

宏基因组二代测序在儿童中枢神经系统感染性疾病研究中的应用

汪奕臣, 王建辉*

重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆

收稿日期: 2025年2月28日; 录用日期: 2025年3月21日; 发布日期: 2025年3月31日

摘要

中枢神经系统(Center Nervous System, CNS)感染性疾病是儿童时期的严重疾病, 病因复杂, 传统检测方法常难以确诊。宏基因组二代测序(Metagenomic Next-Generation Sequencing, mNGS)作为一种无偏倚、高通量的检测技术, 可同时检出多种病原体, 并在经验性抗生素治疗后仍具有较高的检出率, 在疑难和罕见感染的诊断中具有优势。然而, mNGS仍存在灵敏度受限、污染导致假阳性、检出阈值设定和数据解读复杂等问题。部分研究表明, 其在病毒性、细菌性、结核性脑膜炎及寄生虫感染中的诊断价值高于传统方法。结合宿主反应分析可进一步提升mNGS的诊断能力, 有助于精准识别病因。本文旨在综述mNGS在儿童CNS感染中的应用进展, 探讨其优势与局限, 并展望未来优化方向, 以提高其临床应用价值。

关键词

宏基因组二代测序, 儿童, 中枢神经系统感染, 病原体检测, 精准医学

Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing in the Study of Infectious Diseases of the Central Nervous System in Children

Yichen Wang, Jianhui Wang*

Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center of Child Health and Disorders, Newborn Diagnosis and Treatment Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

*通讯作者。

Received: Feb. 28th, 2025; accepted: Mar. 21st, 2025; published: Mar. 31st, 2025

Abstract

Central nervous system (CNS) infectious diseases are severe conditions in children with complex etiologies, often posing diagnostic challenges for conventional methods due to their limited sensitivity and specificity. Metagenomic next-generation sequencing (mNGS), as an unbiased and high-throughput detection technology, enables the simultaneous identification of a wide range of pathogens, including bacteria, viruses, fungi, and parasites, even after empirical antibiotic treatment. This technique has shown significant advantages in diagnosing complex, rare, and atypical infections. However, challenges such as limited sensitivity, false positives due to contamination, threshold setting, and complex data interpretation remain unresolved. Studies have demonstrated that mNGS has higher diagnostic value than conventional methods for viral, bacterial, tuberculous, and parasitic infections of the CNS. Moreover, integrating host response analysis with mNGS can enhance diagnostic accuracy and facilitate the differentiation between infectious and non-infectious encephalitis. This review aims to summarize the current applications of mNGS in pediatric CNS infections, discuss its advantages and limitations, and explore future directions for optimization to improve its clinical utility.

Keywords

Metagenomic Next-Generation Sequencing, Children, Central Nervous System Infections, Pathogen Detection, Precision Medicine

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. mNGS 简介

宏基因组二代测序(Metagenomic Next-Generation Sequencing, mNGS)是对患者样本中的微生物和宿主遗传物质的综合分析[1], mNGS 作为一种无需假设的无偏倚的检测方法, 可以同时检测细菌、DNA 和 RNA 病毒、真菌和寄生虫等目前已知的病原体, 现在主要用于检测病原体和耐药基因, 研究微生物组学、宿主反应和肿瘤学。

中枢神经系统(Center Nervous System, CNS)炎症包括脑膜炎、脑炎和脊髓炎等表现形式, 有大约 50% 急性中枢神经系统炎症的病因仍然不明[2]。中枢神经系统感染性疾病是儿童时期较为严重的疾病之一, 按病原学可分为细菌性、病毒性、真菌性和寄生虫感染。脑膜炎是神经伤残调整寿命年的第四大致病因素[3], 从 2014 年到 2019 年, 58 个参与国报告了超过 13.7 万例疑似脑膜炎病例, 其中 44.6% (n = 61,386) 来自非洲, 超过一半(56.6%, n = 77,873)发生在 1 岁以下的儿童中, 在报告疾病结局的人中, 有 4.0% (n = 4010) 死亡。儿童脑膜炎具有共同的重叠临床特征, 如发热和脑脊液细胞增多症, 儿童脑炎通常还伴有脑病、癫痫、局灶性神经学表现和/或异常的神经影像/脑电图, 这些非特异性的潜在病因, 会导致确诊困难进而使患儿接受的有效治疗延迟。因为通过培养和 PCR 进行的常规检测往往无法确定病原体[4], mNGS 的优势也在临床中逐步显现, 本篇综述将重点介绍 mNGS 在儿童中枢神经系统感染性疾病中确诊病原体的研究和作用。

2. mNGS 在儿童中枢神经系统感染性疾病的临床应用

2.1. mNGS 对 CNS 感染性疾病诊断的应用

2.1.1. 病毒性感染

病毒性感染是脑炎最常见的类型[5]，美国一项统计数据显示，有明确病因的脑炎患者中，病毒是最常见的原因，占 40%~48%，其中单纯疱疹病毒最为常见[6]。其常规病原体的检测方法有免疫学(抗体检测)、聚合酶链反应(PCR)、逆转录(RT)-PCR [7]等。但因为以上传统检测具有特异性，需要临床医生凭借患者临床表现和其他辅助检查结果，提前判断患者可能是何种病原体感染，比较依赖于临床医生的诊断水平，容易导致漏诊[4]。mNGS 作为一种无偏倚的检测方法，不需要考虑不同病毒对检测方法的敏感性区别。

