

第二代测序技术在五例人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎诊断中的应用

金珂 王晓娟 关鸿志 秦灵芝 贾亚珍 周珂珂 马海畅 王月 王芳 邢丽 李玮

【摘要】 目的 评估脑脊液第二代测序技术在人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎诊断中的应用价值。方法 对 2018 年 1-9 月 5 例高度疑似人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎患者的临床特征、实验室和影像学表现进行回顾分析,并结合脑脊液第二代测序结果综合分析病原学来源。结果 临床表现为急性发病,以发热、头痛、颈项强直等为主要症状与体征,脑脊液白细胞计数 $(74 \sim 260) \times 10^6/L$;第二代测序共分离与鉴定病毒 1 属 3 种,检出人类疱疹病毒 I 型 1 例、III 型 3 例和 IV 型 1 例;人类疱疹病毒核酸序列数为 4~5406 条,将鉴定的读数映射到病毒基因组的覆盖度为 0.08%~81.01%。结论 脑脊液第二代测序技术可辅助人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎的诊断,并可对病毒进行准确分型,值得在临床推广应用。

【关键词】 脑炎,病毒性; 脑膜炎,病毒性; 疱疹病毒科感染; 脑脊髓液; 基因检测

Next-generation sequencing technology in the diagnosis of five patients with human herpesvirus encephalitis/meningitis

JIN Ke¹, WANG Xiao-juan¹, GUAN Hong-zhi², QIN Ling-zhi¹, JIA Ya-zhen¹, ZHOU Ke-ke¹, MA Hai-chang¹, WANG Yue¹, WANG Fang¹, XING Li³, LI Wei¹

¹Department of Neurology, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, He'nan, China

²Department of Neurology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

³Tianjin-Beijing Genomics Institute, Tianjin 300450, China

Corresponding author: LI Wei (Email: liwein@zzu.edu.cn)

【Abstract】 Objective To evaluate the value of next-generation sequencing (NGS) of cerebrospinal fluid (CSF) in the diagnosis of human herpesvirus encephalitis/meningitis. **Methods** The clinical features, laboratory and imaging findings of 5 patients with highly suspected human herpesvirus encephalitis/meningitis from January to September 2018 were retrospectively analyzed, and then the etiological sources were comprehensively analyzed combined with the results of NGS. **Results** All of the 5 patients had an acute onset, fever, headache and neck ankylosis. The CSF tests revealed a slight increased level of white blood cell count $(74 \sim 260) \times 10^6/L$. Among them, a total of 4-5406 nucleic acid sequences of human herpesvirus, including human herpesvirus type I ($n = 1$), human herpesvirus type III ($n = 3$) and human herpesvirus type IV ($n = 1$) were detected by NGS, with the coverage varying from 0.08% to 81.01%. **Conclusions** NGS of CSF can assist the diagnosis of human herpesvirus encephalitis/meningitis, as well as viruses accurate classification, which is worth popularizing and applying in clinic.

【Key words】 Encephalitis, viral; Meningitis, viral; Herpesviridae infections; Cerebrospinal fluid; Genetic testing

This study was supported by the Key Project of Medical Science and Technology in He'nan Province (No. 2018020427).

Conflicts of interest: none declared

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2020.07.014

基金项目:2018 年度河南省医学科技攻关计划联合共建项目(项目编号:2018020427)

作者单位:450003 郑州大学人民医院神经内科(金珂,王晓娟,秦灵芝,贾亚珍,周珂珂,马海畅,王月,王芳,李玮); 100730 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院神经内科(关鸿志);300450 天津华大基因科技有限公司医学检验所(邢丽)

