doi:10.11659/jjssx.06E024059

·综 述·

新生儿早发性败血症分子诊断方法新进展

谭雄俊,林吉涛,朱晓连,张丽娟,温清华,郑淮武 (深圳市宝安区人民医院新生儿科,广东 深圳 518101)

[摘 要] 新生儿败血症是一个全球性的健康问题,严重影响新生儿的身体健康及生命安全;在早产儿中,其发病率更高,尤其是出生后72 h内的早发性败血症(EOS)。新生儿EOS的诊断需进行一系列检查,早期和准确的诊断能够及时改善患儿临床结局并减少抗生素的过度使用。目前,EOS诊断的常用生物标志物和传统血培养方法具有一定缺点,因此寻找新的分子诊断方法迫在眉睫。本文总结并比较了新生儿EOS的早期与新型诊断方法,以期为临床提供参考。

[关键词] 新生儿败血症;新生儿早发性败血症;PCR技术;T2磁共振技术;分子诊断方法

[中图分类号] R725.9 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-06-17

New progress in molecular diagnostic methods for early-onset sepsis in newborns

TAN Xiong-jun, LIN Ji-tao, ZHU Xiao-lian, ZHANG Li-juan, WEN Qing-hua, ZHENG Huai-wu (Department of Neonatology, People's Hospital of Bao'an District in Shenzhen, Shenzhen Guangdong 518101, China)

Abstract: Neonatal sepsis is a global health problem that seriously affects the body health and life safety of newborns. It has a higher incidence in preterm infants, especially for early-onset sepsis (EOS) within 72 hours of birth. The diagnosis of neonatal EOS requires a series of examinations, and early and accurate diagnosis can improve clinical outcomes and reduce antibiotic overuse in a timely manner. At present, the commonly used biomarkers and traditional blood culture methods for EOS diagnosis have certain shortcomings, so it is urgent to find new molecular diagnostic methods. This article summarizes and compares the early and novel diagnostic methods of neonatal EOS, in order to provide a reference for clinical practice.

Keywords: neonatal sepsis; neonatal early-onset sepsis; PCR technology; magnetic resonance T2 technique; molecular diagnostic methods

新生儿各器官尚未完全发育成熟且免疫功能较差,极易被病原微生物侵袭而发生感染。若新生儿的血液或脑脊液被细菌、病毒或真菌等病原微生物侵入,就会引起新生儿败血症,严重时还会在体内产生迁移病灶[1]。新生儿败血症可分为发生在出生后72 h内的早发性败血症(early-onset sepsis,EOS)和发生在出生后第4天或之后的晚发性败血症(late-onset sepsis,LOS)[2]。根据世界卫生组织报告,每年有10%的5岁以下儿童死亡归因于新生儿败血症[3]。EOS主要由无乳链球菌和大肠杆菌引起,易出现休克、弥漫性血管内凝血及死亡。EOS的临床表现为非特异性体征,但病情进展快,甚至会导致新生儿死亡,因此需尽快检查[4]。目前其诊断大多依赖传统的血培养,耗时较长,可能延迟关键的治疗决策[5]。本文对目前临床中常用的EOS诊断方法研究进展进行综述,对在诊断EOS过程中遇到的困难及面临的挑战进行总结,归纳EOS的早期与新型诊断方法并进行评估,进一步探讨有潜力的研究方向及策略,以期为临床早期诊断EOS并改善临床结局提供参考。

1 EOS诊断的挑战

普通实验室的非特异性检查结果预测价值不够高,且血培养可靠性较低,这些情况均增加了区分EOS高危婴儿的难度[6]。而EOS临床症状非常不典型,不易与其他感染性疾病区分,导致其评估和治疗受到影响。例如,在极低出生体质量儿中,呼吸暂停、呼吸窘迫和低血压的发生率是EOS患儿的10~100倍[7]。新生儿的短暂呼吸急促症状类似于EOS,其发生率却比EOS高约200倍(每1 000例活产60例*vs.* 每1 000例活产0.3例)[8]。几乎所有不超过30周的婴儿都易发呼吸窘迫综合征,但其在临床和影像学上与EOS的肺部表现难以区分[9]。即使逐步认识到EOS诊断和治疗的紧迫性,在许多具有非感染性表现的婴儿中确诊EOS仍极具挑战性。

血培养是诊断EOS的金标准[10],但应在开始抗生素治疗前获得相应培养物。获得正确的血培养物有助于提高EOS的诊断敏感度,但这些培养物需要孵育数小时至数天才能进行检测[11]。临床实验室中血培养物需要2~5 d才能产生阳性结果[12],但产妇在分娩前使