病毒性中枢神经系统感染的患者可能会不适当使用抗生素，经过广谱抗生素治疗后，患者的症状没有改善甚至恶化，Duan 等人的研究从 23 例患者中检出 4 种病毒，其中单纯疱疹病毒 15 例，EB 病毒/单纯疱疹病毒 5 例，EB 病毒 1 例，甲型肝炎病毒 1 例，Teno 病毒 1 例，mNGS 确定真正的病原体并据此调整抗生素使用后，患者的病情有所改善[8]。

mNGS 灵敏度虽然比较高，但也有研究发现 mNGS 对 CSF 中病毒的检出率与传统检测相比并没有明显差异，对某些特定病毒病原体仍有检出率低或者无法检出的问题。在 Erdem 等人的研究中，对纳入第 1 组的 27 名怀疑脑炎或脑膜炎的患儿进行了 mNGS 检测，只有 1 例西尼罗河病毒感染是通过 mNGS 独立发现，其他检测技术均为阴性结果，但 mNGS 却漏诊了 3 例加利福尼亚病毒感染[9]，这与 Haston 等人的研究结果相似，该研究中 mNGS 没有在 CSF 中检测到任何病原体，但通过免疫荧光检测和头部 MRI 确诊了患儿的加利福尼亚脑炎[6]，这表明 mNGS 可能不适合用于加利福尼亚脑炎的临床诊断。在 Schibler 等人的单中心前瞻性非配对病例对照研究中，mNGS 对病毒病原体的灵敏度阈值接近 rRT-PCR 检测，mNGS 虽然对罕见病原体和意外病原体的诊断具有一定优势，但仍存在着容易污染等各种问题[2]。且 mNGS 无法识别大多数表现为急性脑炎的患者的致病病毒，所以免疫功能正常的患者出现中枢神经系统症状时，mNGS 很难区分脑膜脑炎是感染性还是非感染性[9]。

在 Nguyen 等人的研究中，mNGS 可以准确地检测出 66 名参与者 CSF 中广泛的嗜神经病毒的核酸，在 15 个 PCR 和血清学检测为阳性的 CSF 样本中，mNGS 检测阳性的脑脊液中分别有 5/7、1/1 和 1/4 检出单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒和腮腺炎病毒，但未检出登革热和乙脑。在 51 份常规诊断为阴性的 CSF 样本中，mNGS 在 24 份中发现了嗜神经病毒的 reads，包括肠道病毒 23 例和轮状病毒 1 例，在 PCR 确认后，EV 阳性脑脊液样本的数量从 23 个减少到 7 个，值得注意的是这 7 名(11%)EV 感染者在出院时没有被诊断出来。mNGS 未能在血清学阳性的 CSF 样本中检测到 JEV 和 DENV 的核酸，这强调了 mNGS 不是所有病原体的最佳诊断方法[10]。

2.1.2. 细菌性感染

WHO 一项统计数据显示，在 2014~2019 年间的儿童疑似脑膜炎病例中，有 8.6% (n = 11,798) 被归类为疑似细菌性脑膜炎。其中 30.3% (n = 3576) 的病例确诊为以下 3 种细菌病原体之一，即肺炎链球菌 60.9% (n = 2177)，脑膜炎奈瑟菌 21.4% (n = 766) 和流感嗜血杆菌 17.7% (n = 633)。确诊病例中死亡人数占 11.0%，在 277 名确诊死亡病例中，有 68.2% (n = 189) 确诊为肺炎链球菌。可见肺炎链球菌是全球检测到的最常见的脑膜炎细菌病原体，且造成的死亡比例很大。在急性细菌性脑膜炎中，肺炎链球菌和脑膜炎奈瑟菌也是所有年龄段和地区的主要病原体，分别占细菌性脑膜炎病例的 25.1%~41.2% 和 9.1%~36.2% [11]。

在细菌性中枢感染疾病中，mNGS 相比于传统检测的优势在于其受到经验性抗生素治疗的影响较小，

这是因为常规检测要求病原体必须存活, 而 mNGS 只需要识别病原体的 DNA 片段, 病原体死后, 其 DNA 仍会存在于人体内数天, 这为 mNGS 检出病原体提供了条件和优势。Zhang 等人研究表明, 经验性地使用抗生素会使传统检测细菌病原体的检出率明显降低约 20%, 在真菌、病毒和寄生虫感染中并没有观察到明显的差异, 但进一步分析表明, 在有效抗生素治疗 4 天后, mNGS 检出病原体的 reads 还是会显著下降[12]。Ge 等人收集了 101 份新生儿疑似中枢神经系统感染的脑脊液, 分为经验治疗组和非治疗组, 两组 mNGS 的细菌病原体的检出率都明显高于常规培养(分别为 17.5% vs. 1.6%, $P=0.002$; 5.3% vs. 2.6%), 且 mNGS 检测到的潜在病原体远远多于传统检测[13]。新生儿患者神经系统尚未发育成熟, 临床表现不典型, 病情变化快且进展迅速, 新生儿医师常常需要经验性地使用抗生素, 所以对于广泛使用经验性抗生素治疗的新生儿, mNGS 比常规培养更适合。

