

液滴数字聚合酶链反应检测常见革兰阴性杆菌载量动态变化与疑似血流感染患者预后的关系

邵自强 金君 呼邦传 孙仁华

浙江省人民医院(附属人民医院)急危重症中心重症医学科,杭州医学院,杭州 310014

通信作者:孙仁华,Email:jqin168@hotmail.com

【摘要】目的 探讨液滴数字聚合酶链反应(ddPCR)检测病原菌载量动态变化与疑似血流感染(BSI)患者预后的关系。**方法** 采用前瞻性观察性研究方法,选择2022年3月1日至2023年10月31日浙江省人民医院重症医学科连续招募的年龄>18岁、疑似BSI患者作为研究对象,纳入血液ddPCR检测病原菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌阳性的患者。收集患者入院时人口统计学、临床概况、生命体征、合并症等资料,于疑似BSI当天、第3天和第7天进行血液ddPCR检测、实验室检查、疾病严重程度评分。根据第7天随访ddPCR检测结果提示所有病原菌载量是否较入院时均下降50%,将患者分为病原菌载量下降组和未下降组,比较两组患者的基本资料以及灌注指标、炎症指标、疾病严重程度评分的动态变化。ddPCR检测病原菌载量与灌注指标、炎症指标、疾病严重程度评分之间的相关性采用Spearman检验。采用Kaplan-Meier生存曲线分析病原菌载量下降组和未下降组患者28d累积生存率。此外,根据28d预后将患者分为生存组和死亡组,比较两组患者的临床资料;并采用多因素Cox比例风险回归模型分析疑似BSI患者28d死亡的独立危险因素。**结果** 189例疑似BSI患者首次ddPCR检测提示为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌感染,其中121例接受了动态监测。在121例患者中,第7天ddPCR检测病原菌载量下降82例,载量未下降39例;28d生存76例,死亡45例,28d病死率为37.2%。与病原菌载量下降组相比,病原菌载量未下降组患者有更高的接受血管活性药物支持比例和机械通气比例,且28d病死率更高(均 $P<0.05$)。相关性分析显示,患者疑似BSI当天ddPCR检测病原菌载量与超敏C-反应蛋白(hs-CRP)、降钙素原(PCT)、血乳酸(Lac)、急性生理学与慢性健康状况评分II(APACHE II)和序贯器官衰竭评分(SOFA)均呈正相关(r 值分别为0.150、0.273、0.370、0.334、0.311,均 $P<0.05$)。病原菌载量下降组患者Lac、hs-CRP、PCT、APACHE II评分随时间延长而下降;而病原菌载量未下降组患者hs-CRP、PCT无下降趋势,且APACHE II和SOFA评分进一步升高。第7天,病原菌载量下降组患者hs-CRP、PCT、APACHE II评分和SOFA评分均较病原菌载量未下降组下降(均 $P<0.05$),而两组Lac差异无统计学意义。Kaplan-Meier生存曲线分析显示,ddPCR检测病原菌载量下降组患者28d累积生存率高于病原菌载量未下降组(Log-rank检验: $\chi^2=5.969, P=0.015$)。与生存组相比,死亡组患者年龄更大,SOFA评分更高,血小板计数(PLT)更低,第7天ddPCR检测病原菌总载量更高,接受连续性肾脏替代治疗(CRRT)的比例和ddPCR检测病原菌载量未下降的比例更高(均 $P<0.05$)。多因素Cox回归分析显示,年龄增加[风险比(HR)=1.048,95%置信区间(95%CI)为1.020~1.078, $P<0.001$]、SOFA评分升高(HR=1.127,95%CI为1.027~1.235, $P=0.007$)和病原菌载量未下降(HR=2.165,95%CI为1.148~4.091, $P=0.017$)是疑似BSI患者28d死亡的独立危险因素。**结论** ddPCR动态监测病原菌载量变化能够反映疑似BSI患者的预后,提示ddPCR检测在疑似BSI患者治疗监测中的作用。

【关键词】 血流感染;液滴数字聚合酶链反应;病原菌载量;动态监测;预后

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2023KY018)

DOI:10.3760/cma.j.cn121430-20250623-00345

Relationship between pathogen load kinetics of common Gram-negative bacteria detected by droplet digital polymerase chain reaction and prognosis of patients with suspected bloodstream infections

Shao Ziqiang, Jin Jun, Hu Bangchuan, Sun Renhua

Department of Intensive Care Unit, Emergency and Critical Care Center, Zhejiang Provincial People's Hospital (Affiliated People's Hospital), Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China

Corresponding author: Sun Renhua, Email:jqin168@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the relationship between the pathogen load kinetics detected by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) and the prognosis of patients with suspected bloodstream infection (BSI). **Methods** A prospective observational study was conducted. Patients aged >18 years with suspected BSI admitted to intensive care unit department of Zhejiang Provincial People's Hospital from March 1, 2022 to October 31, 2023 were consecutively enrolled. Patients with blood ddPCR detection positive for pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, or *Pseudomonas aeruginosa* were included. Demographics, clinical profile, vital signs, and comorbidities data of patients upon admission were collected. Blood

