

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.05.023
网络首发 https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250227.1515.006(2025-02-27)

环介导等温扩增法在新生儿感染性疾病中的应用价值分析^{*}

李娜,许健波[△],金慧杰
(金华市妇幼保健院检验科,浙江金华 321000)

[摘要] **目的** 评价环介导等温扩增(LAMP)法对新生儿感染病原菌的检测效能。**方法** 收集 2021 年 6 月至 2022 年 12 月在该院分娩的 167 例疑似感染的新生儿及早产儿生物标本(脐血及出生后 48 h 内新生儿血液或痰液),分别采用 LAMP 法和细菌培养法进行检测,对两种方法的检测结果进行比较。以细菌培养法为标准,评价 LAMP 法检测新生儿感染常见病原菌的阳性情况。**结果** 167 例标本中,LAMP 法检测病原菌的阳性率(24.0%)高于细菌培养法(15.0%),差异有统计学意义($\chi^2=4.30, P<0.05$);LAMP 法检测耐甲氧西林葡萄球菌的阳性率高于细菌培养法,差异有统计学意义($\chi^2=15.59, P<0.01$)。**结论** 与细菌培养法相比,LAMP 法检测耐甲氧西林葡萄球菌的阳性率较高,且能快速准确地诊断新生儿感染的病原菌,为临床快速制订诊疗策略提供依据。

[关键词] 环介导等温扩增法;细菌培养法;新生儿感染;耐甲氧西林葡萄球菌;灵敏度;特异度
[中图法分类号] R372 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)05-1172-04

Application value analysis of loop-mediated isothermal amplification technique in neonatal bacterial infectious diseases^{*}

LI Na, XU Jianbo[△], JIN Huijie
(Department of Clinical Laboratory, Jinhua Maternal and Child Health Hospital, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical value of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of neonatal infectious pathogens. **Methods** Biological samples (cord blood and neonatal blood or sputum within 48 hours of birth) of 167 suspected neonates and premature infants delivered in Jinhua Maternal and Child Health Hospital from June 2021 to December 2022 were collected and tested by LAMP method and bacterial culture method respectively. The results of the two methods were compared consistently. Using the bacterial culture method as the standard, the positive rate of LAMP method was evaluated in detecting common pathogens in neonatal infections. **Results** Among the 167 specimens, the positive rate of pathogen detection by LAMP method (24.0%) was higher than that by bacterial culture method (15.0%), and the difference was statistically significant ($\chi^2=4.30, P<0.05$). The positive rate of LAMP method for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was higher than that of bacterial culture method, and the difference was statistically significant ($\chi^2=15.59, P<0.01$). **Conclusion** Compared with bacterial culture method, LAMP method has a higher positive rate for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and can quickly and accurately diagnose the pathogenic bacteria of neonatal infections, providing a basis for the rapid development of clinical diagnosis and treatment strategies.

[Key words] loop-mediated isothermal amplification; bacterial cultivation method; neonatal infection; methicillin-resistant *Staphylococcus*; sensitivity; specificity

新生儿感染性疾病往往涉及多种病原菌,包括细菌、病毒和真菌等,尤其细菌所致感染发病率较高。尽管近年新生儿细菌感染性疾病住院率明显下降,但仍常见于新生儿群体,且存在导致新生儿死亡的风险^[1]。新生儿细菌感染性疾病的病原菌在不同地区有所差异,主要病原菌为肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌^[2-3],其他常见病原菌还包括鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞杆菌及嗜麦芽窄食单胞菌^[4-6]。医院对于感染性疾病的诊断主要基于细菌培养法,但由于感染性疾病病原菌多样,细菌培养法费时费力且对于难培养病原微生物无法鉴定。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)法

^{*} 基金项目:浙江省金华市重大(重点)科学技术研究计划项目(2021-3-130)。 [△] 通信作者, E-mail:1659268376@qq.com。