Zhang 等人报告了首例由中间型链球菌脑膜炎引起的噬血细胞性淋巴组织增生综合症病例。患儿 11 岁 9 个月, 脑脊液常规检查显示有核细胞增多, 脑脊液的涂片和培养为阴性, 但 CSF 的 mNGS 检测到中间型链球菌, 该研究表明当传统检测阴性时, mNGS 可以提高对病原体的检测灵敏度[14]。

虽然 mNGS 对于细菌性中枢神经系统感染的灵敏度高于传统检测, 但 Ramchandar 等人的研究中, 招募的 70 名患儿中, mNGS 出现了 5 例假阴性, 其中 2 例是硬件感染, 脑脊液培养检出金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌, 尽管 mNGS 报告阴性, 但均有检测到这两种病原体, 不过都低于报告阈值[4]。所以是否考虑降低常见病原体的检出阈值, 提高 mNGS 灵敏度, 还需要进一步的临床研究。

2.1.3. 真菌性感染

真菌性中枢神经系统感染可表现为脑膜炎或局灶性脓肿, 并在免疫力低下的宿主中引起致命的并发症, 一般由呼吸道感染, 继而传播到中枢神经系统[15]。

mNGS 对隐球菌诊断效果比传统方法差, 在 Xing 等人的研究中, 有 13 例确诊为隐球菌性脑膜炎的患者, 他们的脑脊液墨汁染色和真菌培养首次阳性率分别为 0 和 38.4%, 但经多次染色/培养后, 上述两种方法的阳性率均为 84.62%, 而 mNGS 的敏感度为 76.92%, 这可能是由于荚膜的保护导致隐球菌的 DNA 并没有被完全地释放, 而传统检测相对于 mNGS 更便宜方便, 可以重复操作来提高其阳性率。但 mNGS 仍有优势, 可用于鉴定种类, 有利于真菌性脑膜炎的诊断和管理[16]。但该研究样本量少, 存在偏倚。

Wang 等人报告了一例隐球菌感染的病例, 患者隐球菌荚膜多糖抗原阳性, 但患者非特异性的临床表现、影像表现和两次微生物培养阴性导致诊断和治疗的延迟, 最终发展成一种难治性的骨骼隐球菌病。患者的最终诊断联合了临床表现、实验室检查、影像学、活检结果和 mNGS, 特别是组织病理学分析和 mNGS 的报告[17]。培养是诊断的金标准, 但通常受培养条件和技术的限制, 结果往往呈阴性, 而 PCR 针对单一病原体的检测容易造成意外病原体的漏诊, mNGS 作为一种广泛识别病原体的检测方法对隐球菌的临床诊断有着重要的意义。

2.1.4. 结核性感染

结核性脑膜炎(tuberculous meningitis, TBM)的诊断困难, 传统方法的阳性率低。且 TBM 在 mNGS 相关的各个研究中的阳性率差异大, 为 27.27%~84.44% [18] [19], 但仍是每个研究中敏感度最高的检测方法。在 Wang 等人研究纳入的 12 例确诊患者中, mNGS、AFB、PCR 和培养法检测 MTB 的敏感性分别为 66.67%、33.33%、25% 和 8.33% [19]。Yan 等人的研究发现, 在疑似 TBM 的 45 例患者中, mNGS 的敏感性最高(84.44%), 其次是 Xpert MTB/RIF (40%)、RT-PCR (24.44%)、MGIT960 培养(22.22%)和 AFB 涂片(0%), 且在明确诊断的 38 例中, mNGS 的灵敏度达到了 100%, mNGS 阴性病例在其他四项检测中也呈阴性结果[18]。Xing 等人研究也发现, 在 44 例 TBM 确诊患者中, 脑脊液 Xpert MTB/RIF 阳性率为 16.13% (5/31), mNGS 阳性率为 27.27% (12/44), mNGS 和 Xpert MTB/RIF 联合阳性率为 29.55% (13/44)

[19]。因此, mNGS 和其他检测方法的联合应用并不能提高 TBM 的阳性率。

虽然 mNGS 的灵敏度在每个研究中差距比较大, 但其特异度高达 96.4%~100% [17]~[19], 这表明 mNGS 也许不能作为明确诊断的方法, 但可作为排除诊断的方法。关于检出阈值, 分枝杆菌由于是胞内病原体, 相对丰度比其他病原体更低, 故应该考虑降低 mNGS 对分枝杆菌的检出阈值[18], 这也符合 Xing 等人的研究, 在当 mNGS 检测的结核分枝杆菌的 reads ≥ 1 为阳性时, AUC 曲线下面积取得最大值(0.619, 95%CI = 0.516~0.721) [16], 虽然诊断效用不高, 但鉴于目前诊断 TBM 仍然困难, mNGS 无疑是非常有用的。

2.1.5. 寄生虫感染

寄生虫尽管很少见, 但也可以引起中枢系统感染[20] [21], 是免疫功能正常宿主中脑膜脑炎的罕见病因, 在免疫功能低下的患者中可能更常见, 传统检测是通过 CSF 中的抗体提示, 检测到幼虫确诊, 血清学检测不能区分是正在感染还是既往感染, 且因交叉反应受限不能成为确诊方式[15]。

mNGS 在中枢神经系统寄生虫感染的研究中均取得较好诊断效果, 在 Haston 等人发现一名 6 岁患儿在住院期间出现了提示中枢神经系统感染的脑脊液常规和相应的临床症状, 但患儿的感染性疾病评估结果为阴性, 直到第三次腰椎穿刺的脑脊液用于特异性 PCR 检测才得以诊断。当随后使用 DNA 提取法进行 mNGS 时, 也得到了阳性的结果[6]。如果在疾病早期送检 mNGS, 及时确诊, 这名患儿最后或许不会死亡。

