

宏基因组二代测序在儿童中枢神经系统感染中的应用价值

南在元¹ 冯德琳² 王春雨¹ 石佳慧¹

1. 首都医科大学附属北京儿童医院黑龙江医院神经内科, 黑龙江哈尔滨 150010;

2. 首都医科大学附属北京儿童医院黑龙江医院中医科, 黑龙江哈尔滨 150010

[摘要] 目的 探讨宏基因组二代测序(mNGS)在儿童中枢神经系统感染中的价值。方法 选择2023年1月至2024年5月首都医科大学附属北京儿童医院黑龙江医院收治的45例疑似中枢神经系统感染的患儿, 收集脑脊液6 ml, 分别进行mNGS与常规检测后进行比较。结果 经过mNGS技术检测, 成功识别出共计26例可疑病原体, 同时, 脑脊液微生物培养技术检测出3例疑似存在的可疑病原体。在诊断中枢神经系统感染性疾病方面, mNGS组的灵敏度、准确度以及阴性预测值均高于微生物培养组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而mNGS组的特异度及阳性预测值方面均相接近于微生物培养组, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在评估儿童中枢神经系统感染的诊断时, 相较于脑脊液微生物培养检查, mNGS的优势显著, 但仍应结合多种检验方法综合判断, 以达到准确判断的目的。

[关键词] 儿童; 宏基因组二代测序; 感染; 中枢神经系统

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

[文章编号] 2095-0616(2025)02-0008-04

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2025.02.02

Application value of metagenomics next-generation sequencing in children with central nervous system infection

NAN Zaiyuan¹ FENG Delin² WANG Chunyu¹ SHI Jiahui¹

1. Department of Internal Medicine-Neurology, Heilongjiang Hospital of Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Heilongjiang, Harbin 150010, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang Hospital of Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Heilongjiang, Harbin 150010, China

[Abstract] **Objective** To investigate the value of metagenomics next-generation sequencing in children with central nervous system infection. **Methods** A total of 45 children suspected of central nervous system infection admitted to and treated in Heilongjiang Hospital of Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University from January 2023 to May 2024 were selected, and 6ml of cerebrospinal fluid was collected, and then the metagenomic next-generation sequencing (mNGS) was compared with conventional detection, respectively. **Results** A total of 26 suspected pathogens were successfully identified by mNGS technology, and 3 suspected pathogens were detected by cerebrospinal fluid microbial culture technology. In the diagnosis of infectious diseases of central nervous system, the sensitivity, accuracy and negative predictive value of the mNGS group were all higher than those of the microbial culture group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). While the specificity and positive predictive value of the mNGS group were all similar to those of the microbial culture group, without statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** When evaluating the diagnosis of children's central nervous system infection, mNGS has obvious advantages compared with cerebrospinal fluid microbial culture examination, but it should still be combined with a variety of examination methods to achieve the objective of accurate judgment.

[Key words] Children; Metagenomics next-generation sequencing; Infection; Central nervous system

中枢神经系统感染是指中枢神经系统被病原微生物侵犯所致的急性慢性炎症性疾病, 主要包括脑炎、脑膜炎、脊髓炎等^[1], 具有病原体复杂、进展迅速、病

[基金项目] 黑龙江省卫生健康委科研课题项目(20220606011009)。

死率及致残率高等特点^[2], 迅速且有效地确定病原体至关重要^[3]。目前, 脑脊液微生物培养作为传统且常用的诊断手段, 主要适用于细菌性中枢神经系统感染, 其阳性率有限, 不但需要3~7 d的时间, 而且病毒、寄生虫、结核、真菌等病原体感染时阳性

率极低^[4],临床工作中需要更快捷、有效的方法明确病原体,以应对临床诊疗压力。本研究把宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)与传统的脑脊液微生物培养在儿童中枢神经系统感染中的优势和缺点进行比较分析,进而优化该疾病诊治流程中的病原体检测策略,以期实现更早、更准确的病原体识别。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2023年1月至2024年5月首都医科大学附属北京儿童医院黑龙江医院(本院)收治的疑似中枢神经系统感染的45例患儿病历资料,进行回顾性研究。按照脑炎的诊断标准^[5],必要条件+2项次要条件时考虑为疑似脑炎,符合以下必要条件并且符合次要条件①和⑥时即为疑似感染性脑炎,明确中枢神经系统感染的标准:疑似感染性脑炎者脑脊液病原体检查阳性,并符合次要条件④和更多次要条件。必要条件:意识障碍或精神症状;次要条件:①发病前后72 h内有发热($>38^{\circ}\text{C}$);②癫痫发作(不能用之前的癫痫发作解释);③局灶性神经功能异常;④脑脊液白细胞数 $>5 \times 10^6/\text{L}$;⑤影像学检查发现脑实质异常信号;⑥脑电图符合脑炎特点。排除标准:①自身免疫性脑炎(合并副肿瘤综合征者);②有精神障碍病史者;③中枢神经系统肿瘤者;④先天免疫缺陷者。年龄 <17 岁,45例患儿中男24例,女21例,年龄2个月至8岁,平均 (3.7 ± 1.3) 岁。临床表现为发热45例,中枢性面瘫1例,意识障碍39例,头痛17例,精神症状9例,癫痫发作8例,偏瘫1例,步态不稳2例。本研究经本院医学伦理委员会批准。

