

新生儿败血症的实验室诊断技术研究进展

钟一鸣 综述, 刘文恩 审校(中南大学湘雅医院检验科, 长沙 410008)

【关键词】 新生儿; 败血症; 实验室诊断技术

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 18. 068 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)18-2471-03

新生儿败血症是新生儿期细菌侵入血液循环并在其中繁殖, 产生毒素而引起的全身性感染, 是新生儿期常见的危重症。新生儿败血症休克是导致新生儿死亡的主要原因之一, 及时的诊断和早期治疗是减少并发症、降低病死率的关键。但新生儿败血症发病隐匿, 临床症状无特异性, 在临床上早期诊断败血症, 合理有效的应用抗生素非常重要, 近年来国内外学者做了大量工作, 现仅就近年来的一些诊断新生儿败血症的实验室诊断技术报道如下。

1 血培养

血培养是新生儿败血症诊断的“金标准”, 但一般要 48~72 h 后才能得到检测结果, 并且有可能出现假阳性或假阴性结果。据国外报道, 临床上诊断为新生儿败血症的患儿, 其血培养阳性者只占 8%~73%^[1], 国内曹三成等^[2]报道新生儿败血症血培养的阳性率为 60.2%, 许多新生儿血培养阴性或找不到感染灶, 难以明确血行感染是否存在。提高检测阳性率的措施有: 在未用抗生素前严格无菌采血进行血培养, 怀疑有厌氧菌感染者需同时进行厌氧菌培养, 如果长期用青霉素类和头孢类药物者应同时进行 L 型细菌培养。如果抽血量过少可导致假阴性, 当抽血量少于 0.5 mL 时, 就有可能出现假阴性^[3], 为了尽量减少败血症诊断中血培养出现的假阴性, 取血量至少为 0.5 mL。皮肤污染有可能导致假阳性, 因此国外一般采取多个部位取血^[4], 同时也可以减少由于血液中细菌密度低或细菌间歇性出现而出现的假阴性^[5]。血培养阳性率较低, 并且耗时较长, 使得临床治疗常错过最佳的时机, 在新生儿败血症早期诊断中难以发挥明显作用。

2 血液标志物检查

2.1 血象变化 白细胞(WBC)减少($WBC < 5 \times 10^9/L$), 或增多(≤ 3 d 者, $WBC > 25 \times 10^9/L$; > 3 d 者, $WBC > 20 \times 10^9/L$); 杆状核细胞/中性粒细胞(I/T)大于或等于 0.16, 血小板小于或等于 $100 \times 10^9/L$ 均提示可能存在败血症^[6], Hornik 等^[7]研究认为这些指标在诊断新生儿败血症中的特异性(73.7%~99.0%)较高, 但是敏感度较低(0.3%~54.5%)。WBC 计数升高也可能出现在其他病理状态, 对早期诊断新生儿败血症缺乏敏感性和特异性。有研究表明, 当 I/T > 0.2 时, 其敏感性可达 90%, 阴性预测值达 98%^[8], 并且与其他血常规指标相比, I/T 受非感染因素的影响更少。

2.2 降钙素原(PCT) PCT 是一种无激素活性的降钙素前体, 正常生理状态下只由甲状腺 C 细胞合成, 在血浆内含量很少。研究表明, PCT 在细菌感染患者体内急剧增高^[9]。细菌感染后 4 h PCT 在血浆中开始升高, 6~8 h 达高峰, 并在以后的 24 h 持续保持高水平。李淑丽等^[9]对 55 例新生儿败血症患儿及 40 例非败血症新生儿在入院未接受抗生素治疗前及恢复期采血, 结果显示败血症急性期 PCT 水平明显升高, 达到 $(15.6 \pm 7.1) \mu g/L$, 与对照组 $(0.8 \pm 0.4) \mu g/L$ 比较差异有统

计学意义($P < 0.01$), 在合理治疗后(恢复期)显著下降($P < 0.01$)。Naher 等^[10]认为 PCT 是比 C-反应蛋白(CRP)等更加敏感和特异的诊断指标。但有研究认为, 在新生儿出生后 2 d 内 PCT 有一生理性高峰期^[11], 从出生后第 3 天起, 其正常参考值同成年人, 因此 PCT 对于早发型新生儿败血症的诊断价值还存在一定争议。