通讯作者:李玮,Email:liwein@zzu.edu.cn

人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎是指由疱疹病毒原发感染或潜伏感染再激活后引起的严重的中枢神经系统感染性疾病,好发于老年人、儿童或免疫力低下人群,具有发病率高、病死率高的特点,临床主要表现为发热、头痛、呕吐、精神行为异常、癫痫发作、共济失调、颈项强直等,甚至可引起谵妄、昏迷、呼吸或循环衰竭^[1-2]。目前,病毒分离与聚合酶链反应(PCR)是诊断该病的“金标准”,但病毒分离与鉴定耗时长且检出率低,而PCR则受引物所能结合的核酸片段的限制,从而大大地限制了这两种实验方法的临床应用。而第二代测序技术(NGS)具有不受靶向引物限制、检测速度快、检出率高等特点,可以快捷并高效地辅助临床诊断,自2014年首次报道以来逐渐在临床脑脊液标本病原体检测中推广应用^[3]。笔者通过对5例人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎患者临床及脑脊液第二代测序结果的分析,拟评价该项技术在疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎诊断中的应用价值。

对象与方法

一、观察对象

1. 纳入标准 (1)临床特征符合脑膜炎或脑炎症状与体征(发热、头痛、精神状态改变、癫痫发作、颈项强直等)。(2)腰椎穿刺脑脊液检查白细胞计数 $>5 \times 10^6/L$ 。(3)影像学检查可见脑膜强化或脑实质异常改变。(4)脑脊液第二代测序检出人类疱疹病毒序列。(5)临床无其他微生物感染证据。(6)本研究经郑州大学人民医院伦理委员会批准[伦理批号:(2017)伦审第(35)号],并为北京市脑炎协作组脑脊液第二代测序合作研究项目子项目(伦理批号:JS-890),入组病例及其家属对研究内容知情并签署知情同意书。

2. 排除标准 (1)非感染性脑炎如自身免疫性脑炎(IE)、副肿瘤边缘性脑炎(PLE)、视神经脊髓炎谱系疾病(NMOSDs)、风湿免疫性疾病累及中枢神经系统。(2)近期(发病 <4 周)有疫苗接种史。(3)存在腰椎穿刺禁忌证或无法获取脑脊液。

3. 一般资料 选择2018年1-9月在我院神经内科住院并确诊的患者共5例,男性3例,女性2例;年龄17~72岁,平均为40.20岁。5例患者均急性发病,病程为6~13d,平均8d;发病季节分别为夏季(例1、例2)、秋季(例3、例5)和冬季(例4);既往病史包括肺腺癌脑转移(例1)、高血压(例2、例4);

症状与体征以发热、头痛、颈项强直(5例)为主,同时可伴有精神行为异常(例1)、左上面部疱疹(例2)、嗜睡或癫痫发作(例1、例2和例5),详见表1。

二、研究方法

1. 脑脊液第二代测序 (1)标本采集:对入组患者行腰椎穿刺获取1~2ml脑脊液,滴入试管(德国Sarstedt公司),于30min内置 $-80^{\circ}C$ 冰箱保存,用于第二代测序。(2)样本提取与质控:采用微量样本基因组DNA提取盒[DP316型,天根生化科技(北京)有限公司]提取脑脊液样本DNA,通过DNA切割超声破碎仪(Q800R2,美国Qsonica公司)破碎至200~300bp小片段,2100生物分析仪(美国Agilent公司)质控片段大小,定量PCR(美国Thermo Fisher公司)质控DNA文库浓度。(3)文库构建:在获得的DNA片段末端修复和加A后,在其两端添加接头序列,并将其环化形成单链环状DNA,滚环扩增技术将单链环状DNA增加2~3个数量集,获得DNA纳米球。(4)测序:将DNA纳米球加载至测序芯片上,使用BGISEQ-50测序平台(天津华大基因科技有限公司医学检验所)对DNA纳米球进行测序。

2. 数据分析与质量控制 测序数据下机后,剔除低质量、低复杂度、测序长度 <35 bp的读数,获得高质量的测序数据后与BWA人类基因组数据库(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)进行比对,然后剔除人类基因组序列信息的干扰,再将剩余数据与微生物数据库(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>)进行比对,达到对细菌、病毒、真菌及原生生物的初步鉴定。本研究是与北京协和医院脑炎协作组的合作项目,针对临床真阴性或脑脊液培养阳性的中枢神经系统感染患者进行研究,初步获得常见背景菌信息,例如痤疮丙酸杆菌、表皮葡萄球菌等,当微生物初步鉴定完成后,再次剔除常见背景菌,获得更为可靠的数据报告^[4]。主要观察指标为病毒种,以脑脊液第二代测序所检测到的病毒序列数 >1 为条件进行鉴定。

