

多通道分子信标聚合酶链反应在新生儿侵袭性念珠菌感染快速诊断中的应用

张雨¹ 曾慧慧¹ 温春玲¹ 蔡晓沂² 赵娜² 李兴旺³

【摘要】目的 初步建立新生儿侵袭性真菌感染（IFI）常见念珠菌的多通道分子信标荧光聚合酶链反应（MQ-PCR）检测体系，实现新生儿IFI病原体的早期检出，并探讨患儿不同部位念珠菌检出率的差异。**方法** 收集2018年1月至2019年4月首都医科大学附属北京妇产医院收治的34例临床诊断为脓毒败血症并疑似IFI新生儿的血液、深部痰液和咽拭子标本；常规行血培养及微生物鉴定，并应用MQ-PCR体系对3类标本进行念珠菌检测，比较两种方法念珠菌阳性检出率和检测时长。**结果** 本研究MQ-PCR体系检测白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌和热带念珠菌的检出下限均为50 FU/ml，线性检测范围为 $5 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ CFU/ml，且MQ-PCR体系所检出细菌与其他14种常见致病性细菌或DNA序列同源性较高的真菌无交叉反应。9例（9/34、26.5%）患儿经血培养念珠菌阳性确定为IFI；此9例IFI患儿同一血液样本、自身不同部位（深部痰液、咽拭子）样本行MQ-PCR均检出念珠菌阳性，且检出菌种与血培养完全一致。比较血标本两种方法念珠菌阳性检出率：血培养法为26.5%（9/34），MQ-PCR为32.4%（11/34），差异无统计学意义（ $\chi^2 = 0.5$ 、 $P = 0.5$ ）。血培养法念珠菌阳性检出率（26.5%）和相应的自身不同部位标本MQ-PCR法念珠菌阳性检出率差异均无统计学意义（ P 均 > 0.05 ），其中咽拭子、深部痰液和血标本中念珠菌阳性检出率分别为41.2%（14/34）、32.4%（11/34）和32.4%（11/34）。MQ-PCR检测血液、深部痰液和咽拭子标本时长分别为3.5（3.2，3.9）h、3.1（2.9，3.2）h和2.7（2.5，2.9）h，较血培养时长[94.0（78，105.8）h]显著缩短，差异均有统计学意义（ $Z = -2.7$ 、 $P = 0.008$ ， $Z = -2.5$ 、 $P = 0.013$ ， $Z = -2.7$ 、 $P = 0.008$ ）。**结论** 对IFI新生儿多部位标本应用MQ-PCR检测念珠菌，较血培养具备高符合率及快速检出的优点，利于新生儿念珠菌定植及血流感染的早期诊断及动态监测。

【关键词】 新生儿；侵袭性念珠菌感染；多通道分子信标PCR；早期预警

Application of multi-channel molecular beacon polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal invasive *Candida* infection Zhang Yu¹, Zeng Huihui¹, Wen Chunling¹, Cai Xiaoyi², Zhao Na², Li Xingwang³.

¹Neonatal Department, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China; ²Beijing Taipu-Shunkang Institute for Laboratory Medicine, Beijing 100076, China; ³The National Clinical Key Department of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: Zeng Huihui, Email: bjfcyyzh@163.com

【Abstract】Objective To preliminarily establish a multi-channel molecular beacon polymerase chain reaction (MQ-PCR) method for early detection of common *Candida* pathogens associated with invasive fungal infections (IFI) in newborns, and to explore the differences of *Candidas* detection in different parts of neonates with IFI. **Methods** Throat swabs, deep sputum and blood samples from 34 neonates suspected of invasive fungal infection in Neonatal Intensive Care Unit (NICU), Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, from January 2018 to April 2019 were collected. Blood culture and strain identification were performed routinely, and *Candidas* were also detected by MQ-PCR system in three

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2019.05.007

基金项目：首都医科大学附属北京妇产医院中青年学科骨干培养专项（No. FCYY201722）；北京市医院管理局儿科学科协同发展中心儿科专项（No. TYB201815）

作者单位：100026 北京，首都医科大学附属北京妇产医院新生儿科¹；100076 北京，泰普舜康医学检验实验室有限公司²；100015 北京，首都医科大学附属北京地坛医院感染性疾病医疗质量控制中心³

通信作者：曾慧慧，Email: bjfcyyzh@163.com

types of samples. The positive detection rate and detection period of the two methods were compared, respectively.