巴氏阿米巴引起的脑炎由于其不典型的表现很容易被误诊为其他病原体感染性质的脑炎, 特别是当患儿没有明确的寄生虫接触史时[22] [23]。在 Yang 等人的报告的一份病历中, 一名 2 岁出现男性患儿由于结核菌素试验反应阳性接受了抗结核治疗, 但患儿病情反复甚至加重, 最后出现呼吸和心跳骤停后死亡, 在随后的 mNGS 报告中提示巴氏阿米巴感染, 因为生前缺少特异性临床症状和实验室诊断标准, 致其诊断和治疗延误, 所以及早地应用 mNGS 明确病因, 有助于临床医生找到有针对性的、有效的抗菌治疗方法。

Wilson 等在临床中发现两例猪带绦虫感染的患者, 第一位患者虽然血清囊虫病抗体检测结果为阳性, 但在脑部 MRI 上未发现囊性或钙化。但结核菌素皮肤试验阳性、结核干扰素- γ 释放试验阳性等实验室检查让主管医生开始了经验性治疗结核分枝杆菌脑膜炎。患者在 3 周的治疗中病情反复, 随后 CSF 的 mNGS 检测结果提示猪带绦虫感染, 经过 8 个月的治疗, 除了残留的动作性震颤, 其他临床症状均改善到基线水平。第二名患者的脑脊液和血清囊虫病抗体检测结果呈阳性, 脑部 MRI 和脑脊液常规也提示相应感染, 这与 mNGS 的结果一致[24]。

2.1.6. 罕见病原体感染

mNGS 对罕见病原体和意外病原体的诊断具有一定优势, 临床上的中枢神经系统感染更多考虑的是常见病原体, 罕见病原体除了较少被考虑到之外, 还受到实验室条件和检测手段的限制, 可能没办法从常规检测中得到诊断。mNGS 作为一种广泛检测病原体的方法, 可以有效针对常规检测的漏诊, 及早确定罕见病原体的种类, 不延误诊断和治疗。

在 Liu 等的研究中, mNGS 显示了患者脑脊液样本中 PRV 的特异性核苷酸序列, 与 PCR 一同证实了伪狂犬病毒的感染, 并从 1 名患者的脑脊液中分离到首株人源 PRV [25]。

细小病毒 B19 在免疫功能正常的宿主表现为感染性红斑, 在免疫功能低下的宿主中表现为纯红细胞再生障碍和慢性贫血[26], 但细小病毒 B19 在急性脑炎的病例中并不常见。Haston 等人报告了感染细小病毒 B19 并表现为急性脑炎的 15 岁患儿, 第一次的 MRI 显示软脑膜强化, 随后的 MRI 结果显示脑血流灌注减少, 实验室评估没有发现血液学异常, 脑脊液白细胞明显增多, 最终在第二个脑脊液样本中用

mNGS 检测到了细小病毒 B19 的 reads [6]。

人类对牛支原体的敏感不高, 到目前为止只报告过 1 例人类感染牛支原体[1][27][28]。同样是 Haston 等人报告了一例感染牛支原体的 11 岁女性患儿, 她在生病之前曾在一家动物园与牲畜有过接触, 这可能是感染这种微生物的原因。患儿 3 次的脑脊液常规都表现为细胞增多、蛋白质升高、糖下降, 脑部 MRI 显示弥漫性软脑膜强化, 由于结核菌素试验阳性, 虽然没有找到结核分支杆菌, 患儿还是接受了 2 个月的抗结核经验治疗, 但仍没有确定脑炎的原因。最后 mNGS 在患儿的脑脊液和血清中检测到了牛支原体, 患儿接受了多西环素的治疗后, 康复出院[6]。

Ge 等人在对疑似神经系统感染新生儿患者的 CSF 样本进行检测时, mNGS 发现了一例罕见的人型支原体感染, 而常规方法并没有检出。虽然患儿的体温和脑脊液白细胞计数在阿奇霉素治疗后都有所下降, 但他已经患有严重的脑软化症[13]。因此, 这一结果表明了早期准确的病原学诊断和积极治疗的重要性, 尽早送检 mNGS 与减少 mNGS 的转运时间, 对重症患者来说都很重要。

Xie 等人用 mNGS 诊断了两例广州管圆线虫的婴儿, 其 MRI 不能为诊断提供有力的证据, ELISA 仅在 1 例患儿的脑脊液中检测到抗广州管圆线虫抗体, 在另 1 例中不仅没检测到该抗体, 在其脑脊液中检测到了抗弓形虫抗体, 这可能是由于寄生虫的交叉反应导致的, 提示 ELISA 对婴儿该病的诊断不够准确。在两例患儿的脑脊液样本中, mNGS 均检测到丰富的与广州管圆线虫相对应的 DNA 序列, 显示出 mNGS 比传统的诊断方法更具特异性和敏感性, 更适合作为广州管圆线虫病的确诊手段[27]。