[基金项目] 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2020110)

[通信作者] 郑淮武,E-mail:zhenghuaiwu2005@163.com

用抗生素会导致血培养敏感度降低,这与产妇分娩期预防性使用抗生素相矛盾。然而,抗生素在体内残留会对婴儿产生影响,即使停用抗生素24 h,婴儿体内也仍然残留一定的氨基糖苷类和/或β-内酰胺类或万古霉素[13]。此外,一些抗生素会产生副作用,导致粒细胞缺乏,并发院内感染败血症[14]。抗生素在体内的残留会引起婴儿严重的稳态失调并可持续数月,甚至导致对感染和自身免疫性疾病的易感性增加[15-16]。

以上诊断的局限性激发了学者们对开发快速、准确诊断EOS的生物标志物的兴趣。理想的EOS生物标志物,应具有较高的敏感度和特异度,从而避免生物标志物假阴性结果,延误新生儿抗生素的使用。

2 EOS的诊断方法——新分子诊断

由于血培养和其他常见生物标志物的缺点,目前主要探讨用于诊断和鉴定有EOS风险的新生儿的新分子方法。通过对新分子诊断技术的评估,包括评估其敏感度、特异度和诊断准确性,以便能够早期发现EOS。

2.1 PCR技术

分子诊断技术,特别是PCR和各种核酸扩增方法,在诊断EOS方面具有潜在优势[17]。与传统血培养相比,PCR技术即使在低负荷下,仅需少量细菌或真菌的DNA或RNA即可进行病原体检测,同时可以鉴定多种病原体并识别不易培养的物种,快速得出结果。但该技术同样面临挑战,其相比传统的培养方法存在一些缺点,例如:样品易受污染、成本高以及需要专门的实验室和人员等。定量或实时PCR可以检测到所选PCR小组预先确定的有限数量的微生物靶标,但不能识别其他病原体[18]。另外,定量PCR只能鉴定出样本中的靶向耐药基因。

16S核糖体RNA存在于所有细菌中,其是生物体是否被归类为细菌的决定性因素[19-20]。根据16S核糖体基因的高保守性和稳定性,再利用基因特异性特征,16S核糖体RNA可以准确定位特定细菌[21-22]。在PCR技术中使用16S和23S核糖体RNA位点之间的区域,为培养技术提供了一种经济、高效且快速的替代方案[23]。但在一项研究中,该技术的检测结果并不理想,229例新生儿(其中包括40例极低出生体质量儿和159例早产儿)的样本通过PCR技术检测靶向细菌16S-23S核糖体和真菌18S-5.6S核糖体RNA之间的序列显示出较高的敏感度,但也产生了较多的假阳性结果,因而该研究并未推荐使用PCR技术诊断EOS,并且认为分子PCR技术未能提高EOS诊断的准确性[24]。

此外,还可以对给定样品中的整个DNA和/或RNA进行测序。通过排除人类DNA或RNA检查其余序列以识别细菌、病毒、真菌和寄生虫[25]。总DNA和RNA的广泛测序能够检测所有潜在病原体,然而该技术的缺点也尤为明显,如在样品制备过程中易出现偏差、测序深度有一定限制以及缺乏用于序列分析的标准化软件工具或流程等[26-27]。

总之,目前的各种新型PCR技术通过鉴定微生物来诊断EOS。这些新技术虽然具有许多优点,但并不能替代血培养。

2.2 EOS中miRNA水平

miRNA通过抑制靶标mRNA的翻译或转录来调节基因表达,具有易于在小样本中分析和高稳定性的优点[28-30]。许多研究探索了miRNA作为EOS诊断生物标志物的潜力,Zhao等[31]发现,miR-15a-5p和miR-16-5p在EOS中具有中等诊断价值;Fouda等[32]的一项研究强调了miR-15b和miR-378a具有鉴别EOS的潜力,其诊断的敏感度和特异度较高。一项研究显示,miR-16a在EOS新生儿(日龄1~11 d)中的水平明显高于健康新生儿,且miR-16a诊断EOS的敏感度和特异度优于miRNA-451[33]。此外,在外周血单个核细胞中较低的miR-26a基线水平与较高的EOS风险相关,miR-26a水平还与白细胞计数和C反应蛋白水平存在一定线性关系;在血培养阳性的败血症新生儿中,EOS新生儿出生72 h内miR-26a的表达明显低于出生72 h后,提示较低的基线miR-26a水平可预测EOS的发生[34]。miR-223和miR-132参与炎症反应的负调控并在EOS中下调[35]。此外,一项回顾性病例对照研究发现,miR-211-5p和miR-223-5p在EOS中过表达,显示出良好的鉴别潜力[36]。一项纳入70例EOS新生儿的研究显示,miR-1和miR-124表达升高,而miR-34a表达降低;新生儿败血症的诊断试验中,miR-34a具有最高的特异度(97%);在多变量模型中发现,miR-1和miR-124是疾病进展或新生儿病死的重要预测因子[37]。此外,miR-23b水平在EOS中至关重要,与病死率呈负相关,提示miR-23b既可以作为诊断标志物,也可以作为监测EOS进展的工具[38]。