Results The lower detection limits of the MQ-PCR system for *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* were all 50 CFU/ml, and the linear detection ranges were all 5×10^1 - 1×10^5 CFU/ml. Bacteria detected by MQ-PCR system did not cross-react with 14 other common pathogenic bacteria or fungi with high homology DNA sequence. IFI was identified in 9 cases (26.47%) among the 34 infants by positive *Candidas* in blood culture. Meanwhile, the same blood sample and the patient's own (deep sputum and pharyngeal swab) samples from different parts of the above 9 children with IFI were also positive for *Candidas* by MQ-PCR, and the detected strains were identical with blood culture. The positive detection rate of *Candida* in blood samples by the two methods was basically the same ($\chi^2 = 0.5$, $P = 0.5$), which were 26.5% (9/34) by the culture method and 32.4% (11/34) by MQ-PCR. Compared with the positive detection rate of *Candida* in blood samples by blood culture (26.5%), there was no significant difference in different parts of the samples by MQ-PCR (all $P > 0.05$), which were 41.2% (14/34) in pharyngeal swabs, 32.4% (11/34) in deep sputum, and 32.4% (11/34) in blood. *Candida* detection period of MQ-PCR in blood [3.5 (3.2, 3.9); $Z = -2.7$, $P = 0.008$], deep sputum [3.1 (2.9, 3.2); $Z = -2.5$, $P = 0.013$], swabs [2.7 (2.5, 2.9); $Z = -2.7$, $P = 0.008$] were significantly shorter than that of *Candida* blood culture [94.0 (78, 105.8)]. **Conclusions** Compared with blood culture, MQ-PCR had the advantages of high coincidence rate and early detection when used to detect common *Candidas* pathogens in multi-types of specimens from neonatal IFI patients. MQ-PCR was helpful for early diagnosis of bloodstream infection and dynamic monitoring of *Candida* colonization in neonates.

【Key words】 Newborns; Invasive *Candidas* infection; Multi-channel molecular beacon polymerase chain reaction; Early-warning

侵袭性真菌感染 (invasive fungal infection, IFI) 是指侵袭深部组织、内脏及全身的真菌感染, 包括深部组织感染及真菌血症^[1]。IFI是新生儿重症监护病房 (neonatal intensive care unit, NICU) 感染相关死亡主要原因之一^[2]。出生体重 < 1 000 g 的新生儿IFI发生率可达20%^[3-4], 病死率为23%~66%^[5], 后遗症发生率为20%~57%, 包括严重的神经系统后遗症^[6]。目前造成NICU新生儿真菌感染的致病菌主要是念珠菌, 较常见的有白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌和热带念珠菌^[7]。快速敏感的原菌检出方法对IFI早期诊断十分重要, 对NICU所收治新生儿群体存在更大的必要性。

血培养真菌阳性是IFI诊断的金标准。但该方法缺点为时效性差、敏感性不足, 不能对新生儿IFI最佳治疗时机及时提供实验室信息支持。既往报道IFI血培养阳性率和实际感染相符不足50%^[8]。

目前已有研究探讨荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 在成人真菌脓毒血症、侵袭性肺曲霉病诊断的应用价值^[9-11]。基于发夹型探针的多通道分子信标实时荧光PCR技术 (multi-channel molecular beacon fluorescence quantitative polymerase chain reaction, MQ-PCR) 理论上较基于线性探针的荧光PCR技术具有更高灵敏度、特异性和热稳定性, 更适合区分遗传背景高度类似的念珠菌属的不同种念珠菌^[12], 且多通道检测能进一步