是近年来兴起的快速核酸扩增技术,主要利用 2 对或 3 对特异性引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下连续高效扩增,用荧光染料掺入法进行实时荧光检测,一次完成对靶基因的扩增和检测,具有较高的灵敏度和特异性^[7]。随着分子生物学技术的创新和进步,基于 PCR 的 LAMP 法已逐渐取代传统检测手段,特别是在临床微生物检测领域取得了显著成果,展现出检测快速、准确性高的优势。本文以 LAMP 法检测感染新生儿的主要病原菌为例,深入探讨该技术在快速识别新生儿呼吸道病原菌中的实际应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 6 月至 2022 年 12 月 167 例在本院分娩且疑似感染的新生儿及早产儿为研究对象,采集新生儿脐血及出生后 48 h 内血液或痰液标本。参照《实用儿科学》的标准,以疾病特征为参考,对新生儿病原菌感染程度做出判断:轻度定义为症状轻微,生化指标仅 1~3 项轻度异常;中度定义为症状、体征较明显,生化指标 4~6 项出现中度异常;重度定义为有明显或持续的症状和体征,生化指标 ≥ 7 项重度异常^[8]。本研究经本院伦理委员会批准(审批号:2021KY039)。

1.2 仪器与试剂

细菌 DNA 提取试剂盒(成都博奥生物科技有限公司),分光光度计(Nanodrop 2000,赛默飞世尔科技有限公司),恒温扩增微流控芯片核酸分析仪(型号:RTisochip-A,博奥生物集团有限公司),PCR 仪(型号:621BR56934,伯乐生命医学产品有限公司),全自动微生物鉴定药敏分析仪[BD Phoenix M50,碧迪医疗器械(上海)有限公司]。

1.3 方法

采用 LAMP 法和细菌培养法同时检测所有标本,对优势菌进行分析。

1.3.1 细菌培养法

采用细菌培养法对病原菌进行培养及鉴定。对病原菌进行常规分离培养,无菌拭子挑取新生儿脐血及出生后 48 h 内新生儿血液或痰液涂布接种于巧克力平板、血平板和麦康凯平板(美国 ThermoFisher Scientific 公司)上,将平板置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h,温度调至恒温 35℃,采用全自动微生物鉴定药敏分析仪对细菌进行鉴定。

1.3.2 LAMP 法

1.3.2.1 标本处理及 DNA 提取

加入等体积的 10% NaOH 溶液,混合 5 min,然后在 37℃ 下培养 30 min。取 1 mL 标本的上清液置于离心管,在 12 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,沉淀提取 DNA, DNA 置于 -20℃ 保存。

1.3.2.2 恒温扩增

充分融化恒温扩增试剂,轻轻摇动并充分混匀后

离心,吸取 20 μ L 恒温扩增试剂于 200 μ L 离心管中,再加入 34.5 μ L 待测标本或参比标本。轻轻混匀并离心,取出芯片,用移液管吸取 50 μ L 制备好的核酸扩增反应体系,加入到芯片的主通道中,用封口膜密封芯片,在 6 000 r/min 下离心 30 s。

1.3.2.3 核酸扩增及结果判读

启动并预热恒温扩增微流控芯片核酸分析仪,将芯片放入仪器中,输入相关标本信息后进行标本检测。检测结束后,软件自动分析数据,根据扩增曲线判读结果。

1.4 统计学处理

采用 SPSS26.0 对数据进行分析。计数资料采用例数或百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌培养法鉴定结果

167 例标本经细菌培养法培养后,鉴定的阳性率为 15.0%(25/167),共分离出 36 株病原菌(13 株金黄色葡萄球菌,13 株大肠埃希菌,4 株耐甲氧西林葡萄球菌,2 株肺炎克雷伯菌,1 株产酸克雷伯菌,1 株奇异变形杆菌,1 株溶血葡萄球菌,1 株阴沟肠杆菌。25 例阳性标本中,检出 16 例单一病原菌阳性,检出 9 例复合病原菌阳性。

2.2 LAMP 法检测结果

167 例标本中,LAMP 法检测 40 例标本呈阳性,阳性率为 24.0%(40/167)。LAMP 法共检出 55 株病原菌,包括 24 株耐甲氧西林葡萄球菌,14 株金黄色葡萄球菌,10 株大肠埃希菌,3 株铜绿假单胞菌,2 株肺炎克雷伯菌,2 株鲍曼不动杆菌。40 例阳性标本,检出 31 例单一致病菌阳性,检出 9 例复合病原菌阳性。