总体来说,结合特异性miRNA能够提高EOS的诊断价值。但许多研究是单中心研究,且纳入的患者数相对较少,还需进行更大规模的多中心研究,招募更多患者来进一步验证miRNA在新生儿败血症中的诊断效果。

2.3 T2磁共振技术

T2磁共振技术是指直接从全血样本中快速检测病原体,而无需血培养。这是一种直接的分子检测技术,利用磁共振技术来识别血液中病原体的存在。一

项队列研究显示,T2磁共振技术鉴定速度快、时间短,优于血培养,在敏感度和特异度方面与血培养相当[39]。目前T2磁共振技术在新生儿EOS诊断中得到了令人满意的结果,但这些结果还需要通过更大规模的研究来验证其可靠性。

2.4 生物信息学分析

生物信息学分析通过检查与基因表达相关的数据集,在揭示新生儿EOS的潜在机制方面发挥着至关重要的作用。通过对已发表的转录数据进行生物信息学分析,从免疫细胞浸润结合*Logistic*回归的角度,确定了NSUN7、PROS1、TDRD9、RETN、LOC728401和METTL7B为新生儿败血症的潜在生物标志物[40]。更重要的是,生物信息学分析能够建立诊断模型,为未来新生儿败血症发病机制的研究提供了新的策略[41]。Bai等[42]的研究通过对公开数据集的转录组学进行分析发现,CST7、CD3G、CD247和ANKRD22这4个基因被确定为能够准确地预测新生儿EOS的诊断指标。

虽然上述方法不足以取代血培养,但可以作为诊断EOS的有效辅助手段。这些新分子诊断技术应用到EOS的诊断中,再结合临床判断和常规实验室参数,可作为辅助诊断手段以弥补血培养的不足,帮助临床决策。

2.5 全基因组测序

全基因组测序能够得到更多的信息,有望成为EOS的临床诊断新方法[43]。但该技术成本较高且需要技术优化,在分析复杂测序数据时还需大量生物信息学和统计学专业知识,不利于推广应用。

3 总结与展望

败血症是严重的细菌或真菌感染性疾病,患儿所处地域不同,则流行病学情况各异,耐药谱也存在一定的差异[44]。在临床中,排查客观的患病因素和密切观察婴儿情况是预防新生儿败血症最有效的策略。新生儿败血症计算器能够帮助指导足月和晚期早产儿进行客观风险的评估[45]。此外,将血液添加到培养瓶中以优化体积的方法可提高血培养检测的敏感度及生物标志物检测结果的准确性[46]。

在临床和基础研究中继续寻找有价值的生物标志物十分必要,这需要在新生儿发病前开展一系列转化研究,以确定具有早期预测动力学的生物标志物,如临床疾病之前的某些异常数据伴随败血症达到峰值,并随着疾病消退而降低。另外,可以开展微生物组监测、质谱法等新的检测方法以寻找新的生物标志物靶标。

综上,对于EOS的诊断最核心的是进行快速、敏感的检测。目前虽已有诸多非特异性检查手段辅助EOS诊断,但还需要继续进一步的研究,找到具有高敏感度、特异度的标志物和方法以便快速诊断。抗生素的合理应用尤其需要重视,应尽可能避免新生儿抗生素使用不当。

[参考文献]

[1] Shane AI, Sanchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis[J]. Lancet, 2017, 390(10104): 1770-1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.

[2] Polin RA, Committee on Fetus and Newborn. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis[J]. Pediatrics, 2012, 129(5): 1006-1015. doi: 10.1542/peds.2012-0541.

[3] Edmond K, Zaidi A. New approaches to preventing, diagnosing, and treating neonatal sepsis[J]. PLoS Med, 2010, 7(3): e1000213. doi: 10.1371/journal.pmed.1000213.

[4] Celik IH, Hanna M, Canpolat FE, et al. Diagnosis of neonatal sepsis: the past, present and future[J]. Pediatr Res, 2022, 91(2): 337-350. doi: 10.1038/s41390-021-01696-z.