缩短检测时长。目前MQ-PCR技术应用于婴幼儿及新生儿真菌检测的评估性研究尚未见报道。

本研究建立了新生儿IFI相关4种常见念珠菌 (白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌和热带念珠菌) 的MQ-PCR快速检测体系, 并将临床诊断为新生儿脓毒败血症并疑似IFI患儿的血液标本、深部痰液标本和咽拭子的MQ-PCR快速检测与血培养结果进行比较, 评价其对新生儿IFI病原体早期检出的效能以及时效性; 并初步探讨新生儿IFI自身不同部位标本中常见致病念珠菌检出的差异, 了解无创标本检测对新生儿IFI病原早期检出的可能作用。为新生儿IFI早期诊断和及时治疗并改善预后提供参考信息, 现报道如下。

资料与方法

一、标准菌株与研究对象

应用4种常见IFI病原真菌标准菌株稀释液确认MQ-PCR体系灵敏度: 从ATCC购入白色念珠菌 (ATCC 18804)、光滑念珠菌 (ATCC 90030)、热带念珠菌 (ATCC 18807)、近平滑念珠菌 (ATCC 22019) 标准菌株。选用14种常见致病性细菌和同源性较高的真菌作为该体系的特异性验证, 从CGMCC购入金黄色葡萄球菌 (CGMCC 1.12409)、表皮葡萄球菌 (CGMCC

1.1757)、大肠埃希菌(CGMCC 1.12873)、粪肠球菌(CGMCC 1.2024)、牛链球菌(CGMCC 1.1624)、铜绿假单胞菌(CGMCC 1.2387)、清酒假丝酵母菌(CGMCC 2.3955)、季也蒙假丝酵母菌(CGMCC 2.3943)、丘陵假丝酵母菌(CGMCC 2.2003)、间型假丝酵母菌(CGMCC 2.2603)、乳酒假丝酵母菌(CGMCC 2.2295)、烟曲霉(CGMCC 2.6005)、黑曲霉(CGMCC 2.6151)和黄曲霉(CGMCC 2.3928)等标准菌株。

本研究对象为2018年1月至2019年4月在首都医科大学附属北京妇产医院新生儿重症监护中心NICU住院34例新生儿,胎龄30(26~40)周,平均日龄为(22 ± 11) d,体重965~3 140 g,身长36~50 cm,其中机械通气支持15例,中心静脉置管18例。入组病例均临床诊断为新生儿脓毒败血症^[13-14]。其中血培养真菌阳性为诊断新生儿IFI的金标准^[15]。诊疗方案遵循《实用新生儿学》。按临床诊治均取咽拭子标本、深部痰液标本0.5~1 ml、血液标本1 ml送检常规检查及微生物培养试验。本研究PCR实验标本需求量为30~50 μ l,均取材于常规血气生化、血培养检查后弃除试管管壁血液残余或护理后呼吸道分泌物剩余等可用的样本,不会因此研究给新生儿带来额外的负担及风险。该研究已获得本院伦理委员会批准(批号:2018-KY-017-01)。咽拭子及痰液标本冻存于-20℃冰箱,血液标本冷藏于4℃冰箱,以备后续MQ-PCR检测。

二、方法

1. 对咽拭子、痰液样本和血液标本进行样本预处理:标准菌株及临床样本的DNA采用泰普公司的念珠菌核酸提取试剂盒(DNA-Liquid-RY),利用液压磁珠法提取。

2. 引物及探针设计:根据念珠菌的转录间隔子2(internal transcribed spacer 2, ITS2)序列,使用Beacon Designer 8软件设计特异性引物和杂交探针(见表1),并对引物探针进行Blast分析,确认真菌引物探针及扩增产物与其他真菌、细菌、病毒以及人类基因序列无较高同源性。引物探针由泰普生物科学(中国)有限公司合成。

3. 进行多通道分子信标荧光PCR扩增:50 μ l的PCR反应体系包括:5 \times Buffer(含 Mg^{2+}) 10 μ l, 10 mmol/L dATP、dTTP、dCTP、dGTP和dUTP各1 μ l, 10 μ mol/L引物上下游各2 μ l, 10 μ mol/L探针

1 μ l, 5 U/ μ l Taq酶1 μ l(TaKaRa), 0.2 U/ μ l UNG酶1 μ l, 模板DNA 5 μ l, ddH₂O补足50 μ l。反应程序:37℃、2min, 94℃预变性2 min, 94℃、15 s, 55℃、45 s, 40个循环,在STRATAGENE Mx3000P(安捷伦公司)平台进行。