ddPCR testing, laboratory tests, and disease severity scoring were performed on days 0, 3, and 7. Based on whether the follow-up ddPCR test at day 7 showed a $\geq 50\%$ decrease in all pathogen load compared to admission, patients were divided into the pathogen load decrease group and pathogen load non-decrease group. Baseline characteristics and the dynamic changes in perfusion indicators, inflammation indicators, and disease severity scores between two groups were compared. The correlation between ddPCR detection of pathogen load and perfusion indicators, inflammation indicators, and disease severity scores were analyzed using Spearman test. The 28-day cumulative survival rate of pathogen load decrease group and pathogen load non-decrease group was analyzed using Kaplan-Meier survival curve. Patients were divided into the survival group and death group according to the 28-day prognosis, and the clinical data were compared between the two groups. Independent risk factors for 28-day mortality in patients with suspected BSI were identified using multivariate Cox proportional hazards regression models. **Results** A total of 189 suspected BSI patients with ddPCR positive for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, or *Pseudomonas aeruginosa* infection were enrolled, of whom 121 underwent dynamic monitoring. Among these 121 patients, 82 showed a decrease in ddPCR pathogen load at day 7, while 39 did not. During the 28-day follow-up, 76 survived and 45 died, and the 28-day mortality was 37.2%. Compared to the pathogen load decrease group, the pathogen load non-decrease group had a higher proportion of patients receiving vasoactive drug support and mechanical ventilation, and a higher 28-day mortality (all $P < 0.05$). In patients with suspected BSI, the ddPCR pathogen load on day 0 showed significant positive correlations with high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), procalcitonin (PCT), blood lactate (Lac), Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II), and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA; r values were 0.150, 0.273, 0.370, 0.334, 0.311, respectively; all $P < 0.05$). The Lac, hs-CRP, PCT and APACHE II in pathogen load decrease group decreased with time. However, hs-CRP and PCT did not decrease in pathogen load non-decrease group, and APACHE II and SOFA scores further increased. At day 7, compared to the pathogen load non-decrease group, the pathogen load decrease group showed significant reductions in hs-CRP, PCT, APACHE II and SOFA scores (all $P < 0.05$); however, there was still no statistically significant difference in Lac between the two groups. Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the 28-day cumulative survival rate of the pathogen load decrease group was significantly higher than that of the pathogen load non-decrease group (Log-rank test: $\chi^2 = 5.969$, $P = 0.015$). Compared to the survival group, the death group was older, had higher SOFA score, lower platelet count (PLT) and higher total pathogen load detected by ddPCR at day 7, and had a higher proportion receiving continuous renal replacement therapy (CRRT) and a higher proportion belonging to the non-decreased pathogen load. Multivariate Cox regression analysis showed that increasing age [hazard ratio (HR)=1.048, 95% confidence interval (95%CI) was 1.020–1.078, $P < 0.001$], higher SOFA score (HR=1.127, 95%CI was 1.027–1.235, $P = 0.007$), and pathogen load non-decrease (HR=2.165, 95%CI was 1.148–4.091, $P = 0.017$) were independent risk factors for 28-day mortality in patients with suspected BSI. **Conclusion** Dynamic monitoring of pathogen load changes by ddPCR can reflect the prognosis of patients with suspected BSI, suggesting the role of ddPCR detection in therapeutic monitoring for patients with BSI.

【Key words】 Bloodstream infection; Droplet digital polymerase chain reaction; Pathogen load; Dynamic monitoring; Prognosis

Fund program: Zhejiang Provincial Medical and Health Science and Technology Planning Project (2023KY018)
DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250623-00345

血流感染 (bloodstream infection, BSI) 是指全身感染患者血液微生物培养呈阳性, 可以是原发感染, 也可以是其他部位现有感染的继发感染^[1-2], 其发病率高, 病死率高, 医疗成本高, 危害严重。根据中国细菌耐药性监测报告, 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌是 BSI 常见的革兰阴性杆菌^[3], 近年来流行率呈增加趋势^[4]。因此, 针对这 4 种临床常见革兰阴性杆菌引起的 BSI 的诊治是十分重要和迫在眉睫的。

合理、正确、及时的抗菌药物治疗是治疗 BSI 的核心所在^[5]。对于危重 BSI 患者干预治疗中抗菌药物的选择, 初始治疗通常是经验性的, 然后再根据血培养和药敏试验结果进行调整^[6-7]。每天根据现有信息反复评估抗菌药物方案的有效性是 BSI 治疗期间的一项重要策略, 特别是在治疗 72 h 内^[8]。

虽然目前血培养仍然是 BSI 病原微生物鉴定的“金标准”^[9], 但早期经验性抗菌药物治疗会显著增加血培养中病原菌假阴性的可能性^[10]。此外, 由于常规血培养无法定量病原菌负荷, 所以在 BSI 治疗过程中缺乏对病原菌载量动态变化的监测^[11]。因此, 迫切需要寻找一种快速、定量监测 BSI 治疗过程中病原菌载量变化的方法。

近年来, 已有研究报道, 液滴数字聚合酶链反应 (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 作为一种具有高敏感度并且能够绝对定量靶分子的新技术^[12], 在 BSI 诊断中的应用价值, 并探讨了 BSI 患者预后与 ddPCR 检测病原菌载量的动态关系^[13-14], 但上述研究结果仍需更广泛和更大的人群中进一步验证。因此, 本研究基于临床 4 种常见革兰阴性杆菌, 旨在探讨 ddPCR 检测病原菌载量的动态变化

对疑似 BSI 患者预后的预测价值,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象与研究设计:采用单中心、前瞻性、观察性研究方法,选择 2022 年 3 月 1 日至 2023 年 10 月 31 日本院重症医学科连续招募的年龄 >18 岁、疑似 BSI 的患者,纳入疑似 BSI 当天 ddPCR 检测为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌阳性的患者。排除住院期间存在 BSI、晚期恶性肿瘤或任何疾病终末期患者。

