

·临床研究·

微滴式数字聚合酶链式反应在重症患者念珠菌感染中的应用

何志捷¹, 李伟超², 吴碧莹², 植耀炜²

(1. 广州新华学院康复医学系, 广东 广州 510520; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院重症医学科, 广东 广州 510000)

摘要:【目的】探讨微滴式数字PCR(ddPCR)检测在重症患者念珠菌感染的诊断应用价值。【方法】建立 ddPCR 技术检测念珠菌的反应体系, 验证 ddPCR 检测念珠菌的特异性、Cutoff 值等, 并应用 ddPCR 检测临床标本, 与真菌培养结果比较, 验证该方法在临床应用的可靠性。【结果】本研究建立的基于 ddPCR 检测念珠菌的方法与真菌培养比较, 具有较高的特异性, ddPCR 检测临床样本中念珠菌的敏感度及特异度分别为 0.583(95%CI: 0.433, 0.721) 和 0.962(95%CI: 0.924, 0.982), 检测结果与真菌培养结果基本一致($Kappa=0.604, P<0.05$)。ddPCR 检测时间约为 7 h, 明显短于传统的真菌培养法。【结论】ddPCR 检测重症患者念珠菌感染可靠性高且检测时间短。基于 ddPCR 技术的念珠菌检测方法具有较大的潜在临床应用价值。

关键词:念珠菌; 微滴式数字 PCR; 临床诊断; 念珠菌感染; 念珠菌血症

中图分类号: R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2026)01-0182-07

DOI: 10.11714/jsysu.med.YX20250119

Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Candidiasis in Critically Ill Patients

HE Zhijie¹, LI Weichao², WU Biying², ZHI Yaowei²

(1. Faculty of Rehabilitation Medicine, Guangzhou Xinhua University, Guangzhou 510520, China; 2. Department of Critical Care Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China)

Correspondence to: ZHI Yaowei; E-mail: zhiyw@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To evaluate the diagnostic value of droplet digital PCR (ddPCR) for detecting *Candida* infections in critically ill patients. 【Methods】 A ddPCR assay for *Candida* detection was established and optimized, including design of primers and probes, optimization of PCR reaction, and validation of analytical specificity and cutoff threshold. Clinical specimens were analyzed by ddPCR and fungal culture in parallel to assess clinical performance and reliability. 【Results】 The ddPCR assay demonstrated high analytical specificity for *Candida* detection. The sensitivity and specificity of ddPCR for detecting *Candida* in clinical samples were 0.583 (95%CI: 0.433, 0.721) and 0.962 (95%CI: 0.924, 0.982). The ddPCR detection results were consistent with the fungal culture results ($Kappa=0.604, P<0.05$). The total assay time for ddPCR was approximately 7 hours, substantially shorter than conventional fungal culture. 【Conclusion】 The ddPCR assay provides reliable and rapid detection of *Candida* in critically ill patients with markedly reduced turnaround time compared with conventional culture. Given its high specificity and operational efficiency, the ddPCR-based method holds significant potential for clinical implementation as a complementary diagnostic tool.

Key words: *Candida*; droplet digital PCR; clinical diagnosis; candidiasis; candidemia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(1): 182-188]

收稿日期: 2025-09-04

录用日期: 2025-11-28

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515011248)

作者简介: 何志捷, 第一作者, 研究方向: 脓毒症、重症感染, E-mail: hezhijie@mail.sysu.edu.cn; 植耀炜, 通信作者, E-mail: zhiyw@mail.sysu.edu.cn