结 果

血清学检查,白细胞计数 $(6.08 \sim 13.94) \times 10^9/L$ [$(3.50 \sim 9.50) \times 10^9/L$],钠离子133~143mmol/L (137~147mmol/L),细菌培养均呈阴性。5例患者均于入院2周内行脑脊液检查,脑脊液外观清亮、透明,压力为195~310mmH₂O (1mmH₂O = 9.81×10^{-3} kPa, 80~180mmH₂O),白细胞计数为(74~

表 1 5 例人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎患者的一般资料

Table 1. General data of 5 patients with human herpesvirus encephalitis/meningitis

序号	性别	年龄(岁)	发病至入院时间(d)	发病至脑脊液获取时间(d)	症状与体征	合并症	并发症
1	女性	33	6	7	体温 38.2 ℃, 头痛, 精神行为异常, 嗜睡, 颈项强直, 癫痫发作	肺腺癌	无
2	女性	72	8	8	体温 39 ℃, 头痛, 嗜睡, 颈项强直, 癫痫发作, 左上面部疱疹	高血压	无
3	男性	29	7	7	体温 38.5 ℃, 头痛, 颈项强直	无	无
4	男性	50	6	6	体温 38 ℃, 头痛, 颈项强直	高血压	无
5	男性	17	13	14	体温 39 ℃, 头痛, 嗜睡, 颈项强直, 癫痫发作	无	无

表 2 5 例人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎患者的实验室检查结果

Table 2. Laboratory test results of 5 patients with human herpesvirus encephalitis/meningitis

序号	血液			脑脊液							
	白细胞计数($\times 10^9/L$)	钠离子(mmol/L)	细菌培养	压力(mm Hg)	白细胞计数($\times 10^6/L$)	单核细胞比例(%)	蛋白定量(mg/L)	葡萄糖(mmol/L)	氯化物(mmol/L)	细菌培养	自身免疫性抗体
1	9.42	134	-	195	75	88.00	680	3.23	118.90	-	-
2	7.90	133	-	240	75	85.30	640	2.67	117.80	-	-
3	7.80	143	-	220	187	94.10	970	2.24	117.80	-	-
4	6.08	138	-	310	260	97.00	1620	2.46	118.70	-	-
5	13.94	139	-	260	74	100.00	1190	3.17	125.00	-	-

-, negative, 阴性

260) $\times 10^6/L$ [(0 ~ 5) $\times 10^6/L$], 单核细胞比例为 85.30% ~ 100.00% (15% ~ 45%), 蛋白定量 640 ~ 1620 mg/L (150 ~ 460 mg/L), 葡萄糖水平为 2.24 ~ 3.23 mmol/L (2.50 ~ 4.50 mmol/L), 氯化物 117.80 ~ 125.00 mmol/L (120 ~ 132 mmol/L); 脑脊液细菌培养无阳性病例(表 2)。本组患者脑脊液新型隐球菌荚膜抗原、Xpert 耐药结核杆菌、抗酸-真菌-革兰染色和自身免疫性抗体检测均呈阴性。MRI 检查, 2 例呈现软脑膜强化(例 3、例 4); 3 例 T₂WI 和 FLAIR 成像表现为高信号影, 其中 1 例(例 1)定位于双侧额颞叶、1 例(例 2)定位于双侧额叶, 1 例(例 5)定位于侧脑室周边及双侧枕叶(图 1)。