[5] 中华医学会儿科学分会新生儿学组,中国医师协会新生儿科医师分会感染专业委员会. 新生儿败血症诊断及治疗专家共识(2019年版)[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(4): 252-257. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2019.04.005.

[6] Puopolo KM, Benitz WE, Zaoutis TE, et al. Management of neonates born at ≤34 6/7 weeks' gestation with suspected or proven early-onset bacterial sepsis[J]. Pediatrics, 2018, 142(6): e20182896. doi: 10.1542/peds.2018-2896.

[7] Dempsey EM, Barrington KJ. Diagnostic criteria and therapeutic interventions for the hypotensive very low birth weight infant[J]. J Perinatol, 2006, 26(11): 677-681. doi: 10.1038/sj.jp.7211579.

[8] Weintraub AS, Cadet CT, Perez R, et al. Antibiotic use in newborns with transient tachypnea of the newborn[J]. Neonatology, 2013, 103(3): 235-240. doi: 10.1159/000346057.

[9] Leonidas JC, Hall RT, Beatty EC, et al. Radiographic findings in early onset neonatal group b streptococcal septicemia[J]. Pediatrics, 1977, 59 Suppl(6 Pt 2): 1006-1011. doi: 10.1148/124.3.771.

[10] Cantey JB, Patel SJ. Antimicrobial stewardship in the NICU[J]. Infect Dis Clin North Am, 2014, 28(2): 247-261. doi: 10.1016/j.idc.2014.01.005.

[11] Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(6): 513-520. doi: 10.1111/1469-0691.12180.

[12] Bromiker R, Elron E, Klinger G. Do neonatal infections require a positive blood culture?[J]. Am J Perinatol, 2020, 37(S02): S18-S21. doi: 10.1055/s-0040-1714079.

[13] Singer JR, Blosser EG, Zindl CL, et al. Preventing dysbiosis of the neonatal mouse intestinal microbiome protects against late-onset sepsis[J]. Nat Med, 2019, 25(11): 1772-1782. doi: 10.1038/s41591-019-0640-y.

[14] 陈富超,朱 军,李开俊. 药源性白细胞减少症和粒细胞缺乏(减少)症回顾性分析[J]. 中国药房, 2006, 17(19): 1495-1496. doi: 10.3969/j.issn.1001-0408.2006.19.022.

[15] Korang SK, Safi S, Nava C, et al. Antibiotic regimens for early-onset neonatal sepsis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 5(5): CD013837. doi: 10.1002/14651858.CD013837.pub2.

[16] Ng KM, Aranda-Díaz A, Tropini C, et al. Recovery of the gut microbiota after antibiotics depends on host diet, community context, and environmental reservoirs[J]. Cell Host Microbe, 2020, 28(4): 628. doi:10.1016/j.chom.2020.09.001.

[17] Venkatesh M, Flores A, Luna RA, et al. Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010, 8(9): 1037-1048. doi:10.1586/eri.10.89.

[18] Sinnar SA, Schiff SJ. The problem of microbial dark matter in neonatal sepsis[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(11): 2543-2548. doi: 10.3201/eid2611.200004.

[19] Rutanga JP, Van Puyvelde S, Heroes AS, et al. 16S metagenomics for diagnosis of bloodstream infections: opportunities and pitfalls[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(8): 749-759. doi: 10.1080/14737159.2018.1493606.

[20] Wang J, Zhang H, Yan J, et al. Literature review on the distribution characteristics and antimicrobial resistance of bacterial pathogens in neonatal sepsis[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2022, 35(5): 861-870. doi:10.1080/14767058.2020.1732342.

[21] Church DL, Cerutti L, Gürtler A, et al. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(4): e00053-19. doi:10.1128/CMR.00053-19.

[22] Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, et al. Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene[J]. J UOEH, 2016, 38(3): 223-232. doi: 10.7888/juoeh.38.223.

[23] Hassan RM, El Enany MG, Rizk HH. Evaluation of broad-range 16S rRNA PCR for the diagnosis of bloodstream infections: two years of experience[J]. J Infect Dev Ctries, 2014, 8(10): 1252-1258. doi: 10.3855/jidc.4867.

[24] Stein A, Soukup D, Rath PM, et al. Diagnostic accuracy of multiplex polymerase chain reaction in early onset neonatal sepsis[J]. Children, 2023, 10(11): 1809. doi:10.3390/children10111809.

[25] Lefterova MI, Suarez CJ, Banaei N, et al. Next-generation sequencing for infectious disease diagnosis and management: a report of the association for molecular pathology[J]. J Mol Diagn, 2015, 17(6): 623-634. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.08.005.

[26] Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 257-271. doi:10.1038/nrg.2016.10.