念珠菌(*Candida*)是重症监护病房(intensive care unit, ICU)患者的常见致病病原体之一,有文献报道,侵袭性念珠菌感染(invasive candidiasis, IC)占ICU患者所有感染病例的20%^[1]。且发病率呈持续上升趋势,同时念珠菌作为医院获得性血流感染的第4大常见病原体^[2],侵袭性念珠菌病是重症患者死亡的重要原因之一,在免疫功能低下、广谱抗生素使用及侵入性操作的患者中念珠菌血症(candidemia)病死率高达40%~70%^[3-4]。然而,念珠菌感染的传统诊断方法(如血培养)存在灵敏度低(30%~50%)^[5]、耗时长(168 h)的缺陷^[6],导致诊断及抗真菌治疗延迟,显著影响重症患者预后。近年来,病原体分子诊断技术在临床逐渐应用,尤其是微滴式数字PCR(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)因具备绝对定量能力、具有较高的特异性及灵敏度(可检测<5 CFU/mL),已在相关领域推广应用^[7-12],而应用ddPCR协助诊断重症患者的念珠菌感染病原学诊断仍未见报道,本研究探讨ddPCR检测在重症患者念珠菌感染的诊断应用价值,为早期精准诊断提供了新路径。

1 材料与方法

1.1 资料

收集2018年8月至2020年12月中山大学孙逸仙纪念医院重症医学科收治的临床高度怀疑念珠菌感染的住院患者,收集患者肺部痰液、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、血液标本,排除临床资料不全患者,最终纳入117例患者的260份标本为研究对象。根据以上标本的实验室真菌培养结果,分为阳性组及阴性组。其中阳性标本48例,阴性标本212例。以上标本来源于中山大学孙逸仙纪念医院检验科检测时残留样本,受试者的基本信息及实验室真菌培养结果及其他等临床资料均来源于医院电子病历数据系统。本研究经中山大学孙逸仙纪念医院医学伦理委员会审核通过(审批号:SYSKY-2024-698-01),所有研究对象均自愿参加本次研究并签署知情同意书。

1.2 实验仪器及设备

见表1。

1.3 实验方法

1.3.1 样本 使用含本试剂盒可检测的4种念珠菌阳性对照DNA片段的克隆质粒,进行10倍连续

表1 实验仪器及设备

Table 1 Experimental instruments and equipment

Name	Manufacturer	Type
Vortex mixer	Haimen Kylin-Bell	Vortex-5
Pipette	Rainin	
Mini centrifuge	Xinzhuang	XK-400
PCR thermocycler	EASTWIN	ETC 811
Droplet generator	FOREVERGEN	MicroDrop-400A
Droplet reader	FOREVERGEN	MicroDrop-400B

梯度稀释制备成5个浓度点的参考品。

1.3.2 数字PCR检测的PCR扩增体系的配制 取18 μ L PCR反应液加入2 μ L参考品DNA模板,轻轻涡旋混合均匀。

1.3.3 微滴生成 配制好的20 μ L数字PCR扩增体系加入到8道的微滴生成芯片中,然后加入50 μ L微滴生成油至Creator微滴生成仪(广东顺德永诺生物科技有限公司)中制备PCR微反应液滴。

1.3.4 将制备好的PCR微反应液滴小心转移至96孔反应板上,用封板膜进行热封。

1.3.5 将热封好的96孔板放入数字PCR仪中,设置反应程序进行PCR扩增,PCR扩增反应程序为:50 $^{\circ}$ C, 2 min 1个循环;95 $^{\circ}$ C, 10 min 1个循环;94 $^{\circ}$ C, 30 s 变性,60 $^{\circ}$ C, 60 s 退火、延伸共进行40个循环;98 $^{\circ}$ C, 10 min 1个循环;16 $^{\circ}$ C 保持;设置热盖温度105 $^{\circ}$ C, 样本体积50 μ L,升降温速率1.0 $^{\circ}$ C/s。

1.3.6 PCR扩增反应后将96孔板置于Detector微滴检测仪(广东顺德永诺生物科技有限公司)中进行检测荧光信号,含有核酸分子模板的微滴信号检测仪就会给出荧光信号,不含模板的微滴信号检测仪就没有荧光信号。最后根据泊松分布原理及阳性微滴的比例,采用MicroDrop™数字PCR仪配套数据分析软件(MD Plotter数据分析软件)可确定念珠菌的种类和计算出拷贝数含量。