4. 对PCR反应体系灵敏度和特异性进行验证:将白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌4种标准菌株的冻干粉在沙保弱培养基种30℃培养16~24 h,用紫外分光光度计测量 A_{600} 为1.5~2进行培养,采用平板菌落计数方法进行计数,进行培养,采用平板菌落计数方法进行计数,用1 \times TE分别将4个标准菌株稀释至 1×10^6 CFU/ml作标准品初始浓度,为验证检测灵敏度,分别稀释全以下浓度:1 $\times 10^5$ CFU/ml、1 $\times 10^4$ CFU/ml、1 $\times 10^3$ CFU/ml、1 $\times 10^2$ CFU/ml、50 CFU/ml和10 CFU/ml,每个浓度做3个重复,做标准曲线,确定检测范围。将最低浓度进行20次重复,计算阳性检出率,检测到95%阳性的最低稀释度即为最低检测下限。临床样本的CFU检测值 ≥ 50 CFU/ml判定为PCR法阳性。对14种细菌或其他真菌菌株冻干粉进行培养后,选取 1×10^7 CFU/ml各个菌株进行体系特异性验证。

5. 设置对照及质量控制:扩增反应体系引用只表达于原核细胞的新霉素磷酸转移酶基因Neo对反应体系进行监控,选取特异菌株提取DNA作为阴性参考品,并设立空白对照和阳性对照,阳性对照采用低浓度标准菌株DNA。采用UNG酶防污染体系,消除假阳性和假阴性。每次PCR反应均设立对照组。整个实验过程分别在试剂准备区、样本处理区、加样区、检测区等不同的房间或生物安全柜进行。

三、统计学处理

使用SPSS 21.0软件进行统计分析。MQ-PCR与血培养IFI病原菌检出结果为计数资料,组间比较采用配对四格表资料的卡方检验。检测时间为计量资料且呈非正态分布,以中位数(P25、P75)表示,组间比较采用配对设计资料的Wilcoxon符号秩检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、标准菌株稀释液测定MQ-PCR体系敏感度、特异度和线性检测范围

应用4种念珠菌(白色念珠菌/近平滑念珠菌,光滑念珠菌/热带念珠菌)标准菌株梯度稀释液($1 \times$

$10^5 \sim 1 \times 10^1$ CFU/ml) 分析MQ-PCR体系的检测范围, 扩增曲线见图1。该检测体系在 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^1$ CFU/ml有很好的扩增曲线, 绘制标准曲线的确定系数(R^2)为0.995。将最低浓度50 CFU/ml重复20次检测, 阳性检出率 $> 95\%$, 将其定为最低检测限。采用14种浓度为 1×10^7 CFU/ml的常见致病性细菌或同源性较高的真菌测试MQ-PCR体系的检测特异性, 结果示14种测试菌检测均为阴性, 该体系与其他细菌和真菌无交叉反应。

二、临床标本的检测

本研究中34例临床疑似IFI的患儿均存在发热和(或)纳差、频繁呼吸暂停, 呼吸困难, 反应差; 存在血糖波动、血常规白细胞、中性粒细胞及超敏C-反应蛋白升高、血小板减少等征象。经血培养检测念珠菌阳性9例(26.5%), 实验室病原确诊新生儿IFI患者9例(编号1~9)。其中, 2例血培养结果为白色念珠菌(编号1和2), 7例血培养为近平滑念珠菌(编号3~9), 见表2。