2.2. 微生物组学、宿主反应与 mNGS 的研究

mNGS 可以帮助微生物组学进行微生物多样性研究, 例如帮助揭示不同生态位的微生物群落组成。还可以通过基因组分析, 研究微生物的代谢能力、耐药性及其与宿主的相互作用。虽然目前对中枢神经系统感染性疾病病原体的报道较多, 但患者脑脊液和血液样本中的微生物组群方面的研究还有空缺。微生物组学分析为研究神经炎症性疾病的潜在感染因素提供了新工具, Steven 的研究中就强调了 mNGS 在检测脑和脊髓活检样本中的病原微生物, 包括细菌、病毒和真菌方面的潜力, 其能够提供更全面的微生物群落视角, 而不仅限于特定病原体的靶向检测[28]。Liao 等人利用 mNGS 研究了细菌性脑膜炎患儿血液和脑脊液微生物组的特征及其与炎症的潜在相关性, 发现确诊组与健康对照组、未确诊组的儿童相比, 确诊组患儿的血液和脑脊液中有不同种类的微生物群落, 用微生物组学来分析细菌多样性, 这可以提供关于患者的疾病是传染性还是非传染性的线索[1][29]。具有代表性的微生物区系不仅与宿主的代谢密切相关, 而且还与血液中 C 反应蛋白水平和脑脊液中粒细胞百分比相关, 反映了宿主的炎症状态, 在治疗方面, 经验性抗生素的针对性有待提高, 应根据微生物群的动态变化及时调整治疗策略[30]。且 mNGS 可直接从临床样本中检测耐药基因, 比传统培养及药敏试验更快速、准确, Tian 等人的病例报告中就提到了 mNGS 与 CSF 培养结果分别于 2 天后和 5 天后报告了鲍曼不动杆菌, 且 mNGS 检测的耐药基因与药敏试验表型基本一致, 这也提示了 mNGS 在检测耐药基因的优势[30]。

基于 DNA 的 mNGS 已被广泛用于检测临床病原体, 转录组测序(RNA-seq)还能够检测 RNA 病毒和其他病原体, 两者都可用于识别与疾病相关的可遗传单核苷酸多态性, 且 RNA-seq 还能够检测宿主基因表达水平的[31]。Ramchandar 等人利用 RNA-seq 对诊断为病毒性脑膜炎(N = 12)和细菌性脑膜炎(N = 11)的受试者进行了比较, 确定了 409 个差异表达基因(DEG), 细菌感染的患者的 IL-8、IL-1 和 TNF 的表达增加, 而病毒感染的患者的 CCL8 和 IFI6 的表达增加[4], 所以对宿主反应的研究可以在没有发现病原体前为鉴别诊断提供信息。

但仅仅依靠微生物组学或宿主反应的其中一种, 临幊上仍然很难区分感染性脑膜炎/脑炎与自身免疫性神经疾病, 两者分别只能提供部分依据, Kalantar 等人指出单靠临幊表现和检验指标, 如是否发热和白

细胞计数等无法区分病因, 而 mNGS 可以将微生物组学和宿主反应联系起来, 两者提供的互补信息可以很好的帮助临床医生诊断[31]。例如 Sweeny 等人开发的宿主和微生物的 mNGS 分类器可以高精度地区分下呼吸道感染和其他原因导致的呼吸衰竭[32]。在神经系统感染性疾病中, 也可以开发类似的宿主和微生物的 mNGS 分类器, 用于区分感染与非感染、不同病原体感染的脑炎或脑膜炎等。

3. mNGS 的结果判读

3.1. 阳性的意义

mNGS 的阳性结果除了大部分的真阳性以外还有被污染的假阳性结果, 污染主要来源于环境、实验室试剂和样本交叉污染[33]。为减少污染, 可采用严格的无菌操作, 使样本采集标准化, 使用无菌容器和低微生物负荷保存液, 避免皮肤接触, 如血液、脑脊液采集时严格消毒。划分清洁区(样本处理)、污染区(核酸提取)和扩增区(文库制备)避免交叉, 且使用超净工作台或生物安全柜处理低生物量样本。选择经过微生物 DNA 检测的试剂, 对每批次试剂进行阴性对照测试, 且每批次实验包括空白对照和环境对照, 通过对对照数据识别背景微生物并建立“污染数据库”。还可以减少扩增偏倚优化核酸提取方法, 使用单链 DNA 建库或靶向富集技术减少宿主 DNA 干扰。可以基于阴性对照数据扣除背景微生物, 以及手动去除常见污染物。Haston 等人在儿童脑炎患者的 mNGS 结果中发现了可以引起严重临床症状的 *Cladophialophora* sp., 患儿在没有抗真菌治疗的情况下缓解, 因此 *Cladophialophora* sp. 被判定为环境污染。同时他们还发现了烟草花叶病毒和人类博卡病毒, 烟草花叶病毒不感染人类, 在实验室中常见, 而人类博卡病毒通常是呼吸道疾病患者的共同感染病原体, 因此都被判定为污染病原体[6]。Chen 等人在 3 个非下呼吸道感染参试者支气管肺泡灌洗液的 mNGS 中也检测到了烟曲霉, 猜测可能是由于实验期间的污染或偶然定植所致[34]。所以临床医生在解释 mNGS 阳性结果时应谨慎, 可以通过 reads 丰度与覆盖度, 如真阳性, 往往有高 reads 数, 且均匀基因组覆盖, 而假阳性往往 reads 数较低且覆盖不均。临床医生可结合微生物生存能力, 以及与临床表现是否匹配, 病原体与患者症状、影像学、炎症标志物是否一致。还可以通过 PCR、培养或血清学检测验证等方法判断是否为真阳性。