1.4 统计学方法

使用PASS 2021软件基于预期kappa值计算所需最小样本量,使用SPSS 22.0软件进行统计学分析,统计图采用Microsoft Excel 2021软件,正态分布检验和方差齐性检验采用Shapiro-Wilk检验及Levene检验,符合正态分布的连续变量计数资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较采用t检验;不符合正态分布的计量资料或计数资料采用中位数

(四分位数)表示。分类计量资料采用频数描述,组间比较采用 χ^2 检验。真菌培养和ddPCR两种方法检测结果的一致性采用Kappa检验。使用VassarStats在线计算器计算敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及其95%置信区间。采用双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本资料

2.1.1 标本类型 本研究共纳入研究对象为117例重症患者260例实验室标本,均进行真菌培养余下残留标本。血标本181例(69.61%);真菌培养阳

性3例、阴性178例;而ddPCR阳性2例,ddPCR阴性标本179例。痰标本67例(25.76%);真菌培养阳性39例、阴性28例;ddPCR阳性标本29例,检测出白色念珠菌19例、近平滑念珠菌6例、热带念珠菌6例、光滑念珠菌5例,部分同时检测出两种真菌,ddPCR阴性共38例。BALF标本12例(4.61%);真菌培养阳性及阴性标本各6例;ddPCR阳性标本5例,检测结果为白色念珠菌4例、热带念珠菌1例,ddPCR阴性7例。

2.1.2 研究人群的基本特征 真菌培养阳性组患者平均年龄(68.9 ± 12.3)岁,男性23例,女性25例,真菌培养阴性组患者平均年龄(65.8 ± 14.7)岁,男性127例,女性136例。两组比较,差异均无统计学意义(表2)。

表2 两组患者的基本资料

Table 2 Baseline characteristics of patients in both groups

($\bar{x}\pm s, n$)

Item	Culture positive ($n=36$)	Culture negative ($n=224$)	t	P
Age/year	68.9 ± 12.3	65.8 ± 14.7	1.42	0.157
Gender (male/female)	23/25	127/136	-	0.956

The age distribution conforms to normality and homogeneity of variance. For variable gender, Fisher's exact test was employed due to small sample sizes.

2.2 微滴式数字PCR检测体系的建立

从NCBI上搜索到白色念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌的核糖体rRNA的小亚基18S的保守的核酸区域序列,通过多序列比对软件CLUSTALW对上述序列进行比对寻找特异性区域。针对特异性区域序列利用Primer Premier软件设计能扩增出各念珠菌的上下游引物和探针。根据引物设计原理,分别针对各念珠菌类型设计了2~3对引物和探针组合。合成并采用PCR技术对多对引物和探针组合进行测试,不同扩增长度对该实验方案的灵敏度会有影响。经筛选得到4种念珠菌的最优引物和探针序列如表3所示。

2.3 特异性实验

通过临床样本验证探针引物性能,对4例具有真菌培养结果的痰液临床样本进行检测,两者一致度100%,说明检测体系特异性100%(表4)。

2.4 临界值试验

选取经数字PCR标定过的阳性样本(1.5×10^3 copies/mL),使用阴性人源核酸作为稀释液,稀释至

理论浓度300 copies/mL和150 copies/mL这2个浓度梯度,然后各进行10次重复提取检测。将具有95%以上阳性检出率的浓度作为最低检出限,由此确定LOD为300 copies/mL(表5)。

2.5 微滴式数字PCR在临床标本检测中的应用

根据上述实验室条件建立的ddPCR方法,对260例临床标本提取DNA进行ddPCR检测,并以真菌培养为金标准,评估ddPCR检测对临床标本的检出能力、敏感性和特异性。本研究所建立的基于ddPCR的念珠菌检测方法与临床真菌培养结果详见表6,其中ddPCR检测阳性标本36例,阴性标本224例;真菌培养阳性标本48例,阴性标本212例。若以真菌培养为金标准评价真菌感染,则ddPCR检测的敏感度及特异度分别为0.583(95%CI:0.433, 0.721)和0.962(95%CI:0.924, 0.982),阳性预测值及阴性预测值分别为0.778和0.911(表7)。

ddPCR检测与真菌培养结果一致性良好。结果显示,这两种方法检测结果的总一致率为89.23%,Kappa检验提示二者具有较好的一致性(Kappa=0.604, $P<0.05$)。