2.3 LAMP 法与培养法检测结果比较

LAMP 法阳性率(24.0%)高于细菌培养法(15.0%),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.30, P < 0.05$)。LAMP 法与细菌培养法对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌阳性标本的检出一致率分别为 92.9%、76.9%、100.0%。LAMP 法检测耐甲氧西林葡萄球菌阳性率明显高于细菌培养法,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.59, P < 0.01$),见表 1。

2.4 两种方法在不同季节检出主要病原菌分布特点及阳性率

将标本检测的时间分成 4 个季节:春季(3~5 月)、夏季(6~8 月)、秋季(9~11 月)和冬季(12 月至次年 2 月)。LAMP 法在春季和夏季均能有效检出耐甲氧西林葡萄球菌。细菌培养法在春季检出主要致病菌是大肠埃希菌,夏季检出主要致病菌是金黄色葡萄球菌。见表 2。

2.5 不同感染程度新生儿主要病原菌分布

轻度、中度、重度感染新生儿 LAMP 法检出的主要病原菌为耐甲氧西林葡萄球菌、大肠埃希菌和金黄

色葡萄球菌;细菌培养法检出新生儿的主要病原菌为大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌,见表 3。

表 1 LAMP 法和细菌培养法对各种病原菌检出情况比较[n(%)]

项目	LAMP 法阳性 (n=40)	细菌培养法阳性 (n=25)	χ^2	P
耐甲氧西林葡萄球菌	24(60.0)	4(16.0)	15.59	<0.01
金黄色葡萄球菌	14(35.0)	13(52.0)	0.04	>0.05
大肠埃希菌	10(25.0)	13(52.0)	0.42	>0.05
铜绿假单胞菌	3(7.5)	0	1.35	>0.05
肺炎克雷伯菌	2(5.0)	2(8.0)	0.25	>0.05
鲍曼不动杆菌	2(5.0)	0	0.50	>0.05
溶血葡萄球菌	0	1(4.0)	<0.001	>0.05
奇异变形杆菌	0	1(4.0)	<0.001	>0.05
产酸克雷伯菌	0	1(4.0)	<0.001	>0.05
阴沟肠杆菌	0	1(4.0)	<0.001	>0.05

表 2 两种方法在不同季节检出主要病原菌分布特点及阳性率[n(%)]

项目	春季 (n=51)	夏季 (n=86)	秋季 (n=20)	冬季 (n=10)
LAMP 法				
耐甲氧西林葡萄球菌	8(15.7)	16(18.6)	0	0
金黄色葡萄球菌	2(3.9)	10(11.6)	2(10.0)	0
大肠埃希菌	3(5.9)	7(8.1)	0	0
铜绿假单胞菌	0	3(3.5)	0	0
肺炎克雷伯菌	0	1(1.2)	1(5.0)	0
鲍曼不动杆菌	0	1(1.2)	1(5.0)	0
细菌培养法				
金黄色葡萄球菌	2(3.9)	9(10.5)	2(10.0)	0
大肠埃希菌	4(7.8)	8(9.3)	1(5.0)	0
耐甲氧西林葡萄球菌	1(2.0)	3(3.5)	0	0
肺炎克雷伯菌	0	1(1.2)	1(5.0)	0

表 3 不同感染程度新生儿病原菌检出情况[n(%)]

检测方法	轻度感染 (n=127)	中度感染 (n=31)	重度感染 (n=9)
LAMP 法			
耐甲氧西林葡萄球菌	11(8.7)	9(29.0)	4(44.4)
金黄色葡萄球菌	4(3.1)	7(22.6)	3(33.3)
大肠埃希菌	5(3.9)	2(6.5)	3(33.3)
铜绿假单胞菌	0	1(3.2)	2(22.2)
肺炎克雷伯菌	1(0.8)	1(3.2)	0
鲍曼不动杆菌	1(0.8)	1(3.2)	0
细菌培养法			
金黄色葡萄球菌	3(2.4)	7(22.6)	3(33.3)
大肠埃希菌	6(4.7)	3(9.7)	4(44.4)
耐甲氧西林葡萄球菌	0	3(9.7)	1(11.1)
肺炎克雷伯菌	1(0.8)	1(3.2)	0
溶血葡萄球菌	0	0	1(11.1)
奇异变形杆菌	0	0	1(11.1)
产酸克雷伯菌	1(0.8)	0	0
阴沟肠杆菌	0	0	1(11.1)