符合以下两项则定义为疑似 BSI:患者出现突发性高热,并伴有不能由其他感染源解释的血流动力学不稳定;危及生命的器官功能障碍,且序贯器官衰竭评分(Sequential Organ Failure Assessment, SOFA) ≥ 2 分。

1.2 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,研究方案已获得医院医学伦理委员会批准(审批号:2020KY002),所有患者或其法定代理人按照伦理准则提供书面知情同意书。

1.3 资料收集:记录患者人口统计学;临床概况[基础疾病、有无机械通气、有无血管活性药物维持、连续性肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy, CRRT)];生命体征(最高体温、血压);合并症[急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)];血培养结果;28 d 预后情况等。于疑似 BSI 当天、第 3 天和第 7 天采用 ddPCR 检测病原菌载量,同期测定实验室指标[白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血小板计数(platelet count, PLT)、超敏 C-反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、血乳酸(lactic acid, Lac)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)],计算急性生理学与慢性健康状况评分 II(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, APACHE II)和 SOFA 评分。

1.4 血浆 DNA 提取及 ddPCR 检测:取患者外周静脉血 5 mL,置于乙二胺四乙酸抗凝采血管中,于 22 °C 下 1 600 $\times g$ 离心 20 min,立即分离血浆,应用磁性血清/血浆 DNA 试剂盒和 Auto-Pure 20b 核酸纯化系统从 2 mL 血浆中提取 DNA;用 50 μ L 洗脱液洗脱 DNA,同日进行 ddPCR 检测;采用领航基因 ddPCR 系统检测 4 种常见的革兰阴性杆菌和耐药基因^[14];应用 GenePMS 软件 v2.0.01.20011,在 30 min 内进行液滴计数和幅度的数据分析。

疑似 BSI 当天 ddPCR 检测阳性的患者后续于

第 3 天和第 7 天采血同步检测。如果检测到 1 种或多种病原菌,则认为 ddPCR 检测阳性。第 1 次 ddPCR 检出 2 种及以上病原菌的患者定义为多菌感染。检测出耐药基因则定义为耐药基因阳性。

1.5 分组:通过对第 7 天 ddPCR 检测结果与第 1 次 ddPCR 检测结果进行比较,将所有病原菌载量均下降 50% 的患者纳入病原菌载量下降组,反之纳入病原菌载量未下降组。另外,根据 28 d 预后将患者分为生存组和死亡组。

1.6 统计学分析:使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析和数据库管理。呈正态分布的连续变量以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;非正态分布的连续变量以中位数(四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。分类变量以频数或百分比表示,组间比较采用 Fisher 精确检验。ddPCR 检测病原菌载量与灌注指标、炎症指标、疾病严重程度评分之间的相关性采用 Spearman 检验。采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 ddPCR 检测病原菌载量是否下降两组患者的 28 d 累积生存率,并采用 Log-rank 检验进行比较。采用单因素 Cox 比例风险回归模型评估各项变量与疑似 BSI 患者预后的关系,并将 $P < 0.1$ 的变量纳入多因素 Cox 比例风险回归模型,确定 28 d 死亡的独立危险因素。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 ddPCR 检测病原菌载量下降与未下降两组疑似 BSI 患者基本资料比较:有 189 例疑似 BSI 患者 ddPCR 检测提示为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌感染,其中 121 例患者接受了动态监测,并纳入最终分析。在这 121 例患者中,平均年龄(72.3 ± 13.3)岁(23 ~ 99 岁);男性 94 例(占 77.7%),女性 27 例(占 22.3%);平均 APACHE II 评分为(21.0 ± 6.7)分,平均 SOFA 评分为(8.8 ± 3.8)分;28 d 死亡 45 例,病死率为 37.2%。

此外,ddPCR 检测病原菌载量下降 82 例,病原菌载量未下降 39 例。表 1 结果显示,与病原菌载量下降组相比,病原菌载量未下降组患者有更高的接受血管活性药物支持比例和机械通气支持比例,且 28 d 病死率更高(均 $P < 0.05$),而两组患者年龄、性别、基础疾病、体温、血压、合并 AKI 比例、APACHE II 和 SOFA 评分,以及疑似 BSI 当天实验室指标、ddPCR 检测病原菌载量、耐药基因阳性比例和多菌感染比例差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 ddPCR 检测病原菌载量下降与未下降两组疑似 BSI 患者基本资料比较