2.3 C-反应蛋白(CRP) CRP 是机体处于应激状态时由肝脏大量合成的急性时相蛋白之一, 生理状态下含量甚微, 在炎症或急性组织损伤后, CRP 的合成则在 4~6 h 内迅速增加, 36~50 h 达高峰, 经积极合理治疗后, 3~7 d 降至正常, Ali 等^[12]研究认为 CRP 诊断新生儿败血症敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 88.0%、77.8%、77.1%、70.0%, 准确性不如 PCT。CRP 增高还常见于围生期窘迫、脑室内出血、胎粪吸入综合征等非感染性疾病, 它可作为一项非特异性的细菌感染指标。

2.4 IaIp IaIp 是一组典型的蛋白糖胺多糖共价复合物, 与丝氨酸蛋白酶抑制剂结构相似, 主要在肝脏合成, 在人血浆内浓度相对较高, 约 $400 \mu g/mL$, 相对分子质量约 240×10^3 。有研究认为 IaIp 在新生儿败血症时明显降低^[13], 抗生素治疗 4~12 h 后逐渐增高。血培养阳性败血症组 IaIp 明显低于血培养阴性组, 当临界值定为 177 mg/L 时, IaIp 诊断新生儿败血症的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 89.5%、99.0%、95.0%、98.0%。以上研究提示, IaIp 可协助决定是否开始抗生素治疗, 同时可作为监测治疗疗程和判断预后的指标。

3 细胞因子和受体

3.1 白细胞介素-6(IL-6) IL-6 为机体对炎症早期反应的重要细胞因子, 炎症发生时, 宿主的 T 细胞、B 细胞及单核-巨噬细胞等都能够分泌。Labelle 等^[14]研究表明新生儿败血症发生 1~2 h 后, 血清 IL-6 含量即开始增加, 可在感染发生后的数小时到达高峰, IL-6 作为早期辅助诊断新生儿感染的指标, 其血清含量的增加和疾病的发展程度有关。与 CRP 相比, IL-6 是非常早的标志物, 但当感染仍旧存在时, 其水平也降至正常, 这有可能导致假阴性, 而由于 CRP 上升时间较晚, 二者联用可提高诊断新生儿败血症的敏感度。

3.2 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) TNF- α 最初由单核细胞和活化 T 细胞分泌, 是介导炎症反应最重要的促炎因子。Kumar 和 Rizvi^[15]研究发现, 败血症休克患儿 TNF- α 水平高于健康组或败血症组无休克患儿, 提示 TNF- α 水平与疾病严重程度正相关。但感染时 TNF- α 高峰期时间短, 并很快下降至正常。与之相比, IL-6 持续升高的时间较长, 因此新生儿败血症时 IL-6 阳性率比 TNF- α 高。虽然 IL-6 持续升高的时间较 TNF- α 长, 但其半衰期也相对较短, 并且 IL-6 的半衰期不受感染持续时间的影响。因此如果抽血较晚就会出现阴性结果。

3.3 血清可溶性细胞间黏附分子 I(sICAM-1) ICAM-1 是免疫球蛋白家族成员之一,它存在于内皮细胞和单核细胞膜内,起 CD11/CD18 黏附受体的作用,介导白细胞黏附于内皮细胞。赵小飞等^[16] 研究结果显示,新生儿败血症时血清 sICAM-1 水平较非感染组明显升高,并且与新生儿危重评分呈高度负相关,说明 sICAM-1 可用于新生儿败血症的早期诊断,且 sICAM-1 水平越高,新生儿败血症的病情越重。Veleminský 等^[17] 研究发现,sICAM-1 诊断新生儿败血症的敏感度为 83%,特异度为 95%,均高于 IL-6 和 TNF- α ,说明 sICAM-1 对新生儿败血症的早期诊断价值较高。