以脑脊液第二代测序所检测到的病毒序列数 > 1 为条件, 共计分离与鉴定病毒 1 属 3 种, 1 例(例 1)检出人类疱疹病毒 I 型(HHV-1), 临床诊断为人类疱疹病毒 I 型脑炎; 3 例(例 2、例 3、例 4)检出人类疱疹病毒 III 型(HHV-3), 临床诊断为人类疱疹病毒 III 型脑炎和(或)脑膜炎; 1 例(例 5)检出人类疱疹病毒 IV 型(HHV-4), 临床诊断为人类疱疹病毒 IV 型脑炎。脑脊液第二代测序检出人类疱疹病毒核酸序列数为 4 ~ 5406 条, 平均为 2089.20 条, 将鉴定的读数映射至病毒基因组的覆盖度为 0.08% ~ 81.01%, 检测深度为 1.00 ~ 2.21(表 3)。同时, 还鉴定出细菌

5 属 12 种, 真菌 4 属 5 种, 未见原生生物(寄生虫等)。

本组 5 例患者均采取抗病毒治疗, 3 例(例 1、例 2、例 4)予更昔洛韦 30 mg/次(2 次/d)治疗, 2 例(例 3、例 5)予阿昔洛韦 15 mg/次(3 次/d)口服, 同时配合低剂量激素(甲泼尼龙 50 mg/d)静脉注射以减轻脑水肿, 以及对症支持治疗, 疗程 7 ~ 22 d。住院期间并发低钠血症者[2 例(例 1、例 2)]予高盐饮食; 高同型半胱氨酸血症(例 3)和双侧胸腔积液(例 5)者均未进行特殊治疗, 其中胸腔积液者在密切监测下液体自行吸收。经治疗后, 5 例患者头痛、发热、颈项强直等症状均消失, 血液及脑脊液常规、生化指标明显好转, 血常规白细胞计数(6.08 ~ 7.90) $\times 10^9/L$, 脑脊液白细胞计数(34 ~ 70) $\times 10^6/L$ 、蛋白定量 440 ~ 730 mg/L、葡萄糖 2.56 ~ 3.59 mmol/L、氯化物为 119.80 ~ 124.80 mmol/L。1 个月后随访, 5 例患者均无症状, 各项实验室指标恢复至正常值范围。

讨 论

人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎是人类中枢神经系统感染中最为常见的疾病之一, 大多由人类疱疹病毒颗粒在原发感染位点或内皮细胞、周围神经元、淋巴细胞、肾脏、分泌腺等位点潜伏或复制, 并通过血行传播、神经元回路扩散、医源性途径