表3 4种念珠菌的最优引物和探针序列

Table 3 The best primers and probes for four *Candida* species

<i>Candida</i> species	Primers or probes	Nucleotide sequence
<i>Candida albicans</i>	upstream primer	CTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTC
	downstream primer	GTCAGAGGCTATAACACACAGCAG
	probe	VIC-TTTACCGGGCCAGCATCGGTTT-BHQ1
<i>Candida glabrata</i>	upstream primer	CCTGTTTGAGCGTCATTTC
	downstream primer	AGCACGCACAAAACACTCACTTAT
	probe	FAM-TAGGTTTTACCAACTCGGTGTTGAT-MGB
<i>Candida parapsilosi</i>	upstream primer	GGGTTTGGTGTGAGCGATA
	downstream primer	GGAGTTTGTACCAATGAGTGAAAA
	probe	FAM-CTCCGCCTTTCTTTCAAGCAAACCCAG-BHQ1
<i>Candida tropicalis</i>	upstream primer	GCGGTAGGAGAATTGCGTT
	downstream primer	TCATTATGCCAACATCCTAGGTTTA
	probe	VIC-CGCAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAG-BHQ1

表4 ddPCR与真菌培养结果的一致性比较

Table 4 Comparison of results between ddPCR and fungal culture

Sample number	Target gene	Positive droplets	Negative droplets	Sum of droplets	Copies/ μ L	Copies/20 μ L	Result of ddPCR	Result of fungal culture
Sputum sample 1	C.alb	13 808	43 772	57 580	1 908.01	38 160.19		
	C.gla	0	57 580	57 580	0	0	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>
	C.para	0	61 194	61 194	0	0	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>
	C.trp	0	61 194	61 194	0	0		
Sputum sample 2	C.alb	0	47 058	47 058	0	0		
	C.gla	1 014	46 044	47 058	207.56	4 151.18	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>
	C.para	0	68 599	68 599	0	0	<i>glabrata</i>	<i>glabrata</i>
	C.trp	0	68 599	68 599	0	0		
Sputum sample 3	C.alb	0	62 571	62 571	0	0		
	C.gla	0	62 571	62 571	0	0	<i>Candida</i>	<i>Candida parapsilosi</i>
	C.para	0	51 249	51 249	0	0	<i>parapsilosi</i>	<i>silosi</i>
	C.trp	1 526	49 723	51 249	210.36	4 207.17		
Sputum sample 4	C.alb	0	63 174	63 174	0	0		
	C.gla	0	63 174	63 174	0	0	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>
	C.para	11 698	53 353	65 051	1379.55	27 591.00	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>
	C.trp	0	65 051	65 051	0	0		

Positive droplets: the number of droplets exhibiting increased fluorescence; Negative droplets: the number of non-fluorescent droplets; Sum of droplets: the number of positive droplets plus negative droplets. Copies/ μ L: the absolute initial copy number of the target gene determined by fitting the fraction of positive droplets into a Poisson distribution. C.alb: *Candida albicans*; C.gla: *Candida glabrata*; C.para: *Candida parapsilosi*; C.trp: *Candida tropicalis*. The results of ddPCR are completely consistent with that of the fungal culture. The amplification specificity and efficiency of the above-mentioned primers and probes are both relatively high, and the sensitivity of detection is higher when using these combinations. What's more, there is little interaction among such primers and probes.