1.2 检测方法

1.2.1 脑脊液的采集 在已消毒的穿刺室,取腰椎3~4间隙为穿刺点,用碘伏以穿刺点为中心画同心圆消毒3次,戴无菌手套,铺无菌洞巾,用2%利多卡因注射液进行局部浸润麻醉,持腰穿针于穿刺点垂直皮肤缓慢进针,进入蛛网膜下腔后缓慢拔出针芯,取6 ml脑脊液,插入针芯,术毕拔针,无菌纱布覆盖胶布固定。

1.2.2 脑脊液微生物检查 无菌环境下操作,取1 ml脑脊液注入需氧血培养瓶中,进行微生物培养;取1 ml脑脊液进行抗原抗体检测;其余2 ml脑脊液分成两管,送至我院检验科进行脑脊液常规及脑脊液生化检查。

1.2.3 脑脊液 mNGS 检测 剩余的2 ml脑脊液置于无菌采样管中,24 h内采用保温箱加干冰运输至北京欧蒙未一医学检验实验室。样本到达实验室进

行质控,经离心后采用差异化裂解法去除人源核酸。核酸提取和纯化后使用Illumina Nextera试剂盒建库,合格的文库利用Illumina NextSeq550平台及其配套试剂进行测序,剔除低质量序列后下机数据约20 Mb。下机数据经过原始数据质控、去除人源序列、去除重复序列等操作后,使用实验室自研PAI-IDB微生物基因组数据库进行物种鉴定,再去除试剂工程菌、环境微生物等背景菌,最后综合序列特异性、环境分布等情况,筛选出疑似病原体。

1.3 统计学方法

应用SPSS 22.0统计学软件对数据资料进行分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床诊断结果

在45例疑似中枢神经系统感染的患儿中,经过完善影像学检查、脑电图检查、脑脊液等检查,最终25例确定为中枢神经系统感染,其余20例排除中枢神经系统感染。

2.2 脑脊液微生物检查结果

3例阳性均为细菌感染,其中1例阳性为表皮葡萄球菌感染,与临床特点、常规检查、生化检查结果不符,考虑为标本污染所致,认定为假阳性,其余42例阴性。

2.3 脑脊液mNGS结果

26例检测结果为阳性,其中19例为病毒、5例为细菌、1例为真菌、1例为立克次体,12例为EB病毒,其中1例认定为非致病病原体,其余19例检测结果为阴性,见表1。

表1 患儿的脑脊液mNGS阳性结果

病原体种类	序列数	置信度	<i>n</i>
金黄色葡萄球菌	254	高	1
链球菌属	329-366	高	3
流感嗜血杆菌	232	高	1
EB病毒	4-7	低	12
人类疱疹病毒6型	3-4	高	2
单纯疱疹病毒	5-9	高	3
轮状病毒	4-6	高	2
立克次体	3	高	1
白色念珠菌	542	高	1

2.4 脑脊液mNGS与微生物培养技术对中枢神经系统感染性疾病的诊断

在儿童中枢神经系统感染的诊断中,采用脑

脊液 mNGS 的灵敏度高达 88.0%, 高于脑脊液微生物培养的 8.0%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。脑脊液 mNGS 诊断儿童中枢神经系统感染的准确度为 84.4%, 高于脑脊液微生物培养诊断儿童中枢神经系统感染的 46.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 脑脊液 mNGS 诊断儿童中枢神经系统感染的阴性预测值为 84.2%, 高于脑脊液微生物培养诊断儿童中枢神经系统感染的 45.2%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 脑脊液 mNGS 的特异度为 80.0%, 与脑脊液微生物培养的 95.0% 接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 脑脊液 mNGS 的阳性预测值为 84.6%, 与脑脊液微生物培养的 66.6% 接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2 ~ 3。

表2 两者在诊断儿童中枢神经系统感染的检测结果 (例)

诊断结果	mNGS		合计	微生物培养		合计
	阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	22	3	25	2	23	25
阴性	4	16	20	1	19	20
合计	26	19	45	3	42	45