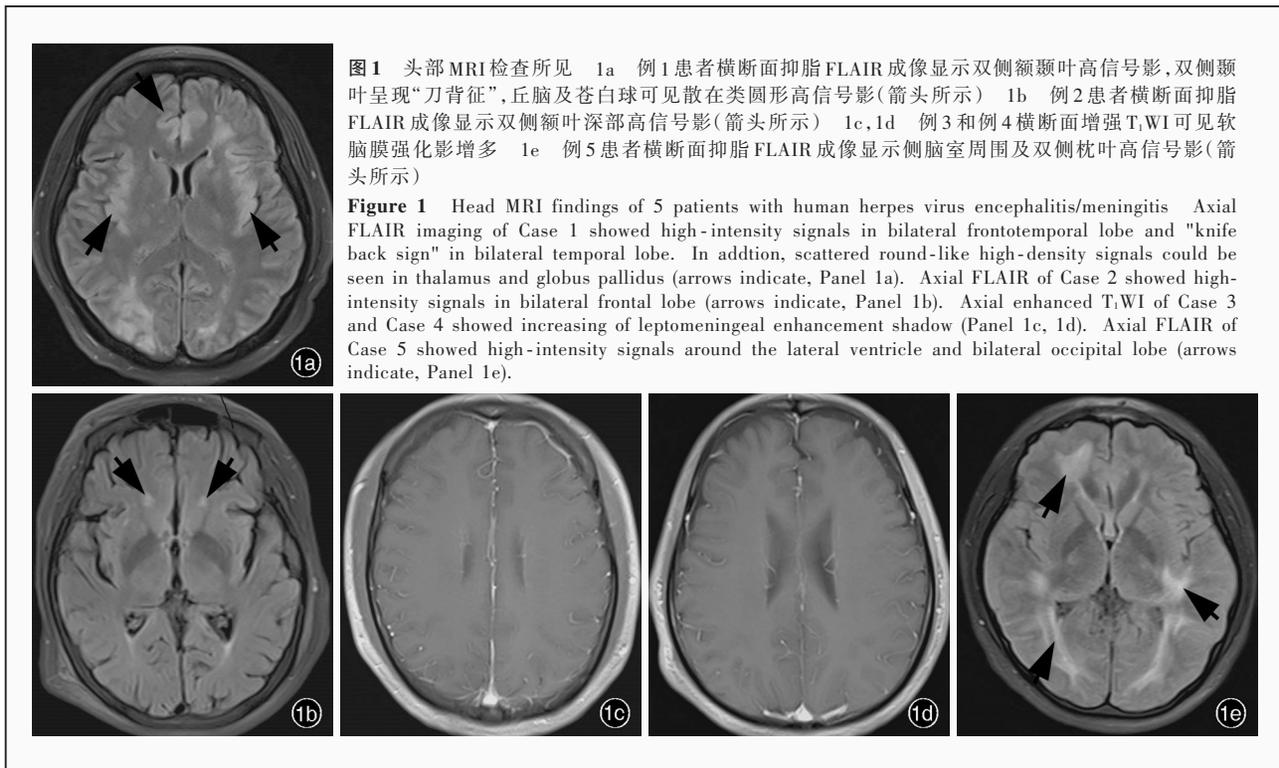


图1 头部MRI检查所见 1a 例1患者横断面抑脂FLAIR成像显示双侧额颞叶高信号影,双侧颞叶呈现“刀背征”,丘脑及苍白球可见散在类圆形高信号影(箭头所示) 1b 例2患者横断面抑脂FLAIR成像显示双侧额叶深部高信号影(箭头所示) 1c,1d 例3和例4横断面增强T₁WI可见软脑膜强化影增多 1e 例5患者横断面抑脂FLAIR成像显示侧脑室周围及双侧枕叶高信号影(箭头所示)

Figure 1 Head MRI findings of 5 patients with human herpes virus encephalitis/meningitis. Axial FLAIR imaging of Case 1 showed high-intensity signals in bilateral frontotemporal lobe and "knife back sign" in bilateral temporal lobe. In addition, scattered round-like high-density signals could be seen in thalamus and globus pallidus (arrows indicate, Panel 1a). Axial FLAIR of Case 2 showed high-intensity signals in bilateral frontal lobe (arrows indicate, Panel 1b). Axial enhanced T₁WI of Case 3 and Case 4 showed increasing of leptomeningeal enhancement shadow (Panel 1c, 1d). Axial FLAIR of Case 5 showed high-intensity signals around the lateral ventricle and bilateral occipital lobe (arrows indicate, Panel 1e).

或其他机制通过血脑屏障进入中枢神经系统,好发于老年人、儿童或免疫力低下的人群^[1-5-6]。临床发病急骤、症状重,缺乏特异性,确诊依赖实验室检查结果。但脑脊液样本有限,仅能满足部分检查需要,且实验室检查耗时耗力、病原确诊率低。脑脊液病毒分离与鉴定虽然被认为是诊断病毒性脑炎的“金标准”,但据文献报道仅有<5%的病例可以被成功鉴定^[7-10]。PCR技术虽然能够提高脑脊液病原学诊断阳性率,但单次检测范围受限,只能检测引物所能结合的病原体核酸片段,因此其临床应用难以推广。血清学诊断方面,病毒抗体检测于病毒感染后2~4周才能达到诊断阳性率的高峰,且检测容易出现假阳性结果。因此,为了进一步提高病原检出率,临床迫切需要一种新的技术方法^[11-13]。