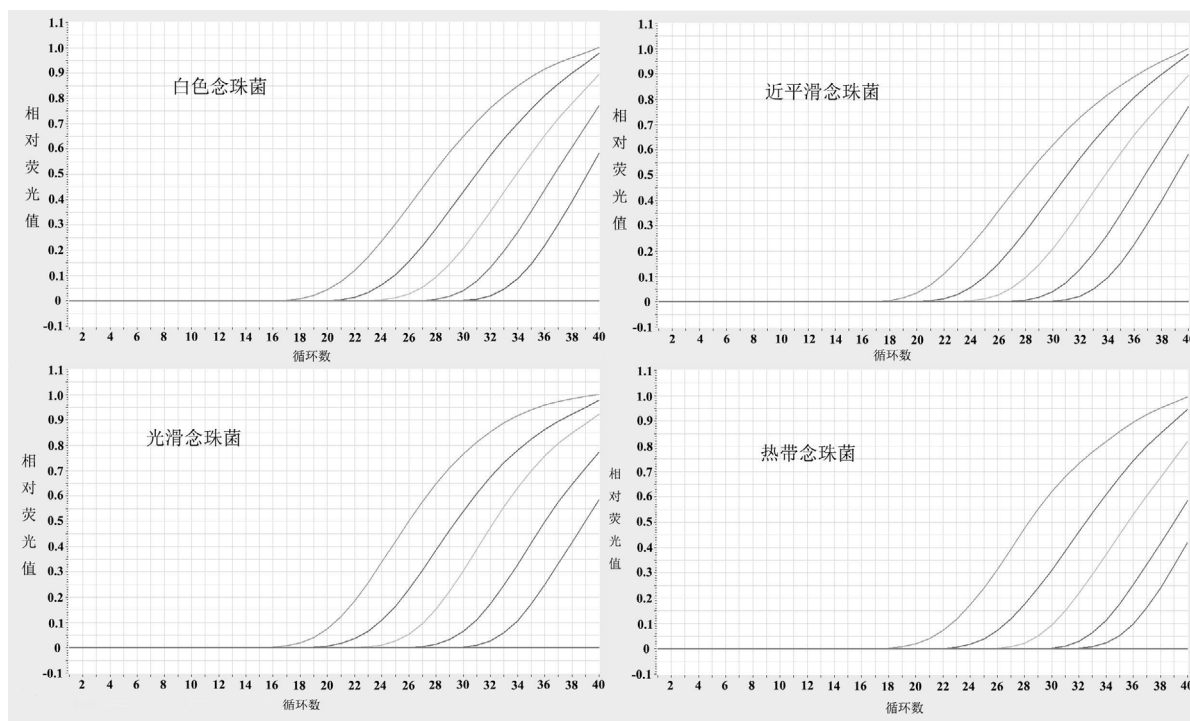
对患儿血液样本、咽拭子和深部痰液标本各34例应用MQ-PCR体系检测。34例血液样本和深部痰液标本中念珠菌检出结果一致(见表2), 11例念珠菌阳性, 阳性检出率为32.34%(11/34), 其中9例(编号1~9)检出念珠菌, 并且与血培养结

果为同种念珠菌; 2例(编号10和11)近平滑念珠菌阳性而血培养为真菌阴性。34例咽拭子样本中14例念珠菌阳性, 阳性检出率为41.18%(14/34)。其中包括血培养为同种念珠菌阳性9例(编号1~9), 其他5例MQ-PCR体系检测分别为近平滑念珠菌2例(编号10和11)和白色念珠菌3例(编号12~14)。

三、MQ-PCR与血培养念珠菌检出率和时长

34例血液标本经血培养念珠菌检出率为26.5%(9/34), 经MQ-PCR念珠菌阳性检出率为32.4%(11/34), 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.5$ 、 $P = 0.5$)。自身不同部位同一时间的样本经血培养和MQ-PCR检测结果见表3: 9例血培养阳性IFI患儿, 其同期自身不同部位(血液、深部痰液和咽拭子)的样本MQ-PCR检测100%阳性, 且检出菌种一致。自身不同部位标本MQ-PCR检测念珠菌阳性结果: 咽拭子标本14例(41.2%) ($\chi^2 = 3.2$ 、 $P = 0.063$)、深部痰液11例(32.4%) ($\chi^2 = 0.5$ 、 $P = 0.5$)、血标本9例(26.5%) ($\chi^2 = 0.5$ 、 $P = 0.5$), 与血培养念珠菌检出9例(26.47%)差异均无统计学意义。

MQ-PCR多部位念珠菌检测与血培养检测时长比较: MQ-PCR检测血液[3.5 (3.2, 3.9) h, $Z =$



注: 每个图中5条曲线自左向右依次为各菌的标准菌株于 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10^1 CFU/ml 稀释浓度时的扩增曲线

