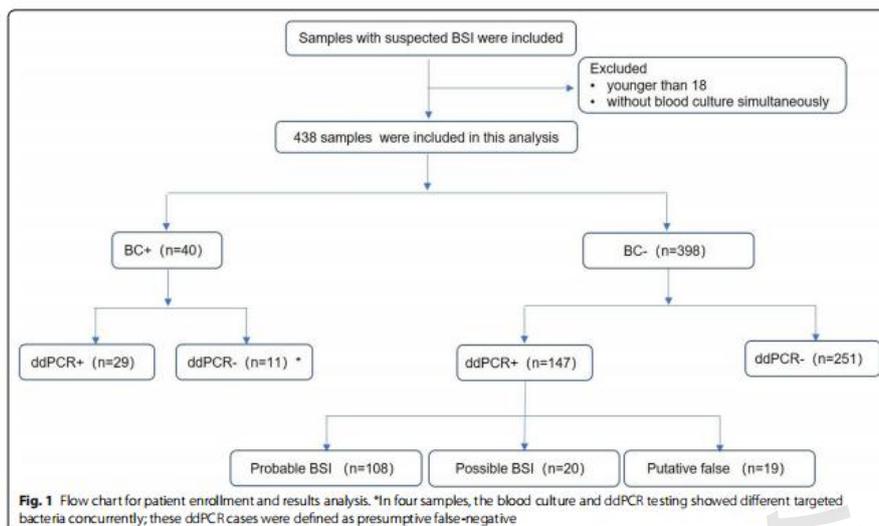
(1) 血培养与 ddPCR 检测结果及一致性情况：ddPCR 阳性检出率为 41.1% (180/438)，ddPCR 在 438 例疑似血流感染中共鉴定出 275 次病原菌（如下表），而血培养只检出 44 次。

	BC+/ ddPCR+, n*	BC+/ ddPCR-, n**	BC-/ ddPCR+, n	BC-/ ddPCR-, n***
Pathogens (all)	44	11	231	251
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	0	35	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	1	45	-
<i>Escherichia coli</i>	5	0	26	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	1	31	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1	6	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	0	9	-
<i>Enterococcus faecium</i>	5	1	39	-
<i>Streptococcus pneumo-</i> <i>niae</i>	0	0	0	-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	4	9	-
<i>Candida tropicalis</i>	1	0	4	-
<i>Candida glabrata</i>	5	1	8	-
<i>Candida albicans</i>	4	2	19	-

(2) 在 38.3% (69/180) 的阳性 ddPCR 检测结果中检测到多种微生物感染 (如下图)。



(3) 血培养结果和 ddPCR 结果一致性情况如下: 29 例结果同为阳性, 251 例结果同为阴性 (如下图)。



(4) 血培养证实的 BSI 与 ddPCR 结果之间的符合率为 63.9% (280/438)。以经血培养证实的 BSI 为标准, ddPCR 检测敏感性为 72.5%, 特异性为 63.1%, 阳性预测值 (PPV) 为 16.5%, 阴性预测值 (NPV) 为 95.8%; 以临床诊断为标准, ddPCR 检测敏感性为 84.9%, 特异性为 92.5%, PPV 为 89.2%, NPV 为 89.3% (如下表)。

	Sample (n = 438)	ddPCR+	ddPCR-	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Total	Positive by blood culture	29	11	72.5	63.1	16.5	95.8
	Negative by blood culture	147	251				
G <sup>-</sup>	Positive by blood culture	13	2	86.7	73.5	10.4	99.4
	Negative by blood culture	112	311				
G <sup>+</sup>	Positive by blood culture	6	2	75.0	88.8	11.1	99.5
	Negative by blood culture	48	382				
Fungi	Positive by blood culture	10	7	58.8	92.2	23.3	98.2
	Negative by blood culture	33	388				
	Positive by all microbiological testing	137	181	43.1	67.5	77.8	30.9
	Negative by all microbiological testing	39	81				
	Positive by clinical diagnosis	157	28	84.9	92.5	89.2	89.3
	Negative by clinical diagnosis	19	234				