表5 不同模板浓度的检出率比较

Table 5 Comparison of detection rates at different template concentrations

Template concentration	300 copies/mL		150 copies/mL	
	Positive cases/ <i>n</i>	Detection rate/%	Positive cases/ <i>n</i>	Detection rate/%
<i>Candida albicans</i>	10	100	5	50
<i>Candida glabrata</i>	10	100	6	60
<i>Candida parapsilosi</i>	10	100	5	50
<i>Candida tropicalis</i>	10	100	4	40

Detection rate (%)=(positive cases/10)×100%.

表6 260例标本 ddPCR 与真菌培养结果

Table 6 Results of 260 specimens between ddPCR and fungal culture

Items	ddPCR+	ddPCR-	total
Culture (+)	28	20	48
Culture (-)	8	204	212
Total	36	224	260

2.6 微滴式数字 PCR 与真菌培养的检测时间及成本比较

本研究中, ddPCR 定量检测法的检测时间明显短于传统的真菌培养法。在检测时间上, ddPCR 定量法从采集到标本进行预处理至发出报告约为 35.8 h, 其中检测时间仅需 7 h, 传统的真菌培养及药敏鉴定时间则需要 168 h。而成本方面, ddPCR 检测每份标本需花费 576 元; 相比之下, 真菌培养及药敏鉴定每份标本只需花费 235 元(表 8)。

3 讨论

如前所述, 念珠菌是重症患者感染的常见病原体, 多个研究表明其为医院重症患者血流感染的第 4 位常见病原体, 且随着各种侵入性诊疗技术临床

应用及肿瘤患者的各种综合治疗对免疫系统的影响, 导致念珠菌感染的发病率仍在上升, 尽管多种有效的抗感染药物, 仍未能有效改善念珠菌感染患者的预后。其中, 缺失念珠菌感染的早期识别的方法, 导致诊断及抗真菌药物的延迟使用, 可能为影响预后的重要因素之一^[13-14]。病原学培养阳性是诊断的念珠菌感染的直接证据之一, 其特异性高, 且可以鉴别菌种及进行抗真菌药物敏感性实验, 能较为有效的指导临床抗菌药物的使用, 但真菌培养周期长, 阳性率较低, 不能达到早期诊断、早期治疗的目的。真菌感染的非培养诊断技术, 如真菌相关抗原检查如 β-D-葡聚糖检测, 有研究显示, 其对 IC 的敏感性 & 特异性分别为 65%~85% 和 75%~85%^[15], 但容易出现假阳性, 特别是使用了多糖类抗癌药物、丙种球蛋白、血制品等, 且 β-D-葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁上, 该方法无法区分具体菌种。核酸 PCR 检测虽缩短了检测窗口, 但灵敏度相对较低, 研究显示 ddPCR 的最低检出限 3.2 拷贝/L, 而 qPCR 的检出限为 32 拷贝/L^[16], 存在假阳性/阴性率高或定量标准化不足的问题^[17]。

ddPCR 是一种核酸分子绝对定量技术, 通过将样本分割成数万个微滴进行独立扩增, 实现对目标 DNA 分子的绝对计数, 其原理为: 标准 PCR 反应体

表7 260例标本 ddPCR 与真菌培养结果的一致性比较

Table 7 Comparison of consistency between dd PCR and fungal culture results in 260 specimens

Method	ddPCR	ddPCR	Sensitivity 95%CI/%	Specificity 95%CI/%	PPV 95%CI/%	NPV 95%CI/%
	(+)	(-)				
Culture (+)	28	20	58.3 (43.3, 72.1)	96.2 (92.4, 98.2)	77.8 (60.4, 89.3)	91.1 (86.4, 94.3)
Culture (-)	8	204				

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; 95%CI: 95% confidence interval.