指标	病原菌载量		统计量值	P 值	指标	病原菌载量		统计量值	P 值
	下降组 (82 例)	未下降组 (39 例)				下降组 (82 例)	未下降组 (39 例)		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	73.0 ± 14.0	71.0 ± 11.6	$t=0.745$	0.454	SCr [$\mu\text{mol/L}, M(Q_1, Q_3)$]	88.7 (63.7, 147.9)	105.6 (62.9, 154.6)	$Z=0.421$	0.673
男性[例(%)]	66(80.5)	28(71.8)	$\chi^2=1.152$	0.283	hs-CRP(mg/L, $\bar{x} \pm s$)	137.7 ± 72.4	116.5 ± 67.1	$t=0.547$	0.126
基础疾病[例(%)]					PCT [$\mu\text{g/L}, M(Q_1, Q_3)$]	3.7 (1.0, 13.6)	2.7 (0.7, 7.6)	$Z=0.335$	0.738
慢性心功能不全	12(14.6)	9(23.1)	$\chi^2=1.313$	0.252	血培养阳性[例(%)]	13(15.9)	5(12.8)	$\chi^2=0.192$	0.788
CKD 4 期或 5 期	2(2.4)	2(5.1)	$\chi^2=0.560$	0.593	疑似 BSI 当天 ddPCR 检测结果				
恶性肿瘤伴转移	7(8.5)	5(12.8)	$\chi^2=0.523$	0.521	病原菌总载量	228	210	$Z=0.935$	0.350
脑卒中	6(7.3)	3(7.7)	$\chi^2=0.005$	0.942	[拷贝数/mL, $M(Q_1, Q_3)$]	(68, 1 279)	(63, 541)		
疑似 BSI 当天体温($^{\circ}\text{C}, \bar{x} \pm s$)	38.6 ± 0.4	38.6 ± 0.5	$t=0.456$	0.649	大肠埃希菌	160	116	$Z=0.485$	0.627
疑似 BSI 当天 SBP (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	99.5 ± 21.4	96.7 ± 17.5	$t=0.706$	0.481	[拷贝数/mL, $M(Q_1, Q_3)$]	(77, 3 827)	(44, 1 741)		
疑似 BSI 当天 DBP (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	47.7 ± 10.0	46.0 ± 8.3	$t=0.941$	0.349	肺炎克雷伯菌载量	226	170	$Z=1.059$	0.290
合并 AKI [例(%)]	34(41.5)	20(51.3)	$\chi^2=1.031$	0.334	[拷贝数/mL, $M(Q_1, Q_3)$]	(77, 1 403)	(72, 314)		
使用血管活性药物[例(%)]	51(62.2)	32(82.1)	$\chi^2=4.837$	0.036	鲍曼不动杆菌载量	291	69	$Z=1.792$	0.073
机械通气[例(%)]	57(69.5)	34(87.2)	$\chi^2=4.424$	0.043	[拷贝数/mL, $M(Q_1, Q_3)$]	(72, 713)	(50, 319)		
CRRT [例(%)]	18(22.0)	12(30.8)	$\chi^2=1.102$	0.368	铜绿假单胞菌载量	64	113	$Z=0.065$	0.948
APACHE II 评分(分, $\bar{x} \pm s$)	20.8 ± 7.0	21.4 ± 5.9	$t=0.484$	0.630	[拷贝数/mL, $M(Q_1, Q_3)$]	(54, 399)	(45, 489)		
SOFA 评分(分, $\bar{x} \pm s$)	8.5 ± 3.8	9.6 ± 3.5	$t=1.621$	0.108	多菌感染[例(%)]	13(15.9)	12(30.8)	$\chi^2=3.587$	0.091
疑似 BSI 当天实验室指标					耐药基因阳性[例(%)]	15(18.3)	12(30.8)	$\chi^2=2.373$	0.161
WBC [$\times 10^9/\text{L}, M(Q_1, Q_3)$]	9.9(6.4, 15.7)	10.6(6.7, 18.3)	$Z=0.488$	0.626	第 7 天病原菌总载量 ^a	60	264	$Z=1.656$	0.248
PLT ($\times 10^9/\text{L}, \bar{x} \pm s$)	150.7 ± 93.1	121.5 ± 65.9	$t=1.759$	0.081	[拷贝数/mL, $M(Q_1, Q_3)$]	(0, 1 035)	(8, 1 410)		
Lac [mmol/L, $M(Q_1, Q_3)$]	2.2(1.5, 3.4)	2.6(1.6, 3.6)	$Z=1.229$	0.219	28 d 死亡[例(%)]	25(30.5)	20(51.3)	$\chi^2=4.892$	0.043

注: ddPCR 为液滴数字聚合酶链反应, BSI 为血流感染, CKD 为慢性肾脏病, SBP 为收缩压, DBP 为舒张压, AKI 为急性肾损伤, CRRT 为连续性肾脏替代治疗, APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分 II, SOFA 为序贯器官衰竭评分, WBC 为白细胞计数, PLT 为血小板计数, Lac 为血乳酸, SCr 为血清肌酐, hs-CRP 为超敏 C-反应蛋白, PCT 为降钙素原; 1 mmHg=0.133 kPa; 第 7 天病原菌总载量^a 为疑似 BSI 第 7 天生存患者数据(病原菌载量下降组 79 例, 病原菌载量未下降组 36 例)

2.2 疑似 BSI 当天 ddPCR 检测病原菌载量与疑似 BSI 患者炎症指标、灌注指标及疾病严重程度评分的相关性: 表 2 结果显示, ddPCR 检测病原菌载量与炎症指标 hs-CRP、PCT 均呈正相关(均 $P < 0.05$), 而与 WBC 的相关性则较弱($P > 0.05$); ddPCR 检测病原菌载量与灌注指标 Lac、疾病严重程度评分(APACHE II 评分、SOFA 评分)均呈正相关(均 $P < 0.05$)。

表 2 疑似 BSI 患者 ddPCR 检测病原菌载量与炎症指标、灌注指标、疾病严重程度评分的相关性

指标	ddPCR 检测病原菌载量		指标	ddPCR 检测病原菌载量	
	r 值	P 值		r 值	P 值
WBC	0.119	0.193	Lac	0.370	<0.001
hs-CRP	0.150	0.041	APACHE II 评分	0.334	<0.001
PCT	0.273	<0.001	SOFA 评分	0.311	<0.001

注: BSI 为血流感染, ddPCR 为液滴数字聚合酶链反应, WBC 为白细胞计数, hs-CRP 为超敏 C-反应蛋白, PCT 为降钙素原, Lac 为血乳酸, APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分 II, SOFA 为序贯器官衰竭评分