#### (5) 对 BC 与 ddPCR 检测结果不一致患者的评估

将 ddPCR 和 BC 结果不一致的患者分类为高度疑似血流感染 (probable BSI)、疑似血流感染 (possible BSI) 和推测假阳性。高度疑似血流感染: ddPCR 结果在七天内与从其他血液外部位采集样本的微生物学检测一致; 疑似血流感染病例: 无微生物学结果, 但根据临床表现和实验室检查结果可能存在 BSI; 推测假阳性: ddPCR 结果与临床表现不一致。

在 33.6% (147/438) 血培养阴性结果中, ddPCR 结果为阳性, 对这 147 项不一致的结果进行分析后, 发现 108 例 (73.5%) 符合高度疑似血流感染标准, 20 例 (13.6%) 符合疑似血流感染标准, 其余 19 例 (12.9%) 为推测假阳性 (图 3)。结合微生物学和临床感染症状, 对 ddPCR 检测到的 69 例多种微生物感染进行了进一步分析。其中 37.7% (26/69) 与 7 天内的所有微生物检测结果完全一致, 55.1% (38/69) 与微生物学检测结果部分一致。

在 438 例病例中，ddPCR 对疑似 BSI 的敏感性高于常规血培养（35.8% vs 9.1%， $P < 0.001$ ）。此外，在 147 例 ddPCR (+) / 血培养 (-) 中，44.9%（66/147）接受了靶向抗菌治疗，27.9%（41/147）接受了基于多微生物感染的部分靶向治疗，27.2%（40/147）在血培养和 ddPCR 测试之前未接受任何适当的治疗。这些初步数据表明，ddPCR 具有快速识别和排除目标病原体的检测能力，尤其针对可能被常规血培养遗漏或被先前的抗生素应用所抑制的病例中更具潜力。

#### (6) ddPCR 检测耐药基因的评价

ddPCR 结果显示 40 例阳性 blaKPC，其中 75.0% 的病例同时检测到肺炎克雷伯菌和 blaKPC 基因（如下表）。

AMR genes	Pathogens	ddPCR+ n, (%)	BC+ and according to AST, n, (%) *	Microbiological testing and, according to AST n, (%)
<i>bla<sub>KPC</sub></i> (n=40)	<i>klebsiella pneumoniae</i>	30 (75.0)	6 (15.0)	40 (100)
	None	10 (25.0)	34 (85.0)	0 (0)
<i>bla<sub>NDM</sub></i> (n=3)	None	3 (100)	3 (100)	3 (100)
<i>mecA</i> (n=38)	<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (7.9)	0	9 (23.7)
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	2 (5.3)	5 (13.2)
	<i>Staphylococcus capitis</i>	-	2 (5.3)	2 (5.3)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	3 (7.9)	6 (15.8)
	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	1 (2.6)	1 (2.6)
	<i>Staphylococcus simulans</i>	-	1 (2.6)	1 (2.6)
	<i>Staphylococcus warneri</i>	-	1 (2.6)	1 (2.6)
	None	-	28 (73.7)	13 (34.2)

与血培养结果相比，6 例血培养报告的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类耐药，ddPCR 结果显示这些菌株表达了 blaKPC 基因。结合其他微生物检测和 AST，所有病例均对碳青霉烯类耐药，其中肺炎克雷伯菌株被检测到 21 次，90.5%（19/21）的样本表达 blaKPC 基因。有 3 次 blaNDM 基因呈阳性，但血培养或其他微生物检测未检测到致病病原体。

此外，在 ddPCR 检测结果中，38 例 mecA 基因呈阳性，有 3 例对金黄色葡萄球菌和 mecA 基因都呈阳性，这些是通过血培养结果无法确认的。结合所有微生物学检测和 AST 结果，检测出 9 例在金黄色葡萄球菌中为 mecA 阳性。

本文讨论部分提及：本研究中检测到 40 个 blaKPC、3 个 blaNDM 和 38 个 mecA 基因，这意味着 ddPCR 检测方法对耐药基因的检测比对病原体的检测更为灵敏，初步分析可能是由于非目标范围或低细菌载量所致。由于耐药机制不是 AST 的明确证据，因此 ddPCR 不能替代 AST，但代表了一种有前景的诊断方法，与血培养检测互补，因为血培养在危重患者中的敏感性表现不佳。