图1 4种念珠菌标准菌株于不同梯度稀释浓度时的扩增曲线

—2.7、 $P = 0.008$]、深部痰液[3.1 (2.9, 3.2) h, $Z = -2.7$ 、 $P = 0.008$]均显著低于血培养时长[94.0 $Z = -2.5$ 、 $P = 0.013$]、咽拭子[2.7 (2.5, 2.9) h, (78, 105.8) h], 差异均有统计学意义, 见表4。

表1 念珠菌上、下游引物及探针序列

菌株类型	引物序列F (5'→3')	引物序列R (5'→3')	探针序列 (5'→3')
白色念珠菌	GGCGCTCAAGCTGCTACT	ACGCCTGCCTACTCGTGAA	ATACTTCACCGTGATTGCTGTTTTGACGC
近平滑念珠菌	CATTTGCTCAATTGTATGCTGATTT	CGCAGCATCACGTTTCCA	CCCCAATCAATTTTGTTTTCCACACTTG
光滑念珠菌	CGAGAACAACCTCCGATTCTATAACC	TGGACTCAGAATCAGCATTTTCA	CCAATGCGACCAACGAAAAACACATG
热带念珠菌	ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA	CGCTGGCTCCGTCAGTGTA	TTCTGGGCCGCACGCGC

表2 34例临床疑似IFI患儿的基本信息、念珠菌MQ-PCR和血培养法检测

患儿编号	胎龄(周)	感染发生日龄	咽拭子PCR	深部痰液PCR	血液PCR	血培养
1	27	23	白色念珠菌	白色念珠菌	白色念珠菌	白色念珠菌
2	29	35	白色念珠菌	白色念珠菌	白色念珠菌	白色念珠菌
3	26	17	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
4	30	19	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
5	31	27	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
6	26	9	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
7	27	29	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
8	33	17	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
9	29	13	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌
10	28	31	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	—
11	27	11	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	近平滑念珠菌	屎肠球菌
12	36	15	白色念珠菌	—	—	草绿链球菌
13	40	10	白色念珠菌	—	—	—
14	39	8	白色念珠菌	—	—	—
15	31	20	—	—	—	屎肠球菌
16	29	35	—	—	—	表皮葡萄球菌
17	27	33	—	—	—	绿脓杆菌
18	28	38	—	—	—	鲍曼不动杆菌
19	27	47	—	—	—	屎肠球菌
20	35	12	—	—	—	大肠埃希菌
21	27	33	—	—	—	肺炎克雷伯菌
22	31	51	—	—	—	鲍曼不动杆菌
23	29	23	—	—	—	屎肠球菌
24	40	17	—	—	—	表皮葡萄球菌
25	31	20	—	—	—	屎肠球菌
26	30	30	—	—	—	金黄色葡萄球菌
27	28	26	—	—	—	肺炎克雷伯菌
28	30	21	—	—	—	表皮葡萄球菌
29	33	18	—	—	—	表皮葡萄球菌
30	38	13	—	—	—	草绿链球菌
31	36	9	—	—	—	屎肠球菌
32	31	23	—	—	—	—
33	34	14	—	—	—	—
34	29	7	—	—	—	—

注: “—”表示培养5 d 无菌生长

表3 自身不同部位同一时间样本 MQ-PCR 法与血培养法念珠菌阳性检出率 [例 (%)]

念珠菌	血培养	MQ-PCR检测		
		血液	深部痰液	咽拭子
阳性	9 (26.47)	11 (32.35) ^a	11 (32.35) ^a	14 (41.18) ^a
阴性	25 (73.53)	23 (67.65)	23 (67.65)	20 (58.82)

注：^a：与血培养法念珠菌阳性检出率行卡方检验， $P=0.05$

表4 血培养和 MQ-PCR 体系不同部位样本念珠菌的检测时间

检测方法	检出时间 [中位数 (P25, P75), h]	Z值	P值
血培养	94.0 (78.0, 105.8)	—	—
MQ-PCR			
血液	3.5 (3.2, 3.9) ^a	-2.7	0.008
深部痰液	3.1 (2.9, 3.2) ^a	-2.5	0.013
咽拭子	2.7 (2.5, 2.9) ^a	-2.7	0.008