注 mNGS: 宏基因组二代测序

3 讨论

中枢神经系统感染是儿科常见疾病, 病情复杂、进展迅速, 且易导致智力及运动功能受损, 甚至危及生命等不良后果, 早期诊断和干预治疗的关键就是病原体的明确。当机体处于感染状态时, 可通过血行感染或直接感染的方式引起中枢神经系统感染, 可通过脑脊液发现一些病原体等, 故脑脊液中发现病原体是中枢神经系统感染的有力证据 [6]。

目前医疗机构常用的检测脑脊液中病原体的方法有脑脊液涂片、微生物培养、抗原抗体检测、聚合酶链式反应等, 其中微生物培养需要 3 ~ 7 d, 有些病原体生长周期缓慢, 而且经常受到普遍使用抗生素的原因导致检出率低; 对于病毒、支原体等病原体的感染主要是通过抗原抗体检测, 临床医生要对可能感染的病原体先有预判, 才能进行针对性检测, 故容易导致临床诊断延迟, 甚至漏诊 [7]。

mNGS 是用二代测序技术, 可对标本中存在的每一段基因序列都进行测序 [8], 可以同时检测出样本中的所有 DNA 或 RNA 信息, 不需要对可能引起感染的病原体类型进行判断, 具有检出率高、时效快的特点 [9], 弥补了聚合酶链式反应、微生物培养、免疫标志物等靶向检查存在的缺点, 尤其在识别生长缓慢、非典型或稀有的微生物上作用更为明显 [10]。mNGS 获得病原体信息需 24 ~ 48 h 即可, 明显缩短了常规微生物检测所需的时间, 为中枢神经系统感染的诊断及治疗争取了宝贵的时间, 解决了以往检验方式存在的缺点 [11]。当前, 病原微生物的鉴定依然严格遵循经典的 Koch 原则 [12]。mNGS 可同时检测出多种病原体, 但这些病原体并非全部都是临床相关的致病病原体, 需要进一步判断真正的致病病原体, 要从多方面考虑, 比如是否为定植菌或污染、是否为非感染部位的正常定植菌出现、是否有延迟阳性、判断与人源序列的相似度等 [13], 要经过综合分析, 有时需结合其他检测方法验证后方能确定是否为临床相关致病病原体。

本研究回顾分析 45 例疑似中枢神经系统感染患儿的临床结果, 结合病原体筛查结果, 有 20 例被排除中枢神经系统感染, 25 例明确为中枢神经系统感染; 病原体检查结果可见脑脊液 mNGS 检出 26 例疑似致病病原体, 19 例为病毒、5 例为细菌、1 例为真菌、1 例为立克次体, 12 例为 EB 病毒, 其中 1 例因脑脊液标本混有较多血液, 而血清 EB 病毒检测为阳性, 无法判定病原体是来自血液还是脑脊液, 序列数为 1, 置信度低, 并且临床症状很快缓解, 最终认定为非致病病原体; 脑脊液微生物培养检出 3 例可疑病原体, 均为细菌, 其中 1 例为表皮葡萄球菌, 与脑脊液生化、脑脊液常规检查以及临床特点不相符, 认定为假阳性, 说明不论是 mNGS 还是微生物培养检查, 阳性结果不能完全断定为中枢神经系统感染; 另外, 有 1 例细菌性脑膜炎患者的脑脊液检查比较发现, 脑脊液微生物培养检查结果为阴性, 但 mNGS 检测出肺炎链球菌, 说明 mNGS 比微生物培养检查的

表3 两者在儿童中枢神经系统感染的诊断效能 [% (n/N)]

检测方法	灵敏度	特异度	准确度	阳性预测值	阴性预测值
mNGS	88.0 (22/25)	80.0 (16/20)	84.4 (38/45)	84.6 (22/26)	84.2 (16/19)
微生物培养	8.0 (2/25)	95.0 (19/20)	46.6 (21/45)	66.6 (2/3)	45.2 (19/42)
χ^2 值	32.051	2.057	14.221	0.607	8.125
P 值	0.001	0.151	0.001	0.436	0.004

注 灵敏度 = 真阳性例数 / (真阳性 + 假阴性) 例数 $\times 100\%$; 特异度 = 真阴性例数 / (假阳性 + 真阴性) 例数 $\times 100\%$; 准确度 = (真阳性 + 真阴性) 例数 / 总例数 $\times 100\%$; 阳性预测值 = 真阳性例数 / (真阳性 + 假阳性) 例数 $\times 100\%$; 阴性预测值 = 真阴性例数 / (真阴性 + 假阴性) 例数 $\times 100\%$; mNGS: 宏基因组二代测序