2015年,中国医学科学院北京协和医院关鸿志教授对4例病毒性脑炎确诊患者的脑脊液标本进行第二代测序,2例检出人类疱疹病毒I型(测序深度分别为35、3.3,覆盖度分别为98%、53%)、1例检出人类疱疹病毒II型(HHV-2,测序深度为1.3,覆盖度为27%)、1例检出人类疱疹病毒III型(测序深度为1.1,覆盖度12%)^[14]。随后,Xing等^[10]应用脑脊液第二代测序技术确诊人类疱疹病毒I型脑炎6例,人类疱疹病毒II型脑炎1例,人类疱疹病毒III型脑炎3例。2019年,Wilson等^[15]报告一项大样本前瞻

性临床试验结果,在204例特发性脑膜炎、脑炎或脊髓炎住院患者中,脑脊液第二代测序共检出13例常规检查方法无法确诊的病例,其中8例在行脑脊液第二代测序之前并未被考虑为中枢神经系统感染。上述研究表明,脑脊液第二代测序在人类疱疹病毒病原学诊断中具有一定临床应用价值。

本组5例人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎患者的症状与体征均缺乏特异性,血清和脑脊液病原学检查结果,以及自身免疫性脑炎抗体检测均呈阴性,脑脊液白细胞计数为(74~260)×10⁶/L,以淋巴细胞为主,蛋白定量略升高,葡萄糖轻度降低或正常,影像学可见病灶多集中于额叶、颞叶、枕叶、软脑膜、侧脑室周围等部位,符合病毒性脑炎和(或)脑膜炎的临床特征,但与其他种类病毒如肠道病毒所致脑炎和(或)脑膜炎,以及自身免疫性脑炎难以鉴别。本研究通过脑脊液第二代测序分析,1例检出人类疱疹病毒I型、3例检出人类疱疹病毒III型以及1例检出人类疱疹病毒IV型;其中,人类疱疹病毒IV型是Epstein-Barr病毒,主要侵犯B淋巴细胞。本组5例患者的人类疱疹病毒核酸序列数为4~5406条,平均2089.20条,覆盖度为0.08%~81.01%,其中1例(例5)覆盖度较低(<1%),考虑可能与测序深度偏低有关,例如背景信息的干扰、脑脊液病毒载量较少,或者从发病至获取脑脊液样本时间过长

表 3 5 例人类疱疹病毒性脑炎和(或)脑膜炎患者第二代测序结果**Table 3.** NGS results of 5 patients with human herpesvirus encephalitis/meningitis

序号	NGS 病毒检出	核酸 序列数	覆盖率 (%)	测序 深度	临床诊断
1	人类疱疹病毒 I 型	1987	56.28	1.23	人类疱疹病毒 I 型脑炎
2	人类疱疹病毒 III 型	2529	20.52	1.12	人类疱疹病毒 III 型脑炎
3	人类疱疹病毒 III 型	526	28.07	1.20	人类疱疹病毒 III 型脑膜炎
4	人类疱疹病毒 III 型	5406	81.01	2.21	人类疱疹病毒 III 型脑膜炎
5	人类疱疹病毒 IV 型	4	0.08	1.00	人类疱疹病毒 IV 型脑炎