注：^a：与金标准血培养检出时间比较： $P < 0.05$

讨 论

IFI是NICU感染相关死亡的主要原因之一^[16]，血培养是IFI诊断的金标准。但该方法存在不足：真菌生长缓慢，需数天甚至数周进行培养和菌种鉴别^[17]；真菌形态特征复杂且易随环境发生变化，培养法及微生物鉴定不能精确鉴别种属。然而，不同种甚至同属不同种念珠菌对同种抗真菌药物的耐药性往往不同^[18-20]，快速准确检出病原为IFI临床诊疗的需求，可降低耐药性及治愈难度。因此，本研究针对4种常见的新生儿IFI相关念珠菌^[7]：白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌和热带念珠菌，基于分子信标实时荧光PCR技术建立了多通道的快速检测体系（MQ-PCR），实现了菌种检出时长仅为3 h，远低于传统血培养约4 d。真菌厚壁，常规DNA提取耗时较长，MQ-PCR体系采用了热压破壁法，DNA提取时间较其他PCR方法缩短。相对于单通道PCR检测，多通道共反应体系又进一步缩短了反应时间，并简化了操作步骤，减少了试剂消耗。此外，相对于采用线性探针的PCR检测体系，采用发夹型探针的MQ-PCR能区分差异等位基因，区分出遗传背景高度类似的不同种念珠菌。本研究采用14种常见细菌及同源性较高的其他念珠菌进行测试，该MQ-PCR体系的检测均为阴性。但因本研究临床样本量有限，据此尚不能准确提供MQ-PCR方法在临床诊断中的具体灵敏度和特异度。本研究检测限略高于一项荟萃分析报道的单通道PCR检测限（≤

10 CFU/ml）^[21]，可能因采用全血样本而非血清样本，又进行多通道检测，有待进一步改进。此外，与PCR固有缺陷类似，MQ-PCR体系也不能提供药敏试验鉴定的重要信息。

血液样本经MQ-PCR体系对检测念珠菌阳性11例（32.4%），其中包含血培养阳性的9例IFI新生儿，且检出念珠菌种类完全一致，阳性符合率为100%。提示可在疑似新生儿IFI疾病早期采用微量血样本进行MQ-PCR测定，其鉴定结果可参比传统血培养，对IFI具有一定的临床参考价值。其中结果不一致（MQ-PCR体系检测念珠菌阳性而血培养为阴性）的2例新生儿，其在采集样本前已经接受了抗真菌药物治疗。血培养阴性可能与培养法对菌群浓度有要求有关，也不除外MQ-PCR假阳性可能，需要进一步研确认。

咽拭子和深部痰液真菌鉴定结果对分析咽喉部念珠菌定植状态、溯源血流感染可能起因、医院内感染控制有重要参考价值。该研究中真菌血培养为念珠菌阳性的9例患儿，均同时存在深部痰液MQ-PCR检测真菌阳性和咽拭子MQ-PCR检测念珠菌阳性，且菌种一致。即本研究中IFI感染新生儿同时存在上、下呼吸道同型真菌定植，不除外经咽部、经下呼吸道并至血流感染的感染路径，同时需要加强呼吸道感染诊治及感染控制。本研究中34例疑似IFI患儿深部痰液标本与血液标本的MQ-PCR检测完全一致，均为11例念珠菌阳性。14例患儿的咽拭子标本经MQ-PCR检测示念珠菌阳性，而深部

痰液及血液标本PCR 11例念珠菌阳性, 以及血培养示9例念珠菌阳性。在后续的诊疗过程中发现, 咽拭子阳性但血培养阴性的5例新生儿中有3例出现鹅口疮, 提示PCR在预警局部念珠菌感染可能具备早期预警价值。深部痰液和血流感染的高符合率, 使其可能成为IFI病原负荷及抗念珠菌疗效动态监测的指标。