3.2. 阴性的意义

阴性结果对于抗生素治疗决策和解除预防性隔离措施非常重要[35], 但阴性结果也许并不能完全排除感染性因素, 检出阈值的设定一直是争论的焦点, Xing 等人将 mNGS 检出的不同病原体的特异性序列与金标准进行对比, 得出了不同特异性序列下的总一致率, 由此筛选出最佳特异性序列阈值, 病毒性、结核性、细菌性、真菌性中枢神经系统感染对应的阈值分别是特异性序列 ≥ 2 、1、5 或 10、2, 但其样本量有限, 还需要更多研究来确定最佳阈值。

因为阈值设置不恰当而造成 mNGS 的假阴性结果屡见不鲜, 根据是否为常见致病病原体或常见背景微生物来设置不同阈值很有必要。Ramchandar 等人的研究招募了 70 名患儿, mNGS 检测出现了 5 例假阴性, 其中 2 例脑脊液培养检出金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌, 虽然 mNGS 报告阴性, 但其实均检测到这两种病原体, 不过都低于报告的阈值[4]。Wilson 等人发现, 试验中脑脊液 mNGS 遗漏的 6 种病原体其实都能被检测到, 但没有达到相应报告的阈值, 所以通过降低常见病原体的检出阈值来提高 mNGS 灵敏度值得被考虑。在 Kufner 等人研究的 105 例的大多数样本(52%)中, mNGS 和常规检测都对病毒都呈阴性, 但这并不能排除病毒感染, 因为采样可能是在病毒高峰期后, 而此时剩余的病毒载量可能低于 mNGS 的敏感性阈值[35], 而且 mNGS 对不同病毒类别和毒株的敏感性都不同[36], 针对不同种属的病毒来具体制定合理的检出阈值需要更多的样本量。

4. mNGS 的局限性及展望

mNGS 目前最大的挑战是人源背景微生物的干扰, 高宿主 DNA 占比的样本中, 微生物信号可能被掩盖, 需通过宿主 DNA 去除技术等提升灵敏度, 但仍可能漏检低载量病原体。且对儿童患者进行腰椎穿刺时, 由于患儿年龄的特性, 经常会出现穿刺伤引起血性脑脊液, 所以在一些研究中都将血性脑脊液作为排除标准[13]。Miller 等人[6]发现 8 个 mNGS 阴性病例中, 有 3 例经后续 PCR 检测呈阳性, 有两例高背景的样本, 因此可能被 mNGS 遗漏, 被认为是假阴性。

送检时间、周转时间和费用也都是 mNGS 目前存在的问题。Kufner 等人的研究中, 大部分患者在采集标本的当天就同时送检了传统检测与 mNGS, 因为临床医生认为这些病例很难诊断[35]。mNGS 虽然是国内临幊上考虑的一种检验病原体的方式, 但还没有被很普遍地应用, 一般是常规诊断阴性但临幊感染症状明显或者症状严重但找不到病因的时候才会送检 mNGS [37], 而这个时候经验性抗生素往往已经开始使用, 所以应在首次留取脑脊液时预先将 2~5 ml 脑脊液标本保存于-20℃冰箱[38], 或者在 4 天内进行腰穿获取脑脊液[12], 样本中的特异性序列就不会明显下降。Miao 等人研究中 mNGS 的周转时间为 32~36 小时, 远小于各种类型病原体培养所需时间, 所需费用为 3000 人民币, 高于任何一项传统病原学检查[39], 但近年来周转时间和费用都一直保持下降趋势。

在临幊上解释 mNGS 的结果具有挑战性, 需要 mNGS 实验室专家的协助, 同时缺乏金标准的确立[40], mNGS 和传统检测的比较由于各项临幊试验金标准的不同, 得到的结果可能不尽相同[35]。有少数病原体可能并不适合用 mNGS 检测, 在两项临幊研究中都无法检测到加利福尼亚病毒, 可能是感染后或免疫介导的现象引起的, 或者在取样时病原体不再存在于脑脊液中[4] [9]。

未来随着 mNGS 对各类病原体敏感性的提高和在医院内逐渐普及, 能在院内实现测序之后, 这些问题会得到妥善解决。总的来说, mNGS 对儿童中枢神经系统感染性疾病是很有用的, 可以在病情早期送检 mNGS, 有助于指导临床决策和抗生素使用, 减少患儿住院时间。特别是对于意外病原体和罕见病原体的诊断, mNGS 具有明显优势, 所以对于免疫缺陷的患儿和新生儿更建议送检 mNGS [13]。