2.3 ddPCR 检测病原菌载量下降与未下降两组疑似 BSI 患者灌注指标、炎症指标及疾病严重程度评

分的动态变化比较: 表 3 结果显示, 病原菌载量下降组疑似 BSI 患者 Lac、hs-CRP、PCT、APACHE II 评分均随着治疗时间延长而下降, 但病原菌载量未下降组疑似 BSI 患者 hs-CRP、PCT 无明显下降, 且 APACHE II 评分、SOFA 评分随着时间延长进一步升高。疑似 BSI 第 3 天时, ddPCR 检测病原菌载量下降组 hs-CRP 和 SOFA 评分均较病原菌载量未下降组下降(均 $P < 0.05$), 而两组 Lac、PCT 和 APACHE II 评分差异仍无统计学意义(均 $P > 0.05$); 疑似 BSI 第 7 天时, ddPCR 检测病原菌载量下降组 hs-CRP、PCT、APACHE II 评分和 SOFA 评分均较病原菌载量未下降组下降(均 $P < 0.05$), 而两组 Lac 差异仍无统计学意义($P > 0.05$)。

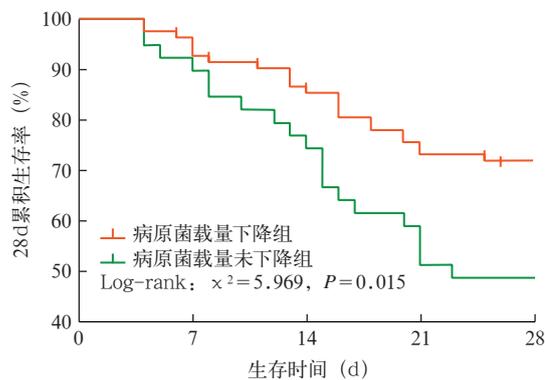
2.4 ddPCR 检测病原菌载量下降与未下降两组疑似 BSI 患者 28 d Kaplan-Meier 生存曲线分析: Kaplan-Meier 曲线显示, ddPCR 检测病原菌载量下降组患者 28 d 累积生存率高于病原菌载量未下降组(Log-rank 检验: $\chi^2=5.969, P=0.015$; 图 1)。

2.5 不同 28 d 预后两组疑似 BSI 患者基本资料比较: 121 例患者中, 28 d 生存 76 例, 死亡 45 例。

表 3 ddPCR 检测病原菌载量下降与未下降两组疑似 BSI 患者不同时间点灌注指标、炎症指标及疾病严重程度评分变化比较

指标	病原菌载量下降组 (82 例)	病原菌载量未下降组 (39 例)	统计量值	P 值
Lac [mmol/L, M(Q ₁ , Q ₃)]				
疑似 BSI 当天	2.2(1.5, 3.4)	2.6(1.6, 3.6)	Z=1.229	0.219
疑似 BSI 第 3 天	1.8(1.5, 2.3)	2.1(1.5, 3.8)	Z=1.192	0.235
疑似 BSI 第 7 天	2.0(1.4, 2.7)	2.2(1.4, 3.6)	Z=0.938	0.348
hs-CRP (mg/L, $\bar{x} \pm s$)				
疑似 BSI 当天	137.7 ± 72.4	116.5 ± 67.1	t=0.547	0.126
疑似 BSI 第 3 天	98.5 ± 60.4	125.1 ± 69.4	t=2.143	0.034
疑似 BSI 第 7 天	86.8 ± 54.0	122.3 ± 73.0	t=2.466	0.016
PCT [μg/L, M(Q ₁ , Q ₃)]				
疑似 BSI 当天	3.7(1.0, 13.6)	2.7(0.7, 7.6)	Z=0.335	0.738
疑似 BSI 第 3 天	1.9(1.0, 4.6)	1.8(0.8, 8.6)	Z=0.849	0.396
疑似 BSI 第 7 天	1.0(0.4, 2.0)	1.8(0.5, 6.7)	Z=2.120	0.034
APACHE II 评分(分, $\bar{x} \pm s$)				
疑似 BSI 当天	20.8 ± 7.0	21.4 ± 5.9	t=0.484	0.626
疑似 BSI 第 3 天	19.4 ± 6.5	21.8 ± 7.2	t=1.807	0.073
疑似 BSI 第 7 天	19.1 ± 6.5	22.4 ± 7.0	t=2.329	0.023
SOFA 评分(分, $\bar{x} \pm s$)				
疑似 BSI 当天	8.5 ± 3.8	9.6 ± 3.5	t=1.621	0.108
疑似 BSI 第 3 天	8.3 ± 4.4	10.5 ± 4.5	t=2.465	0.015
疑似 BSI 第 7 天	8.5 ± 4.1	11.0 ± 4.3	t=2.477	0.014

注: ddPCR 为液滴数字聚合酶链反应, BSI 为血流感染, Lac 为乳酸, hs-CRP 为超敏 C-反应蛋白, PCT 为降钙素原, APACHE II 为急性生理学与慢性健康状况评分 II, SOFA 为序贯器官衰竭评分



注: ddPCR 为液滴数字聚合酶链反应, BSI 为血流感染

图 1 ddPCR 检测病原菌载量下降与未下降两组疑似 BSI 患者 28 d Kaplan-Meier 生存曲线

表 4 结果显示,与生存组相比,死亡组患者年龄更大,SOFA 评分更高,PLT 更低,第 7 天 ddPCR 检测病原菌总载量更高,接受 CRRT 的比例和 ddPCR 检测病原菌载量未下降的比例更高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.6 疑似 BSI 患者 28 d 死亡危险因素的单因素和多因素 Cox 回归分析:单因素 Cox 回归分析显示,年龄、CRRT、PLT、SOFA 评分以及 ddPCR 检测病原菌载量未下降均与疑似 BSI 患者 28 d 死亡相关(均 $P < 0.05$; 表 5)。多因素 Cox 回归分析显示,年龄增