本研究经血液样本检测确认IFI病例中, 其深部痰液和咽拭子等无创标本显示出和血液中念珠菌的高度一致性, 提示无创标本可能为新生儿呼吸道病原菌定植及血流感染持续监测提供有益参考。本研究仍存在一定局限性。本研究仅为单一时间点的横断面研究, 后续研究需要增加多部位样本尤其是深部痰液及咽拭子的取样时间点, 确认不同时间段IFI新生儿不同部位样本的检出结果和疾病进展的相关性, 以及对治疗预后的应用价值。本研究收集到样本数量有限, 且该样本群未出现光滑念珠菌和热带念珠菌感染病例, 尚需要更多样本进一步研究。逐步确认不同检测方法在新生儿IFI病原体早期检出的效能, 并拓展其对临床诊疗的参考和适用价值。

参 考 文 献

- [1] Walsh TJ, Katragkou A, Chen T, et al. Invasive candidiasis in infants and children: recent advances in epidemiology, diagnosis, and treatment[J]. J Fungi (Basel), 2019, 5(1):pii:E11.
- [2] Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis[J]. Lancet, 2017, 390(10104):1770.
- [3] Advani S, Reich NG, Sengupta A, et al. Central line-associated bloodstream infection in hospitalized children with peripherally inserted central venous catheters: extending risk analyses outside the intensive care unit[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(9):1108-1115.
- [4] Brissaud O, Tandonnet O, Guichoux J. Invasive candidiasis in neonatal intensive care units[J]. Arch Pediatr, 2011, 18(Suppl 1): S22-S32.
- [5] Le J, Tran TT, Bui I, et al. Time to initiation of antifungal therapy for neonatal candidiasis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(6): 2550-2555.
- [6] Chapman RL. Prevention and treatment of *Candida* infections in neonates[J]. Semin Perinatol, 2007, 31(1):39-46.
- [7] Grohskopf LA, Sinkowitz-Cochran RL, Garrett DO, et al. A national point-prevalence survey of pediatric intensive care unit-acquired infections in the United States[J]. J Pediatr, 2002, 140(4):432-438.
- [8] Kelly MS, Benjamin DK, Smith PB. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants[J]. Clin Perinatol, 2015, 42(1):105-117.
- [9] 鲁巧云, 余进, 高露娟, 等. 实时荧光定量PCR诊断侵袭性真菌病方法的建立及应用[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(12):822-826.
- [10] 刘军, 沈永年, 吕桂霞, 等. PCR检测深部致病真菌感染的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(8):439-441.
- [11] Wang H, Kim S, Kim H, et al. Real-time PCR TaqMan assay for rapid screening of bloodstream infection[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2014, 13(1):3.
- [12] Zhai Y, Liu J, Zhou L, et al. Detection of *Candida* species in pregnant Chinese women with a molecular beacon method[J]. J Med Microbiol, 2018, 67(6):783-789.
- [13] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华医学会《中华儿科杂志》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.
- [14] 张雨, 曾慧慧, 胡必杰. 新生儿脓毒症诊疗最新研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(24):5745-5750.
- [15] 戎荣, 吴本清. 新生儿侵袭性真菌感染研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(10):790-792.
- [16] Kelly MS, Benjamin DK, Smith PB. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants[J]. Clin Perinatol, 2015, 42(1):105-117.
- [17] Harun A, Blyth CC, Gilgado F, et al. Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4):1508-1512.
- [18] Yusef D, Shalakhti T, Awad S, et al. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: a retrospective review[J]. Pediatr Neonatol, 2018, 59(1):35-41.
- [19] Sharifynia S, Falahati M, Akhlaghi L, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of *Candida* species isolated from patients with vulvovaginitis in Tehran, Iran[J]. J Res Med Sci, 2017, 22(1):132.
- [20] Harun A, Blyth CC, Gilgado F, et al. Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4):1508-1512.
- [21] Tomer A, Leonard L, Mical P. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(2):665-670.

(收稿日期: 2018-06-10)

(本文编辑: 孙荣华)

张雨, 曾慧慧, 温春玲, 等. 多通道分子信标聚合酶链反应在新生儿侵袭性念珠菌感染快速诊断中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2019, 13(5):382-388.