表8 ddPCR与真菌培养检测时间及成本的比较
Table 8 Comparisons of detection time and cost between ddPCR and fungal culture

Method	Detection time/h	Cost/yuan
ddPCR	7	576
Culture	168	235

系经过有限的稀释产生微滴后,每个微滴包含或不包含一个或多个拷贝的目标待检靶分子(DNA模板),实现“单分子模板PCR扩增”,经过PCR循环之后,含有核酸分子模板的微滴会采集到荧光信号,不含模板的微滴则未能产生荧光信号。根据微滴检测仪采集到的荧光信号,依据泊松分布定律、阳性微滴的比例和稀释倍数等已知数据,利用数据分析软件计算得到目标待检靶分子的绝对定量浓度或者拷贝数。ddPCR的最低检测限(limit of detection, LoD)可达到个位数拷贝/mL。与qPCR相比,ddPCR的灵敏度更可提升500倍^[18-19]。前期研究表明^[20],ddPCR对本标载菌量要求低,其对念珠菌的检测限低至1~2个基因组拷贝/反应,在血清、支气管BALF等复杂样本中仍保持>95%的灵敏度^[21],且可同步鉴别白念珠菌、光滑念珠菌等念珠菌菌种^[22]。因此有望可以作为念珠菌感染的早期诊断的有效方法之一。

前期我们进行了念珠菌ddPCR检测的方法建立,基于前研究及理论依据,此次收集临床重症患者的血液、痰液、BALF样本,在其进行真菌培养同时进行念珠菌ddPCR检测,验证比较ddPCR和真菌培养的检测效能,综合评估ddPCR检测方法的敏感度、特异性、重复性及临床适用性。收集了260例临床标本进行ddPCR检测,结果表明本研究所建立的基于ddPCR的念珠菌检测方法与临床真菌培养结果整体上一致,其中血真菌培养阳性3例,阴性178例,ddPCR阳性2例、阴性179例。ddPCR阳性2例。痰真菌培养阳性39例、阴性28例,ddPCR阳性29例,阴性38例。BALF真菌培养阳性及阴性标本各6例,ddPCR阳性5例、阴性7例。ddPCR检测在血液标本、痰液、BALF标本与真菌培养结果基本一致。另外,以真菌培养为标准,ddPCR展现出极高的特异性及阴性预测值的突出优势。这意味着ddPCR的阴性结果可以可靠地用于排除真菌感

染,对于临床快速停用不必要的抗真菌药物、减少药物副作用和医疗花费具有重要价值。而ddPCR的敏感性较差,表明对ddPCR阳性或临床高度怀疑的患者,仍需进行培养以确认并获取药敏信息,以指导药物治疗方案。因此,首先利用ddPCR进行快速筛查以高效排除非念珠菌感染者,再对ddPCR阳性者进行培养来确认致病菌种并针对药敏精准治疗,以减少反复送检真菌培养的医疗成本和时间成本,这可能是一种较好的联合诊断策略。但其局限在于临床中血真菌培养敏感度低,且痰真菌培养的假阳性率高,故以真菌培养为标准来评价ddPCR的敏感性、特异性可能会与临床实际应用存在分歧。在检测时间上,ddPCR检测约需7h,明显短于传统的真菌培养,在获取病原学证据上具有明显的时间优势。

因此我们认为ddPCR检测对临床念珠菌病的诊断具有较高的潜在应用价值,尤其是在低菌负荷患者的样本检测中,ddPCR检测时间短,所需标本量少,与qPCR及念珠菌培养检测相比,均表现出了显著的优势,可为临床念珠菌感染的诊断提供有力的依据,具有重要的临床价值。

综上所述,本研究中建立的基于ddPCR技术的高灵敏度念珠菌检测方法在念珠菌病的临床诊断中具有较大的潜在应用价值,有望为临床念珠菌病提供有效的检测方法。然而,本研究样本偏少,阳性样本例数较少,尤其在血液标本中阳性例数仅2例,可能导致统计效能不足,仍需后续开展多中心、大样本临床试验进一步验证ddPCR检测对不同部位念珠菌感染的应用价值。另外,ddPCR技术的临床推广仍面临挑战:①标准化的缺失,目前尚无统一引物或探针体系及阈值设定标准(如Ct值或拷贝数临界点),不同厂商的微滴生成技术不统一,检测结果难以横向对比,且缺乏跨实验室的对比较证。②成本方面,仪器与耗材的费用目前仍高于传统方法(如常规PCR、血培养),且商业化的ddPCR平台的初始投入和持续维护费用高,导致ddPCR的检测费用比真菌培养高,可能影响该技术在基层医疗机构的推广普及。③临床价值方面,与真菌培养比较,ddPCR缺乏药物敏感试验,仅能检测预设的耐药基因,可能漏检新耐药机制或未涵盖的病原体,导致假阴性结果;同时也需要开展更多前瞻性临床研究验证其在指导用药、疗效监测中的价值。