3 讨 论

在优生优育和三孩生育政策开放的大背景下,新

生儿健康成为我国卫生健康事业关注的重点。新生儿期作为机体发育过程的一个特殊阶段,具有免疫功能极不完善、发育不成熟、调节能力差等特征,特别是低出生体重儿及早产儿,易发生重症感染性疾病在内的多种疾病。早期呼吸道感染可能破坏正常的肺部发育,增加慢性呼吸道疾病(如哮喘)的风险^[9]。新生儿感染症状极具隐蔽及非特异特性。由于器官功能不完全成熟,严重感染可能导致严重后果,即使在使用有效抗生素、积极对症支持治疗下,新生儿的病情依然进展迅速,可在数小时进展为脓毒血症、多器官衰竭,最终导致死亡^[10]。高效诊疗新生儿感染性疾病的关键在于缩短病原菌检测时间并提升准确率。LAMP 法能明显缩短检测所需时间,检测范围更广,精确度更高。

金黄色葡萄球菌是成人肺炎的主要病因之一^[11-12],也是新生儿呼吸道感染和肺炎的主要致病菌^[13-14],但多项关于新生儿重症监护室相关病原菌感染的研究表明,耐甲氧西林葡萄球菌应是临床诊治的重要方向^[15-16]。本研究 LAMP 法检测病原菌的阳性率(24.0%)高于细菌培养法(15.0%),证实该技术在检测新生儿细菌感染方面具备较高应用价值;虽然 LAMP 法检测金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的阳性率(分别为 35.0%和 25.0%)低于细菌培养法(分别为 52.0%和 52.0%),表明 LAMP 法可能会遗漏部分阳性结果,但 LAMP 法检测耐甲氧西林葡萄球菌的阳性率(60.0%)高于细菌培养法(16.0%)。研究发现,新生儿感染耐甲氧西林葡萄球菌对不同抗生素表现出不同程度的耐药性,耐药机制是其携带突变 mecA 基因编码的青霉素结合蛋白对 β -内酰胺类抗生素亲和力降低^[17],如对头孢西丁、青霉素等抗生素的耐药率高达 90%^[18],金黄色葡萄球菌尤其是耐甲氧西林葡萄球菌,常规抗生素救治困难,死亡率较高,应引起足够重视。因此,在制订新生儿诊疗和用药策略时,需结合耐甲氧西林葡萄球菌的耐药性进行审慎考虑。

金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌是新生儿感染主要致病菌^[19],但随着早产儿数量上升及广谱抗菌药物频繁使用,新生儿耐甲氧西林葡萄球菌感染率急剧攀升;因此急需对新生儿耐甲氧西林葡萄球菌进行准确检测,本研究结果显示,LAMP 法对新生儿感染的耐甲氧西林葡萄球菌检出率较高,与相关文献研究结论一致^[20],且能检出多种常见致病菌。不同季节新生儿主要病原菌分布存在差异,LAMP 法在春季和夏季检测耐甲氧西林葡萄球菌的阳性率较高,提示在制订治疗方案时应充分考虑其耐药特性。细菌培养法结果显示,春季大肠埃希菌阳性率高达 7.84%,夏季金黄色葡萄球菌阳性率达 10.47%,这可能与南方地区春季梅雨天气较多、气温变化幅度大,有利于大肠埃希菌繁殖并引发消化道感染有关。无论感染程度如何,LAMP 法所检测到的病原菌中耐甲氧西林葡萄球菌

占比最大,进一步证实该方法在检测此类细菌方面具有较高的灵敏度。

新生儿感染性疾病具有发病快、新生儿耐受性差等特点,需要快速准确的病因诊查,缩短新生儿检查等待时间,提高感染性疾病治疗效果。LAMP 法因其具有灵敏度高、特异性强和快速反应等特点在临床病原菌诊断领域得到了广泛运用。然而,该方法的局限性在于不能提供药物敏感性的详细信息并且只能进行定性分析。因此,针对当前情况,应结合细菌培养结果与临床实际情况综合判断来进一步评估其结果的准确性。