表 4 不同 28 d 预后两组疑似 BSI 患者基本资料比较

指标	生存组 (76 例)	死亡组 (45 例)	统计量值	P 值	指标	生存组 (76 例)	死亡组 (45 例)	统计量值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	69.9 ± 13.6	76.4 ± 11.7	t=-2.648	0.009	疑似 BSI 当天实验室指标				
男性[例(%)]	60(78.9)	34(75.6)	$\chi^2=0.188$	0.665	WBC [$\times 10^9/L, M(Q_1, Q_3)$]	9.9 (6.4, 15.6)	9.9 (6.6, 16.0)	Z=-0.115	0.908
基础疾病[例(%)]					PLT ($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)	158.6 ± 90.1	112.1 ± 70.8	t=2.958	0.004
慢性心功能不全	11(14.5)	10(22.2)	$\chi^2=1.183$	0.277	Lac [mmol/L, M(Q ₁ , Q ₃)]	2.2 (1.6, 3.2)	2.8 (1.6, 3.5)	Z=-1.232	0.218
CKD 4 期或 5 期	3(3.9)	1(2.2)	$\chi^2=0.261$	1.000	SCr [μmol/L, M(Q ₁ , Q ₃)]	84.8 (57.6, 143.5)	107.2 (78.0, 162.4)	Z=-1.799	0.072
恶性肿瘤伴转移	7(9.2)	5(11.1)	$\chi^2=0.113$	0.760	hs-CRP (mg/L, $\bar{x} \pm s$)	139.4 ± 74.8	116.4 ± 62.7	t=1.739	0.085
脑卒中	7(9.2)	2(4.4)	$\chi^2=0.925$	0.482	PCT [μg/L, M(Q ₁ , Q ₃)]	2.1 (0.4, 18.0)	2.1 (1.0, 5.4)	Z=-0.523	0.601
疑似 BSI 当天体温 (°C, $\bar{x} \pm s$)	38.6 ± 0.4	38.6 ± 0.5	t=-0.468	0.641	血培养阳性[例(%)]				
疑似 BSI 当天 SBP (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	99.9 ± 20.3	96.6 ± 20.1	t=0.868	0.387	9(11.8)	9(20.0)	$\chi^2=1.485$	0.223	
疑似 BSI 当天 DBP (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	48.1 ± 8.9	45.6 ± 10.4	t=1.409	0.162	疑似 BSI 当天 ddPCR 检测结果				
合并 AKI [例(%)]	29(38.2)	25(55.6)	$\chi^2=3.462$	0.063	病原菌总载量 [拷贝数/mL, M(Q ₁ , Q ₃)]	226 (77, 973)	212 (60, 1172)	Z=-0.359	0.719
使用血管活性药物 [例(%)]	50(65.8)	33(73.3)	$\chi^2=0.747$	0.388	多菌感染[例(%)]	14(18.4)	11(24.4)	$\chi^2=0.626$	0.429
机械通气[例(%)]	54(71.1)	37(82.2)	$\chi^2=1.891$	0.169	耐药基因阳性[例(%)]	15(19.7)	12(26.7)	$\chi^2=0.783$	0.376
CRRT [例(%)]	14(18.4)	16(35.6)	$\chi^2=4.450$	0.035	第 7 天病原菌总载量 ^a [拷贝数/mL, M(Q ₁ , Q ₃)]				
APACHE II 评分(分, $\bar{x} \pm s$)	20.8 ± 6.8	21.4 ± 6.5	t=-0.499	0.619	60 (0, 458)	1271 (178, 4192)	Z=-3.125	0.003	
SOFA 评分(分, $\bar{x} \pm s$)	8.1 ± 3.5	10.1 ± 3.9	t=-2.945	0.004	ddPCR 检测病原菌载量未下降[例(%)]				
					19(25.0)	20(44.4)	$\chi^2=4.892$	0.027	

注: BSI 为血流感染, CKD 为慢性肾脏病, SBP 为收缩压, DBP 为舒张压, AKI 为急性肾损伤, CRRT 为连续性肾脏替代治疗, APACHE II 为急性生理学与慢性健康状况评分 II, SOFA 为序贯器官衰竭评分, WBC 为白细胞计数, PLT 为血小板计数, SCr 为血清肌酐, Lac 为乳酸, hs-CRP 为超敏 C-反应蛋白, PCT 为降钙素原, ddPCR 为液滴数字聚合酶链反应; 1 mmHg=0.133 kPa; 第 7 天病原菌总载量^a 为疑似 BSI 第 7 天生存患者数据(生存组 76 例,死亡组 39 例)