NGS, next-generation sequencing, 第二代测序技术

而致病毒核酸降解等。5 例患者经过抗病毒治疗后病情均明显改善,支持病毒性脑炎和(或)脑膜炎的诊断。

本研究样本量较小,而且测序深度偏低、基因覆盖度低,有待在今后的临床研究中扩大样本量,改进测序技术。脑脊液宏基因组第二代测序技术以其高通量、短片段测序优势,可加快测序速度,增加样本病原学阳性检出的可能,从而弥补了传统病原学检测阳性发现率较低的劣势,从而协助临床对病原的诊断,使更多患者获益。第二代测序技术不仅能够鉴定病毒种类,还可以提供病毒的相对载量、基因分型、耐药性等信息,但是目前缺乏行业判读标准,检测结果还需综合生物学家、生物信息学分析专家、临床医师的意见进行判读^[13,16-17]。第二代测序技术作为一种新型分子诊断技术,虽然存在缺陷和不足,但相信随着技术的发展和成熟,在未来作为常规应用于临床感染筛查,将会大大提高临床医师对感染患者诊断效率和准确性。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Meyding-Lamadé U, Strank C. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2012, 5:279-296.
- [2] Steiner I, Benninger F. Manifestations of herpes virus infections in the nervous system [J]. *Neurol Clin*, 2018, 36:725-738.
- [3] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, Salamat SM, Somasekar S, Federman S, Miller S, Sokolic R, Garabedian E, Candotti F, Buckley RH, Reed KD, Meyer TL, Serogy CM, Galloway R, Henderson SL, Germ JE, DeRisi JL, Chiu CY. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370:2408-2417.
- [4] Yao M, Zhou J, Zhu Y, Zhang Y, Lv X, Sun R, Shen A, Ren H, Cui L, Guan H, Wu H. Detection of listeria monocytogenes in CSF from three patients with meningoencephalitis by next-generation sequencing [J]. *J Clin Neurol*, 2016, 12:446-451.
- [5] Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2013, 13:414.
- [6] Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus infections in the nervous system [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13:379-393.
- [7] DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17:903-925.
- [8] Song YX, Li Y, Jiang YM, Liu T. Detection of varicella-zoster virus from cerebrospinal fluid using advanced fragment analysis in a child with encephalitis: a case report [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19:342.
- [9] Hsu CC, Tokarz R, Briese T, Tsai HC, Quan PL, Lipkin WI. Use of staged molecular analysis to determine causes of unexplained central nervous system infections [J]. *Emerging Infect Dis*, 2013, 19:1470-1477.
- [10] Xing XW, Zhang JT, Ma YB, Chen XY, Wu L, Wang XL, Wang HF, Wang RF, Yang F, Yu SY. Evaluation of next-generation sequencing for the diagnosis of infections of the central nervous system caused by the neurotropic herpes viruses: a pilot study [J]. *Eur Neurol*, 2018, 80:283-288.
- [11] Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28:313-335.
- [12] Nakayama H, Yamazaki R, Kato J, Koda Y, Sakurai M, Abe R, Watanuki S, Sumiya C, Shiroshita K, Fujita S, Yamaguchi K, Okamoto S, Mori T. Human herpesvirus 6 reactivation evaluated by digital polymerase chain reaction and its association with dynamics of CD134-positive T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *J Infect Dis*, 2019, 220:1001-1007.
- [13] Edridge AW, Deijs M, van Zeggeren IE, Kinsella CM, Jebbink MF, Bakker M, van de Beek D, Brouwer MC, van der Hoek L. Viral metagenomics on cerebrospinal fluid [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10:pii:E332.
- [14] Guan H, Shen A, Lv X, Yang X, Ren H, Zhao Y, Zhang Y, Gong Y, Ni P, Wu H, Zhu Y, Cui L. Detection of virus in CSF from the cases with meningoencephalitis by next-generation sequencing [J]. *J Neurovirol*, 2016, 22:240-245.
- [15] Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, Arevalo S, Yu G, Neuhaus J, Federman S, Stryke D, Briggs B, Langelier C, Berger A, Douglas V, Josephson SA, Chow FC, Fulton BD, DeRisi JL, Gelfand JM, Naccache SN, Bender J, Dien Bard J, Murkey J, Carlson M, Vespa PM, Vijayan T, Allyn PR, Campeau S, Humphries RM, Klausner JD, Ganzon CD, Memar F, Ocampo NA, Zimmermann LL, Cohen SH, Polage CR, DeBiasi RL, Haller B, Dallas R, Maron G, Hayden R, Messacar K, Dominguez SR, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380:2327-2340.
- [16] Parker J, Chen J. Application of next generation sequencing for the detection of human viral pathogens in clinical specimens [J]. *J Clin Virol*, 2017, 86:20-26.
- [17] Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology [J]. *J Clin Virol*, 2013, 58:346-350.

(收稿日期:2020-07-09)

(本文编辑:袁云)