综上所述,LAMP 法能快速准确检测新生儿感染性疾病的病原菌,其诊断效能高于细菌培养法,检测耐甲氧西林葡萄球菌阳性率明显高于细菌培养法,该法可用于新生儿感染性疾病的诊疗及用药策略的制订。

参考文献

[1] AUJARD Y. Empiric antibiotic therapy for neonatal infections:time to change[J]. Arch Pediatr,2015,22(2):123-127.

[2] 刘琼,袁红霞,何亦萍,等. 2020—2021 年某儿童医院 330 株新生儿感染病原菌分布与耐药分析[J]. 实用预防医学,2024,31(1):110-113.

[3] 杜欣欣,张金铃,杨萌婷,等. 1 132 例早产儿感染病原菌的分布特征及耐药性分析[J]. 贵州医科大学学报,2022,47(8):910-915.

[4] 陈鸿羽,李媛媛,邓春. 2010 至 2014 年我院新生儿肺炎主要病原菌分布及耐药性变迁[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(1):42-49.

[5] 张雅静,许津莉,袁二伟,等. 新生儿呼吸机相关性肺炎的病原菌分布与耐药性及影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2019,29(15):2375-2378.

[6] 李静,王琳洁,郑丽英,等. 新疆生产建设兵团地区新生儿院内感染的病原学及血清炎性因子水平检测分析[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(3):339-342.

[7] 钮静,权文强,李冬. LAMP 技术检测非小细胞肺癌患者外周血 EGFR 基因 L858R 位点突变方法的建立及应用[J]. 检验医学,2020,35(3):273-277.

[8] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2015.

[9] RESTORI K H,SRINIVASA B T,WARD B J, et al. Neonatal immunity, respiratory virus infections, and the development of asthma[J]. Front Immunol,2018,9:1249.

[10] 周琦. 新生儿重症监护病房感染防治及早期预警的研究与探讨[D]. 上海:复旦大学,2014.

[11] HE H,WUNDERINK R G. Staphylococcus aureus pneumonia in the community[J]. Semin Respir Crit Care Med,2020,41(4):470-479.

[12] SELF W H,WUNDERINK R G,WILLIAMS D J, et al. Staphylococcus aureus community-acquired pneumonia:prevalence,clinical characteristics, and outcomes [J]. Clin Infect Dis, 2016,63(3):300-309.

[13] 付盼,王传清,俞蕙,等. 中国儿童细菌耐药监测组 2022 年儿童细菌耐药监测[J]. 中国循证儿科杂志,2023,18(5):341-348.

[14] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. Lancet, 2022, 399(10325):629-655.

[15] WASHAM M,WOLTMANN J,HABERMAN B, et al. Risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in the neonatal intensive care unit: a systematic review and meta-analysis [J]. Am J Infect Control, 2017,45(12):1388-1393.

[16] SOUTHWICK K L,GREENKO J,QUINN M J, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clusters in neonatal intensive care units (NICUs) and other neonatal units in New York State (NYS), 2001 to 2017[J]. Am J Infect Control,2024,52(4):424-435.

[17] 雷新云,金正江. 新生儿病房分离金黄色葡萄球菌耐药性及耐消毒剂基因检测[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(7):447-449.

[18] BITRUS A A,ZUNITA Z,BEJO S K, et al. In vitro transfer of methicillin resistance determinants mecA from methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) to methicillin susceptible Staphylococcus aureus (MSSA)[J]. BMC Microbiol,2017,17(1):83.

[19] 李之红. 冠县中心医院儿科病房病原菌感染特点及耐药性分析[D]. 济南:山东大学,2020.

[20] MARTIN B J,STEPHANIE H,MUDDASSIR R, et al. Successful embolization of an infected aneurysm of a subsegmental pulmonary artery in an infant with necrotizing MRSA pneumonia [J]. Radiol Case Rep,2019,14(9):1079-1083.