参考文献

- [1] Chiu, C.Y. and Miller, S.A. (2019) Clinical Metagenomics. *Nature Reviews Genetics*, **20**, 341-355. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>
- [2] Schibler, M., Brito, F., Zanella, M., Zdobnov, E.M., Laubscher, F., L'Huillier, A.G., et al. (2019) Viral Sequences Detection by High-Throughput Sequencing in Cerebrospinal Fluid of Individuals with and without Central Nervous System Disease. *Genes*, **10**, Article 625. <https://doi.org/10.3390/genes10080625>
- [3] Feigin, V.L., Nichols, E., Alam, T., et al. (2019) Global, Regional, and National Burden of Neurological Disorders, 1990-2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, **18**, 459-480.
- [4] Ramchandar, N., Coufal, N.G., Warden, A.S., Briggs, B., Schwarz, T., Stinnett, R., et al. (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection and Transcriptomic Analysis in Pediatric Central Nervous System Infections. *Open Forum Infectious Diseases*, **8**, ofab104. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab104>
- [5] Messacar, K., Fischer, M., Dominguez, S.R., Tyler, K.L. and Abzug, M.J. (2018) Encephalitis in US Children. *Infectious Disease Clinics of North America*, **32**, 145-162. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.10.007>
- [6] Haston, J.C., Rostad, C.A., Jerris, R.C., Milla, S.S., McCracken, C., Pratt, C., et al. (2019) Prospective Cohort Study of Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Modality for Unexplained Encephalitis in Children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, **9**, 326-333. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz032>
- [7] 张建昭, 姜玉武. 儿童中枢神经系统感染治疗疗程与腰椎穿刺检查系列建议之一——病毒性脑(膜)炎治疗疗程与腰椎穿刺检查建议[J]. 中国实用儿科杂志, 2020, 35(1): 1-4.
- [8] Duan, H., Li, X., Mei, A., Li, P., Liu, Y., Li, X., et al. (2021) The Diagnostic Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Infectious Diseases. *BMC Infectious Diseases*, **21**, Article No. 62. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05746-5>
- [9] Erdem, G., Kaptan, I., Sharma, H., Kumar, A., Aylward, S.C., Kapoor, A., et al. (2020) Cerebrospinal Fluid Analysis

- for Viruses by Metagenomic Next-Generation Sequencing in Pediatric Encephalitis: Not Yet Ready for Prime Time? *Journal of Child Neurology*, **36**, 350-356. <https://doi.org/10.1177/0883073820972232>
- [10] Hong, N.T.T., Anh, N.T., Mai, N.T.H., Nghia, H.D.T., Nhu, L.N.T., Thanh, T.T., *et al.* (2020) Performance of Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Viral Meningoencephalitis in a Resource-Limited Setting. *Open Forum Infectious Diseases*, **7**, ofaa046. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa046>
- [11] Alamarat, Z. and Hasbun, R. (2020) Management of Acute Bacterial Meningitis in Children. *Infection and Drug Resistance*, **13**, 4077-4089. <https://doi.org/10.2147/IDR.S240162>
- [12] Zhang, Y., Cui, P., Zhang, H., Wu, H., Ye, M., Zhu, Y., *et al.* (2020) Clinical Application and Evaluation of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Suspected Adult Central Nervous System Infection. *Journal of Translational Medicine*, **18**, Article No. 99. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02360-6>
- [13] Ge, M., Gan, M., Yan, K., Xiao, F., Yang, L., Wu, B., *et al.* (2021) Combining Metagenomic Sequencing with Whole Exome Sequencing to Optimize Clinical Strategies in Neonates with a Suspected Central Nervous System Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article 671109. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671109>
- [14] Zhang, J., Wang, J., Gan, J., Luo, R. and Chen, X. (2022) The First Case of *Streptococcus intermedius* Brain Abscess with Hemophagocytic Histiocytosis. *BMC Infectious Diseases*, **22**, Article No. 627. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07600-2>
- [15] Zimmer, A.J., Burke, V.E. and Bloch, K.C. (2016) Central Nervous System Infections. In: Hayden, R.T., Wolk, D.M., Carroll, K.C. and Tang, Y.W., *Eds.*, *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host*, ASM Press, 629-651. <https://doi.org/10.1128/9781555819040.ch24>
- [16] Xing, X., Zhang, J., Ma, Y., He, M., Yao, G., Wang, W., *et al.* (2020) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Diagnosis of Infectious Encephalitis and Meningitis: A Large, Prospective Case Series of 213 Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, Article 88. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00088>
- [17] Wang, R., Luo, H., Xin, X., Qin, B. and Huang, W. (2022) Disseminated Cryptococcal Infection of the Lumbar Spine in an Immunocompetent Man. *Infection and Drug Resistance*, **15**, 4229-4234. <https://doi.org/10.2147/IDR.S359612>
- [18] Yan, L., Sun, W., Lu, Z. and Fan, L. (2020) Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in Cerebrospinal Fluid for Rapid Diagnosis of Tuberculosis Meningitis in HIV-Negative Population. *International Journal of Infectious Diseases*, **96**, 270-275. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.048>
- [19] Wang, S.N., Chen, Y.L., Wang, D.M., *et al.* (2019) The Feasibility of Metagenomic Next-Generation Sequencing to Identify Pathogens Causing Tuberculous Meningitis in Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Microbiology*, **10**, Article 1993.
- [20] Falchek, S. (2012) Encephalitis in the Pediatric Population. *Pediatrics in Review*, **33**, 122-133. <https://doi.org/10.1542/pir.33.3.122>
- [21] Glaser, C.A., Honarmand, S., Anderson, L.J., Schnurr, D.P., Forghani, B., Cossen, C.K., *et al.* (2006) Beyond Viruses: Clinical Profiles and Etiologies Associated with Encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, **43**, 1565-1577. <https://doi.org/10.1086/509330>
- [22] Yang, Y., Hu, X., Min, L., Dong, X. and Guan, Y. (2019) *Balamuthia mandrillaris*-Related Primary Amoebic Encephalitis in China Diagnosed by Next Generation Sequencing and a Review of the Literature. *Laboratory Medicine*, **51**, e20-e26. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmz079>
- [23] Greninger, A.L., Messacar, K., Dunnebacke, T., Naccache, S.N., Federman, S., Bouquet, J., *et al.* (2015) Clinical Metagenomic Identification of *Balamuthia mandrillaris* Encephalitis and Assembly of the Draft Genome: The Continuing Case for Reference Genome Sequencing. *Genome Medicine*, **7**, Article No. 113. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0235-2>
- [24] Wilson, M.R., O'Donovan, B.D., Gelfand, J.M., *et al.* (2018) Chronic Meningitis Investigated via Metagenomic Next-generation Sequencing. *JAMA Neurology*, **75**, 947-955.
- [25] Liu, Q., Wang, X., Xie, C., Ding, S., Yang, H., Guo, S., *et al.* (2020) A Novel Human Acute Encephalitis Caused by Pseudorabies Virus Variant Strain. *Clinical Infectious Diseases*, **73**, e3690-e3700. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa987>
- [26] Heegaard, E.D. and Brown, K.E. (2002) Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**, 485-505. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.485-505.2002>
- [27] Xie, M., Zhou, Z., Guo, S., Li, Z., Zhao, H. and Deng, J. (2019) Next-Generation Sequencing Specifies Angiostrongylus Eosinophilic Meningoencephalitis in Infants: Two Case Reports. *Medicine*, **98**, e16985. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000016985>
- [28] Salzberg, S.L., Breitwieser, F.P., Kumar, A., Hao, H., Burger, P., Rodriguez, F.J., *et al.* (2016) Next-Generation Sequencing in Neuropathologic Diagnosis of Infections of the Nervous System. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, **3**, e251. <https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000251>
- [29] Liao, H., Zhang, Y., Guo, W., Wang, X., Wang, H., Ye, H., *et al.* (2021) Characterization of the Blood and Cerebrospinal