3.4 CD64 CD64 是免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段受体,属于免疫球蛋白超家族成员。当机体受到细菌刺激时,可使 CD64 在中性粒细胞表面大量表达。郝玲等^[18] 研究结果显示,新生儿败血症患儿 CD64 表达明显高于健康儿($P < 0.01$),说明 CD64 表达水平与新生儿败血症密切相关,并随着感染加重,CD64 表达相应增加;CD64 在败血症组恢复期较急性期下降,说明 CD64 可用于观察疗效。Choo 等^[19] 研究显示,CD64 诊断新生儿败血症的敏感度和特异度均高于 CRP,受试者工作曲线(ROC 曲线)下面积也明显高于 CRP。因此,CD64 在新生儿败血症的早期诊断、病情判断和预后评估等方面均有较高的临床价值。

4 分子生物学技术

4.1 聚合酶链反应(PCR) 近年来,国内外学者应用 PCR 技术进行细菌分类、鉴定,试图为新生儿败血症的早期诊断提供一种新手段。16S rDNA 是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 序列,16S rDNA 比整个细菌基因组进化得要缓慢且保守,因而具有高度的保守性,素有“细菌化石”之称。病毒属于非细胞性微生物,遗传上与细菌、真核生物无关,不含 16S rRNA。目前已完成了几乎所有病原菌的 16S rRNA 基因测序,因此通常选择 16S rRNA 作为细菌 PCR 扩增的目标序列。

Dutta 等^[20] 使用引物 16S rRNA PCR 作为败血症诊断指标,其在抗生素治疗前与血培养结果相比,敏感度、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 96.2%,96.3%,87.7%,98.8%。Wu 等^[21] 研究显示,16S rDNA 基因荧光定量 PCR 检测新生儿败血症的阳性率高于血培养阳性率,荧光定量 PCR 诊断新生儿败血症的灵敏度和特异度分别为 100% 和 97.2%,正确诊断指数可达 0.972。

只要有细菌存在,而不管其是否存活,均可通过检测 16S rRNA 来检出细菌,而不受抗生素治疗的影响,且不需体外培养,标本用量更少,为新生儿败血症的早期诊断提供新方法。

以 PCR 为基础的细菌检测系统容易被污染干扰。PCR 退火的 DNA 高度系列保守区合并 PCR 巨大的扩增力量导致细微细菌污染物的扩增,产生假阳性。16S rRNA PCR 的反应可被试剂污染,Heininger 等^[22] 发现,将 16S rRNA 基因 PCR 试剂进行 Dnase I 预处理可以降低假阳性。但是到目前为止,仍然没有较好的克服 16S rDNA 检测的污染问题。随着对 16S rRNA 的基础理论和临床研究的不断深入,其在临床病原菌的分子生物学诊断方面一定会有更为广阔的应用前景,目前面临的 16S rRNA 的防污染等难题也将会迎刃而解。

4.2 蛋白质组学 随着人类基因组计划的完成,蛋白质组学的研究日益受到重视。蛋白质组学作为后基因时代出现的新兴研究领域,主要是对一个基因组、一个细胞或组织的蛋白质性质的研究,是一种新的生物学技术,能对细胞和组织内的蛋

白质进行大规模而且精确的鉴定^[23]。与研究 DNA 的基因组学相比,它的临床症状更显著,更容易转换为诊断和治疗工具。蛋白质组技术的出现使人们对大批量的临床标本进行高效的蛋白质组研究,寻求用于早期临床诊断的特异敏感的生物标志物成为可能^[24]。

有研究表明使用蛋白质组学作为一种新的生物标志物可以预测、早期诊断与治疗新生儿败血症^[25]。早发型新生儿败血症与产妇胎膜早破,羊水混浊或发臭,绒毛膜羊膜炎等因素有关,为了分析羊水中相关蛋白的蛋白质组学,Buhimschi 和 Buhimschi^[26] 采用表面增强激光解吸-电离飞行时间(SELDI-TOF)输出技术提取蛋白质生物标志物用以判断羊膜腔内炎症,并将这种方法得到的结果称为质量限制(MR)得分,MR 得分可以预测以下 4 种诊断标志物:中性粒细胞防御素 2、中性粒细胞防御素 1、S100A12、S100A8。该研究发现,MR 得分为 3~4 分时,诊断羊膜腔内炎症的准确性为 92.6%,显著高于 WBC 和 IL-6,并且发展为新生儿败血症的概率增加。在所有 MR 得分的诊断标志物中,S100A8 最能预测早期新生儿败血症。羊水中蛋白质可紧密的反映胎儿的炎症反应,通过 SELDI-TOF 技术判断羊膜腔内炎症,为新生儿败血症的早期诊断开辟了一个新领域,但目前该方法仅处于研究阶段,诊断价值有待进一步探究。