加、SOFA 评分升高和 ddPCR 检测病原菌载量未下降是疑似 BSI 患者 28 d 死亡的独立危险因素(均 $P < 0.05$; 表 5)。

表 5 疑似 BSI 患者 28 d 死亡危险因素的
单因素和多因素 Cox 回归分析

变量	单因素分析	
	HR (95%CI)	P 值
年龄	1.032 (1.013 ~ 1.051)	0.001
合并 AKI	1.751 (0.972 ~ 3.154)	0.062
CRRT	1.968 (1.068 ~ 3.628)	0.030
PLT	0.994 (0.990 ~ 0.998)	0.006
SCr	1.000 (0.998 ~ 1.003)	0.797
hs-CRP	0.997 (0.993 ~ 1.001)	0.121
SOFA 评分	1.192 (1.134 ~ 1.254)	<0.001
ddPCR 检测病原菌 载量未下降	1.978 (1.101 ~ 3.561)	0.023
变量	多因素分析	
	HR (95%CI)	P 值
年龄	1.048 (1.020 ~ 1.078)	<0.001
SOFA 评分	1.127 (1.027 ~ 1.235)	0.007
ddPCR 检测病原菌 载量未下降	2.165 (1.148 ~ 4.091)	0.017

注: BSI 为血流感染, AKI 为急性肾损伤, CRRT 为连续性肾脏替代治疗, PLT 为血小板计数, SCr 为血清肌酐, hs-CRP 为超敏 C-反应蛋白, SOFA 为序贯器官衰竭评分, ddPCR 为液滴数字聚合酶链反应, HR 为风险比, 95%CI 为 95% 置信区间

3 讨论

重症监护病房(intensive care unit, ICU)内 BSI 患者常合并器官功能障碍,预后不佳。虽然一些临床检测指标或者疾病严重程度评分的动态变化能够反映 BSI 患者的治疗效果与预后^[15-16],但是,在临床治疗中尚缺少检测手段能够快速、实时地动态检测病原菌载量变化,以至于临床医生无法直接关注到 BSI 的病原菌动态变化。因此,本研究中针对疑似 BSI 患者,用 ddPCR 动态检测临床常见 4 种革兰阴性杆菌,旨在探讨病原菌载量变化与预后的关系。

本研究显示,疑似 BSI 患者入院当天 ddPCR 检测病原菌载量与炎症指标(hs-CRP、PCT)、灌注指标(Lac)、疾病严重程度评分(APACHE II 评分、SOFA 评分)均呈正相关。多项研究显示,疑似 BSI 患者病原菌载量与 hs-CRP、PCT 等炎症指标存在正相关^[17-18],与病原菌刺激机体产生炎症反应,而炎症反应的强度常通过炎症指标反应有关^[19]。而 Jiang 等^[20]在一项单中心前瞻性观察性研究中发现,疑似脓毒症患者的病原菌载量除与炎症指标相关外,还与 Lac 及凝血、免疫、预后等各种标志物呈正相关。因为在 BSI 患者中,更大的病原菌载量可能导致更严重的炎症反应,而严重的炎症反应往往导致器官

功能恶化。上述研究结果表明,BSI 患者 ddPCR 检测病原菌载量绝对值与炎症严重程度相关,高病原菌载量往往提示 BSI 患者预后不良。

致病病原菌载量动态变化可能成为评估 BSI 患者预后的潜在标志物。在本研究中,ddPCR 检测病原菌载量下降组疑似 BSI 患者 28 d 病死率低于病原菌载量未下降组,这与前期针对 BSI 患者的分子诊断研究结果一致^[21-22]。Ho 等^[21]的一项前瞻性观察性研究显示,在 20 例经血培养证实耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染致菌血症成人患者中,生存患者耐甲氧西林耐药基因 DNA 水平呈持续下降趋势。一项针对 51 例鲍曼不动杆菌感染致菌血症危重症患者的前瞻性观察性研究显示,初始细菌清除率较低的患者住院病死率高于清除率较高的患者^[22]。近年一项纳入 63 例 BSI 患者的多中心观察性研究显示,病原菌载量增加是 28 d 死亡的危险因素^[23]。以上研究结果表明,通过 ddPCR 检测 BSI 患者病原菌 DNA 载量的变化趋势,可能有助于评估患者对治疗的反应及预后。本研究显示,基于 ddPCR 动态检测病原菌载量未下降是疑似 BSI 患者 28 d 死亡的独立危险因素,说明疑似 BSI 患者病原菌载量绝对值不仅提示病情危重程度,而且其动态变化可能是临床预后的潜在影响因素。病原菌载量动态下降基本上反映了机体内病原菌的清除水平,但其受抗菌药物使用是否恰当、感染灶清除与否、自身免疫情况等影响。抗菌药物不合理使用可能与病原菌清除水平下降有关^[24],提示病原菌载量可作为临床抗菌药物使用有效性的评估指标之一。由于本研究缺少对患者原发病、免疫状态的评估,故还需要进一步研究宿主免疫原性影响病原体载量动态变化的相关机制。

与血培养相比,ddPCR 更容易检测到多菌感染,因为它可以消除因优先扩增而可能产生的偏差,并且可以对低浓度的病原体进行定量。前期一项小样本研究表明,多菌感染与 BSI 患者不良预后相关^[14]。Pammi 等^[25]在一项回顾性病例对照研究中也观察到,新生儿 ICU 中多菌感染致 BSI 患者的病死率相较于单菌感染 BSI 患者的病死率增加 3 倍以上。近年研究者在一项多中心观察性研究中发现,ddPCR 检测证实的多菌感染是 BSI 患者 28 d 死亡的独立危险因素^[23]。但是,在本研究中未发现多菌感染与疑似 BSI 患者预后不良有关,可能与本研究仅纳入