- Fluid Microbiome in Children with Bacterial Meningitis and Its Potential Correlation with Inflammation. *mSystems*, **6**, e00049-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00049-21>
- [30] Tian, Y., Xia, H., Zhang, L. and Zhou, J. (2022) Detection of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* by Metagenomic Next-Generation Sequencing in Central Nervous System Infection after Neurosurgery: A Case Report. *Frontiers in Public Health*, **10**, Article 1028920. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1028920>
- [31] Kalantar, K.L. and Langelier, C.R. (2021) Host-Microbe Metagenomics: A Lens to Refocus Our Perspective on Infectious and Inflammatory Diseases. *mSystems*, **6**, e00404-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00404-21>
- [32] Sweeney, T.E., Wong, H.R. and Khatri, P. (2016) Robust Classification of Bacterial and Viral Infections via Integrated Host Gene Expression Diagnostics. *Science Translational Medicine*, **8**, 346ra91. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf7165>
- [33] Brown, J.R., Bharucha, T. and Breuer, J. (2018) Encephalitis Diagnosis Using Metagenomics: Application of Next Generation Sequencing for Undiagnosed Cases. *Journal of Infection*, **76**, 225-240. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.12.014>
- [34] Chen, H., Yin, Y., Gao, H., Guo, Y., Dong, Z., Wang, X., et al. (2020) Clinical Utility of In-House Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections and Analysis of the Host Immune Response. *Clinical Infectious Diseases*, **71**, S416-S426. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1516>
- [35] Kufner, V., Plate, A., Schmutz, S., Braun, D.L., Günthard, H.F., Capaul, R., et al. (2019) Two Years of Viral Metagenomics in a Tertiary Diagnostics Unit: Evaluation of the First 105 Cases. *Genes*, **10**, Article 661. <https://doi.org/10.3390/genes10090661>
- [36] Parras-Moltó, M., Rodríguez-Galet, A., Suárez-Rodríguez, P. and López-Bueno, A. (2018) Evaluation of Bias Induced by Viral Enrichment and Random Amplification Protocols in Metagenomic Surveys of Saliva DNA Viruses. *Microbiome*, **6**, Article No. 119. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0507-3>
- [37] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(6): 516-521.
- [38] 中华医学会神经病学分会感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 中枢神经系统感染性疾病的脑脊液宏基因组学第二代测序应用专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2021, 54(12): 1234-1240.
- [39] Miao, Q., Ma, Y., Wang, Q., Pan, J., Zhang, Y., Jin, W., et al. (2018) Microbiological Diagnostic Performance of Metagenomic Next-Generation Sequencing When Applied to Clinical Practice. *Clinical Infectious Diseases*, **67**, S231-S240. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy693>
- [40] Edward, P. and Handel, A.S. (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis: A Review of the Literature with a Focus on Pediatrics. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, **10**, S71-S77. <https://doi.org/10.1093/jpids/piab104>