5 遗传多态性

近年来,国外有学者试图研究新生儿败血症的遗传多态性,从遗传易感性方面来评估败血症,探索免疫系统中免疫功能的调节,特别是与全身性炎症反应有关的基因。Schueller 等^[27] 对 TNF 2 个多态性进行了研究,没有发现这些多态性会影响早产儿早发性败血症的发病率。有研究显示,IL-6(-174C)多态性与败血症之间不存在显著的相关性^[28]。但 Del Vecchio 等^[29] 研究早产儿迟发型败血症组和未感染对照组的 TNF- α 和 IL-10 的基因多态性显示,败血症组 308G-TNF- α 和 1082-IL-10 基因多态性与对照组比较,在纯合子和杂合子形式表达更高,差异有统计学意义。但该学者认为必须要有更多的数据才能肯定这一发现。也有学者发现 IL-6-174CC 和 IL-10-1082GG 基因多态性在纯合子中与死亡风险增加显著相关^[30]。

总体上,这些初步的研究往往探究涉及抗感染的免疫防御的标志物的遗传变异和单核苷酸多态性与败血症的发病的关系及可能造成的结果。但是目前的数据还不足以说明这些标志物的遗传多态性对发展成为败血症的风险有影响。

6 展 望

新生儿败血症是导致新生儿期常见危重症以及死亡的主要原因之一。血培养是诊断败血症的金标准,目前实验室对于感染性疾病的检测开展了 PCT、CRP 及血常规等项目联合评估,但对新生儿败血症的诊断依旧存在缺陷。随着基因组学、蛋白质组学、遗传学的发展,目前利用 PCR 技术对细菌进行鉴定,检测羊水中与新生儿败血症有关蛋白的表达以及检测与新生儿败血症的发生相关的基因成为当前的研究热点,目前这些方法尚不成熟,缺乏足够的理论依据,相信随着研究的不断深入,这些检测会对新生儿败血症的早期诊断提供新的依据。

参考文献

- [1] Mishra UK, Jacobs SE, Doyle LW, et al. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2006, 91(3): F208-