灵敏度高;对被检测出的病原体结构分析,脑脊液微生物培养检查只能对一些容易培养的细菌进行检测,对真菌、病毒、立克次体等病原体没有筛查能力,而mNGS除了对细菌有很好的检出能力以外,对真菌、病毒、立克次体等难以培养的病原体有较好的检出能力;mNGS对诊断中枢神经系统感染性疾病的灵敏度、准确度、阴性预测值分别为88.0%、84.4%、84.2%;脑脊液微生物培养的灵敏度、准确度、阴性预测值分别为8.0%、46.6%、45.2%,两者间差异有统计学意义($P < 0.05$);脑脊液mNGS的特异度、阳性预测值分别为80.0%、84.6%,脑脊液微生物培养的特异度、阳性预测值分别为95.0%、66.6%,两者间差异无统计学意义($P > 0.05$)。由此可见mNGS技术对各类病原微生物的检出率均要高于常规检测,显示出了良好的灵敏度和准确度,并且有良好的阴性预测值,有助于排除儿童中枢神经系统感染。本研究结果可见mNGS在诊断儿童中枢神经系统感染上有明显的优势,且病原体筛查方面较微生物培养有很高的阳性率,尤其是非细菌性病原体感染时,mNGS的优势显著,这与已报道的研究结果一致^[14-15]。

综上所述,在儿童中枢神经系统感染中,mNGS技术能够比脑脊液微生物培养的灵敏度更高、效率更快,能更准确地确定病原体信息,尤其是考虑为非细菌性中枢神经系统感染时,mNGS有很大的优势,对于儿童中枢神经系统感染的早诊断和早治疗具有重要意义,随着测序成本的降低,临床应用价值越来越大,尽管如此,传统的微生物病原学诊断技术依然是临床病原学诊断首选手段,mNGS不能完全替代传统病原学诊断技术,但可作为有益补充和印证。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杜倩,邓素君,邹姗,等.宏基因组第二代测序技术在重症中枢神经系统感染中的应用[J].中国现代神经疾病杂志,2023,23(6):479-484.
- [2] 徐跃娇,齐猛,尚峰,等.宏基因组第二代测序技术在神经外科颅内感染病原学诊断中的应用初探[J].中国现代神经疾病杂志,2020,20(8):682-687.
- [3] 张梦瑶,任建发,陈亚南,等.脑脊液宏基因组二代测序技术及其在中枢神经系统感染性疾病诊断中的应用进展[J].山东医药,2020,60(27):86-90.
- [4] 上官丽娟,王海龙,尚晶,等.宏基因组二代测序在中枢神经系统感染性疾病诊断中的应用[J].武警医学,2022,33(6):472-475.
- [5] Britton PN, Eastwood K, Paterson B, et al. Consensus guidelines for the investigation and management of encephalitis in adults and children in Australia and New Zealand[J]. Intern Med J, 2015, 45(5):563-576.
- [6] 王帝,韩冰莎,王瑞康,等.宏基因组测序在神经外科重症患者中枢神经系统感染中的应用研究[J].中华神经医学杂志,2022,21(1):47-53.
- [7] 顾嘉程,吴洪,陈星兆,等.宏基因组二代测序在诊断颅脑创伤相关中枢神经系统感染中的价值[J].中华神经外科杂志,2020,36(10):993-997.
- [8] 韩心远,高小娟.宏基因组测序技术在感染性病原体检测中的应用进展[J].海南医学,2022,33(14):1875-1878.
- [9] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组,中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组,中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会.宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J].中华检验医学杂志,2021,44(2):107-120.
- [10] Huang PQ, Du H, Chen HB, et al. Invasive pulmonary fungal infections in children with severe human adenovirus type 7 pneumonia: a retrospective study[J]. Pediatr Neonatol, 2022, 63(4):388-393.
- [11] 孙新蕾,吴长城,谭文杰,等.宏基因组测序在中枢神经系统感染性疾病诊断中的应用及研究进展[J].微生物学报,2022,62(10):3722-3731.
- [12] 中华医学会检验医学分会.高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J].中华检验医学杂志,2020,43(12):1181-1195.
- [13] 李颖,麻锦敏.宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版)[J].中华危重病急救医学,2020,32(5):531-536.
- [14] Qu Y, Ding W, Liu S, et al. Metagenomic next-generation sequencing vs. traditional pathogen detection in the diagnosis of infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children[J]. Front Microbiol, 2022, 13:868160.
- [15] 林霞,颌满珍,王根绪,等.宏基因组二代测序技术对疑似中枢神经系统感染性疾病的病原诊断价值[J].中国医药科学,2023,13(10):15-19.

(收稿日期:2024-07-11)