[27] Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, et al. Erratum to: a survey of best practices for RNA-seq data analysis[J]. Genome Biol, 2016, 17(1): 181. doi:10.1186/s13059-016-1010-3.

[28] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105. doi:10.1101/gr.082701.108.

[29] García-Giménez JL, Seco-Cervera M, Tollefsbol TO, et al. Epigenetic biomarkers: current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2017, 54(7/8): 529-550. doi:10.1080/10408363.2017.1344915.

[30] García-Giménez JL, Mena-Mollá S, Beltrán-García J, et al. Challenges in the analysis of epigenetic biomarkers inclinical samples[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(10): 1474-1477. doi: 10.1515/cclm-2016-1387.

[31] Zhao Y, Lu C, Zhu R, et al. Study on identification of a three-microRNA panel in serum for diagnosing neonatal early onset sepsis[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2023, 36(2): 2280527. doi: 10.1080/14767058.2023.2280527.

[32] Fouda E, Elrazek Midan DA, Ellaban R, et al. The diagnostic and prognostic role of MiRNA 15b and MiRNA 378a in neonatal sepsis[J]. Biochem Biophys Rep, 2021, 26: 100988. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100988.

[33] El-Hefnawy SM, Mostafa RG, El Zayat RS, et al. Biochemical andmolecular study on serum miRNA-16a and miRNA-451 as neonatal sepsis biomarkers[J]. Biochem Biophys Rep, 2021, 25: 100915. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100915.

[34] Zhao Z, Zhang J. Lower expression of miR-26a in PBMCs indicates the occurrence of early-onset neonatal sepsis and is partly mediated by the upregulation of PTEN[J]. Front Pediatr, 2021, 9: 678205. doi: 10.3389/fped.2021.678205.

[35] Dhas BB, Dirisala VR, Bhat BV. Expression levels of candidate circulating microRNAs in early-onset neonatal sepsis compared with healthy newborns[J]. Genom Insights, 2018, 11: 117863 1018797079. doi:10.1177/1178631018797079.

[36] Ernst LM, Mithal LB, Mestan K, et al. Umbilical cord miRNAs to predict neonatal early onset sepsis[J]. PLoS One, 2021, 16(5): e0249548. doi:10.1371/journal.pone.0249548.

[37] El-Khazragy N, Mohamed NM, Mostafa MF, et al. miRNAs: novel noninvasive biomarkers as diagnostic and prognostic tools in neonatal sepsis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2023, 107(3): 116053. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.116053.

[38] Fatmi A, Rebiahi SA, Chabni N, et al. miRNA-23b as a biomarker of culture-positive neonatal sepsis[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 94. doi: 10.2119/molmed.2020.00094.

[39] Lucignano B, Cento V, Agosta M, et al. Effective rapid diagnosis of bacterial and fungal bloodstream infections by T2 magnetic resonance technology in the pediatric population[J]. J Clin Microbiol, 2022, 60(10): e0029222. doi:10.1128/jcm.00292-22.

[40] Liao W, Xiao H, He J, et al. Identification and verification of feature biomarkers associated with immune cells in neonatal sepsis[J]. Eur J Med Res, 2023, 28(1): 105. doi:10.1186/s40001-023-01061-2.

[41] Yan R, Zhou T. Identification of key biomarkers in neonatal sepsis by integrated bioinformatics analysis and clinical validation[J]. Heliyon, 2022, 8(11): 11634. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11634.

[42] Bai Y, Zhao N, Zhang Z, et al. Identification and validation of a novel four-gene diagnostic model for neonatal early-onset sepsis with bacterial infection[J]. Eur J Pediatr, 2023, 182(3): 977-985. doi: 10.1007/s00431-022-04753-9.

[43] Srinivasan L, Page G, Kirpalani H, et al. Genome-wide association study of sepsis in extremely premature infants[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2017, 102(5): F439-F445. doi:10.1136/archdischild-2016-311545.

[44] 陆文香,徐卫东,吴培南. 161例败血症患者血液中病原菌分布及耐药性调查[J]. 江苏大学学报(医学版),2007,17(1):71-73. doi: 10.13312/j.issn.1671-7783.2007.01.020.

[45] Riskin A, Bryskin S, Zaitoon H, et al. Evaluation of implementation of early-onset sepsis calculator in newborns in Israel[J]. Pediatr, 2021, 234(7): 71-76. doi:10.1016/j.jpeds.2021.04.007.

[46] Cantey JB, Lee JH. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis[J]. Clin Perinatol, 2021, 48(2): 215-227. doi: 10.1016/j.clp.2021.03.012.

(编辑:杨 颖)