- F212.
- [2] 曹三成,祝颢英,贾凯,等. 降钙素原(PCT),hs-CRP 及血培养在新生儿败血症诊断中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(3):82-83.
- [3] Ng PC, Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis[J]. Curr Opin Pediatr,2006,18(2):125-131.
- [4] Tarai B, Das P, Kumar D, et al. Comparative evaluation of paired blood culture (aerobic/aerobic) and single blood culture, along with clinical importance in catheter versus peripheral line at a tertiary care hospital[J]. Indian J Med Microbiol,2012,30(2):187-192.
- [5] Connell TG, Rele M, Cowley D, et al. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital[J]. Pediatrics,2007,119(5):891-896.
- [6] 中华医学会儿科学分会新生儿学组,中华医学会儿科杂志编辑委员会. 新生儿败血症诊疗方案[J]. 中华儿科杂志,2003,41(12):897-899.
- [7] Hornik CP, Benjamin DK, Becker KC, et al. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis[J]. Pediatr Infect Dis J,2012,31(8):799-802.
- [8] Chirico G, Loda C. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate[J]. Pediatr Rep,2011,3(1):1.
- [9] 李淑丽,王北海,孙和才. 降钙素原检测对新生儿败血症早期诊断治疗及病情评估的临床意义[J]. 中国医药导报,2011,8(11):26-27,68.
- [10] Naher BS, Mannan MA, Noor K, et al. Role of serum procalcitonin and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis[J]. Bangladesh Med Res Counc Bull,2011,37(2):40-46.
- [11] Assumma M, Signore F, Pacifico L, et al. Serum procalcitonin concentrations in term delivering mothers and their healthy offspring: a longitudinal study[J]. Clin Chem,2000,46(10):1583-1587.
- [12] Ali AM, Moaz MA, Ghoniem E, et al. Reliability of serum procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in neonates[J]. Egypt J Immunol,2008,15(1):75-84.
- [13] Chaaban H, Singh K, Huang J, et al. The role of inter-alpha inhibitor proteins in the diagnosis of neonatal sepsis[J]. J Pediatr,2009,154(4):620-622.
- [14] Labelle AL, Hamor RE, Townsend WM, et al. Ophthalmic lesions in neonatal foals evaluated for nonophthalmic disease at referral hospitals[J]. J Am Vet Med Assoc,2011,239(4):486-492.
- [15] Kumar S, Rizvi M. Prognostic serum tumor necrosis factor-alpha in paediatric patients with sepsis[J]. J Infect Dev Ctries,2009,3(6):437-441.
- [16] 赵小飞,钟景红,黄晓菱. 新生儿败血症血清降钙素原和可溶性细胞间黏附分子-1 的变化[J]. 广东医学院学报,2011,29(1):27-28,32.
- [17] Velemínský M Jr, Stránský P, Velemínský M Sr, et al. Relationship of IL-6, IL-8, TNF and sICAM-1 levels to PROM, pPROM, and the risk of early-onset neonatal sepsis[J]. Neuro Endocrinol Lett,2008,29(3):303-311.
- [18] 郝玲,任常军,王炳辉,等. CD64、降钙素原在新生儿败血症诊断中的价值[J]. 临床儿科杂志,2011,29(3):216-218.
- [19] Choo YK, Cho HS, Seo IB, et al. Comparison of the accuracy of neutrophil CD64 and C-reactive protein as a single test for the early detection of neonatal sepsis[J]. Korean J Pediatr,2012,55(1):11-17.
- [20] Dutta S, Narang A, Chakraborty A, et al. Diagnosis of neonatal sepsis using Universal primer polymerase chain reaction before and after starting antibiotic drug therapy[J]. Arch Pediatr Adolesc Med,2009,163(1):6-11.
- [21] Wu YD, Shang SQ, Li JP, et al. A broad-range 16S rRNA gene real-time PCR assay for the diagnosis of neonatal septicemia[J]. Zhong hua Er Ke Za Zhi,2007,45(6):446-449.
- [22] Heininger A, Binder M, Ellinger A, et al. DNase pretreatment of master mix reagents improves the validity of Universal 16S rRNA gene PCR results[J]. J Clin Microbiol,2003,41(4):1763-1765.
- [23] Mamlmstrom J, Lee H, Aebersold R. Advances in proteomic work flows for systems biology[J]. Curr Opin Biotechnol,2007,18(4):378-384.
- [24] Conrade TP, Zhou M, Petricoin EF 3rd, et al. Cancer diagnosis using proteomic patterns[J]. Expert Rev Mol Diagn,2003,3(4):411-420.
- [25] Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond[J]. Clin Perinatol,2010,37(3):599-610.
- [26] Buhimschi IA, Buhimschi CS. The role of proteomics in the diagnosis of chorioamnionitis and early-onset neonatal sepsis[J]. Clin Perinatol,2010,37(2):355-374.
- [27] Schueller AC, Heep A, Kattner E, et al. Prevalence of two tumor necrosis factor gene polymorphisms in premature infants with early onset sepsis[J]. Biol Neonate,2006,90(4):229-232.
- [28] Chauhan M, McGuire W. Interleukin-6 (-174C) polymorphism and the risk of sepsis in very low birth weight infants: meta-analysis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed,2008,93(6):427-429.
- [29] Del Vecchio A, Laforgia N, Capasso M, et al. The role of molecular genetics in the pathogenesis and diagnosis of neonatal sepsis[J]. Clin Perinatol,2004,31(1):53-67.
- [30] Abdel-Hady H, El-Naggar M, El-Nady G, et al. Genetic polymorphisms of IL-6-174 and IL-10-1082 in neonatal blood stream infections[J]. JPID,2009,4(2):357-365.