4 种常见革兰阴性杆菌感染患者,从而导致部分多菌感染患者未被纳入有关。

综上所述,用 ddPCR 检测病原菌载量能够反映疑似 BSI 患者疾病严重程度,而动态检测病原菌载量能够反映疑似 BSI 患者预后,揭示了 ddPCR 检测在疑似 BSI 患者治疗监测中的作用。未来还需要进一步扩大检测体系涵盖多种阴性菌、阳性菌和真菌,以关注 ICU 内疑似 BSI 患者病原菌动态变化对预后的影响。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 邵自强: 酝酿和设计实验、实施研究、分析/解释数据、起草文章、获取研究经费;金君: 采集数据、分析/解释数据、统计分析;呼邦传: 酝酿和设计实验、实施研究、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;孙仁华: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、指导

参考文献

- Muñoz P, Cruz AF, Rodríguez-Crèixems M, et al. Gram-negative bloodstream infections[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32 Suppl 1: S10-S14. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.015.
- Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria[J]. N Engl J Med, 2010, 362(19): 1804-1813. DOI: 10.1056/NEJMra0904124.
- Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. Current status and trends of antibacterial resistance in China[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(suppl_2): S128-S134. DOI: 10.1093/cid/ciy657.
- Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, et al. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(2): 266-284. DOI: 10.1007/s00134-020-05950-6.
- Liu VX, Fielding-Singh V, Greene JD, et al. The timing of early antibiotics and hospital mortality in sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 196(7): 856-863. DOI: 10.1164/rccm.201609-1848OC.
- Buehler SS, Madison B, Snyder SR, et al. Effectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for inpatients with bloodstream infections: a laboratory medicine best practices systematic review and Meta-analysis[J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(1): 59-103. DOI: 10.1128/CMR.00053-14.
- Timsit JF, Bassetti M, Cremer O, et al. Rationalizing antimicrobial therapy in the ICU: a narrative review[J]. Intensive Care Med, 2019, 45(2): 172-189. DOI: 10.1007/s00134-019-05520-5.
- Murri R, Taccari F, Spanu T, et al. A 72-h intervention for improvement of the rate of optimal antibiotic therapy in patients with bloodstream infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(1): 167-173. DOI: 10.1007/s10096-017-3117-2.
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(11): 1181-1247. DOI: 10.1007/s00134-021-06506-y.
- FABLED Investigators. Blood culture results before and after antimicrobial administration in patients with severe manifestations of sepsis: a diagnostic study[J]. Ann Intern Med, 2019, 171(8): 547-554. DOI: 10.7326/M19-1696.
- Zhang Y, Hu AN, Andini N, et al. A 'culture' shift: application of molecular techniques for diagnosing polymicrobial infections[J]. Biotechnol Adv, 2019, 37(3): 476-490. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.013.
- Zheng Y, Jin J, Shao ZQ, 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]. Microbiol Open, 2021, 10(6): e1247. DOI: 10.1002/mbo3.1247.
- Hu BC, Tao Y, Shao ZQ, 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. DOI: 10.3389/fmicb.2021.641202.
- Shao ZQ, Zhu JW, Wei YY, et al. Pathogen load and species monitored by droplet digital PCR in patients with bloodstream infections: a prospective case series study[J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 771. DOI: 10.1186/s12879-022-07751-2.
- 许晓兰, 王海霞, 吴晓燕, 等. 早期感染性休克相关性血小板减少症的危险因素及对预后的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33(8): 938-943. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210112-00036.
- 杨明月, 杨小娟, 景佩, 等. 凝血功能联合 APACHE II 及 SOFA 评分对血流感染患者预后的预测价值[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33(12): 1434-1439. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210910-01361.
- Lin K, Zhao YH, Xu B, et al. Clinical diagnostic performance of droplet digital PCR for suspected bloodstream infections[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(1): e0137822. DOI: 10.1128/spectrum.01378-22. Erratum in: Microbiol Spectr, 2024, 12(1): e0153423. DOI: 10.1128/spectrum.01534-23.
- Yin S, Lin YR, Wang BQ, et al. Reliability of droplet digital PCR alone and in combination with interleukin-6 and procalcitonin for prognosis of bloodstream infection[J]. Infect Drug Resist, 2024, 17: 1051-1071. DOI: 10.2147/IDR.S439683.
- van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. The immunology of sepsis[J]. Immunity, 2021, 54(11): 2450-2464. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.10.012.
- Jiang S, Zhao DY, Wang CX, et al. Clinical evaluation of droplet digital PCR in the early identification of suspected sepsis patients in the emergency department: a prospective observational study[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1358801. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1358801.
- Ho YC, Chang SC, Lin SR, et al. High levels of mecA DNA detected by a quantitative real-time PCR assay are associated with mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(5): 1443-1451. DOI: 10.1128/JCM.01197-08. Erratum in: J Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2361.
- Chuang YC, Chang SC, Wang WK. Using the rate of bacterial clearance determined by real-time polymerase chain reaction as a timely surrogate marker to evaluate the appropriateness of antibiotic usage in critical patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia[J]. Crit Care Med, 2012, 40(8): 2273-2280. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182515190. Erratum in: Crit Care Med, 2012, 40(10): 2932.
- Zhao YH, Lin K, Zhang HC, et al. Prognostic value of polymicroorganisms detected by droplet digital PCR and pathogen load kinetics in sepsis patients: a multi-center prospective cohort study[J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(5): e0255823. DOI: 10.1128/spectrum.02558-23.
- Lyle N, Boyd J. The potential for PCR based testing to improve diagnosis and treatment of sepsis[J]. Curr Infect Dis Rep, 2013, 15(5): 372-379. DOI: 10.1007/s11908-013-0350-4.
- Pammi M, Zhong DN, Johnson Y, et al. Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 390. DOI: 10.1186/1471-2334-14-390.

(收稿日期: 2025-06-23)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)