参考文献

- [1] Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(Suppl. 1): i4-i13.
- [2] Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species [J]. *Clin Infect Dis*, 1995, 20(Suppl 2): S165-178.
- [3] 关丽娜, 曹伟杰, 白炎亮, 等. 血液病患者合并念珠菌血症 107 例[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2025, 25(4): 383-388.
Guan LN, Cao WJ, Bai YL, et al. A retrospective analysis of 107 cases of hematologic disease complicated with candidemia [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2025, 25(4): 383-388.
- [4] Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, et al. Invasive Candidiasis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 18026.
- [5] Fortún J, Meije Y, Buitrago MJ, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(11): 3134-3141.
- [6] Clancy CJ, Nguyen MH. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis: from traditional methods to the current "omic" era [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2008-2012.
- [7] 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.
- [8] Kojabad AA, Farzanehpour M, Esmaeili Gouvarchin GH, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(8): 4182-4197.
- [9] Nyaruaba R, Mwaliko C, Kering KK, et al. Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2019, 117: 85-92.
- [10] Hiillos AL, Thonig A, Knott KE, et al. Droplet digital PCR as a tool for investigating dynamics of cryptic symbionts [J]. *Ecol Evol*, 2021, 11(23): 17381-17396.
- [11] Li H, Bai R, Zhao Z, et al. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20181170.
- [12] 李辉桃, 胡成平, 陈琼, 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.
Li HT, Lu CP, Chen Q, et al. Clinical value of droplet digital PCR in rapid diagnosis of invasive fungal infection in neonates [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2019, 21(1): 45-51.
- [13] Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(9): 3640-3645.
- [14] Garey KW, Rege M, Pai MP, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43(1): 25-31.
- [15] Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, et al. Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(1): 39-49.
- [16] Li J, Chen Y, Li G, et al. Comparison of droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in detecting neonatal invasive fungal infections [J]. *J Biomater Tissue Eng*, 2021, 11(3): 373-379.
- [17] Mikulska M, Viscoli C, Dodesini AR, et al. Beta-D-glucan assay in patients with hematological malignancies: diagnostic accuracy for invasive fungal diseases and correlation with other diagnostic tools [J]. *Crit Care*, 2012, 16(6): R222.
- [18] White PL, Lockhart SR, Pfeiffer CD, et al. Multicenter evaluation of the T2 magnetic resonance assay for the diagnosis of invasive candidiasis in patients with suspected fungal infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(7): e02042-19.
- [19] Nguyen MH, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, et al. 2021 infectious diseases society of America clinical practice guideline for the management of candidiasis: summary of recommendations [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(7): e1449-e1457.
- [20] 何志捷, 李伟超, 何铭辉, 等. 微滴式数字 PCR 技术快速诊断侵袭性念珠菌病的方法建立 [J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(19): 2738-2746.
He ZJ, Li WC, He MH, et al. Rapid diagnosis of invasive candidiasis by droplet digital PCR [J]. *J Pract Med*, 2024, 40(19): 2738-2746.
- [21] Merolle L, Girard C, Desoubeaux G, et al. Evaluation of two new molecular assays for rapid detection of *Candida* spp. in blood cultures: the SeptiFast test and the FilmArray blood culture identification panel [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 991.
- [22] Montesinos I, Peman J, Pujol M, et al. Evaluation of the Abbott realtime *Candida* assay for direct detection of *Candida* spp. in blood cultures: a multicenter study [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(2): 329-336.

(编辑 黄子芸)