

# 送检脑脊液病原宏基因组第二代测序技术 客观标准再探讨

刘磊 张景晓 狄晓萌 谢竹霄 王佳伟

**【摘要】** 目的 对比分析脑脊液病原宏基因组第二代测序技术(mNGS)、传统病原学检测与临床最终诊断中枢神经系统感染的符合程度,探讨脑脊液病原mNGS测序的送检标准。方法 2017年3月至2020年4月首都医科大学附属北京同仁医院对35例需排除中枢神经系统感染的患者送检脑脊液标本,同时行脑脊液病原mNGS测序和传统病原学检测,分别计算两种检测方法的灵敏度、特异度和Youden指数;绘制受试者工作特征(ROC)曲线并计算曲线下面积(AUC),比较两种检测方法的诊断效能。根据送检脑脊液病原mNGS测序的客观标准进行评分(满足1项计为1),计算不同评分下mNGS测序的阳性符合率。结果 35例患者中19例临床最终诊断为中枢神经系统感染。有18例脑脊液病原mNGS测序呈阳性,总阳性率为51.43%(18/35);有17例传统病原学检测呈阳性,总阳性率约48.57%(17/35)。临床最终诊断为中枢神经系统感染的患者中17例mNGS测序呈阳性,其诊断灵敏度为17/19、特异度为15/16,Youden指数为0.832;14例传统病原学检测呈阳性,其诊断灵敏度为14/19、特异度为13/16,Youden指数为0.612。ROC曲线显示,脑脊液病原mNGS测序的曲线下面积为0.916(95%CI:0.822~1.000, $P=0.000$ );传统病原学检测的曲线下面积为0.806(95%CI:0.674~0.938, $P=0.000$ );二者诊断效能差异无统计学意义( $Z=1.245$ , $P=0.213$ )。根据送检脑脊液病原mNGS测序的客观标准评分,mNGS测序的阳性符合率分别是0为0/4、1为0/2、2为1/8、3为3/4、4为4/6、5为3/4、6为6/7,随着评分的增加,mNGS测序阳性符合率呈升高趋势,其中评分 $\geq 3$ 组mNGS测序阳性符合率高于评分 $< 3$ 组(16/21对1/14;Fisher确切概率法: $P=0.000$ )。结论 脑脊液病原mNGS测序可以辅助明确诊断中枢神经系统感染,进一步按照基于临床和常规辅助检查的客观标准送检脑脊液可以提高mNGS测序的阳性符合率。

**【关键词】** 中枢神经系统感染; 脑脊髓液; 宏基因组; 序列分析,DNA; ROC曲线

## Discussion on objective inclusion criteria for sending cerebrospinal fluid pathogen metagenomic next-generation sequencing

LIU Lei<sup>1</sup>, ZHANG Jing-xiao<sup>1</sup>, DI Xiao-meng<sup>1</sup>, XIE Zhu-xiao<sup>1</sup>, WANG Jia-wei<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, <sup>2</sup>Medical Research Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Corresponding author: WANG Jia-wei (Email: wangjwcq@163.com)

**【Abstract】 Objective** By comparing consistency of cerebrospinal fluid (CSF) pathogen metagenomic next-generation sequencing (mNGS) results and final clinical diagnoses of central nervous system infection, we discuss the objective inclusion criteria for suspected central nervous system infection patients sending CSF pathogen mNGS. **Methods** From March 2017 to April 2020, Department of Neurology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University sent CSF of 35 patients for pathogen

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2021.05.004

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81771313);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81301029);北京市自然科学基金资助项目(项目编号:7192040);北京市医院管理局“青苗”计划专项经费资助项目(项目编号:QML20150206);北京市科技计划课题“首都特色”项目(项目编号:Z171100001017039);首都卫生发展科研专项项目(项目编号:首发2020-2-2056)

作者单位:100730 首都医科大学附属北京同仁医院神经内科(刘磊、张景晓、狄晓萌、谢竹霄、王佳伟),中心实验室(王佳伟)

通讯作者:王佳伟,Email:wangjwcq@163.com

mNGS and conventional pathogen testing to exclude central nervous system infection. Sensitivities, specificities and Youden's index of mNGS as well as conventional pathogen testing were calculated and compared. We also drew receiver operating characteristic (ROC) curves and calculated areas under the curve (AUC) to compared diagnostic efficacies of two methods. All patients were then scored according to objective inclusion criteria for sending samples (one score for one item). Positive coincidence rates of CSF pathogen mNGS and final clinical diagnoses of central nervous system infection of each score were also calculated. **Results** Nineteen of 35 patients enrolled were finally clinical diagnosed as central nervous system infection. Eighteen cases were positive by CSF pathogen mNGS, with positive rate 51.43% (18/35). Seventeen cases were positive by conventional pathogen testing with positive rate 48.57% (17/35). Seventeen cases of clinical diagnosed central nervous system infection were CSF pathogen mNGS positive, with diagnostic sensitivity 17/19, specificity 15/16 and Youden index 0.832. Fourteen cases of clinical diagnosed central nervous system infection were conventional pathogen testing positive, with diagnostic sensitivity 14/19, specificity 13/16 and Youden index 0.612. ROC curve showed the AUC of CSF pathogen mNGS was 0.916 (95%CI: 0.822-1.000,  $P = 0.000$ ), and AUC of conventional pathogen testing was 0.806 (95%CI: 0.674-0.938,  $P = 0.000$ ). There was no difference in diagnostic efficacies between CSF pathogen mNGS and conventional pathogen testing ( $Z = 1.245$ ,  $P = 0.213$ ). According to objective inclusion criteria for sending pathogen mNGS of CSF, the positive coincidence rates of mNGS were 0 score (0/4), 1 score (0/2), 2 scores (1/8), 3 scores (3/4), 4 scores (4/6), 5 scores (3/4), 6 scores (6/7). The positive coincidence rates of mNGS showed an overall trend of increase with scores, and notably cases  $\geq 3$  scores had higher positive coincidence rates than cases  $< 3$  scores (Fisher exact probability:  $P = 0.000$ ). **Conclusions** CSF pathogen mNGS can assist in accurate diagnosis of central nervous system infection. Sending CSF according to objective inclusion criteria based on clinical and routine auxiliary examination results can improve positive coincidence rate of pathogen mNGS.

**【Key words】** Central nervous system infections; Cerebrospinal fluid; Metagenome; Sequence analysis, DNA; ROC curve

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81771313), the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81301029), Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 7192040), Beijing Hospitals Authority Youth Program (No. QML20150206), Beijing Science and Technology Project Characteristics of the Capital Project (No. Z171100001017039), and Key Project of Capital Medical Development (No. 2020-2-2056).

**Conflicts of interest:** none declared

中枢神经系统感染是最严重的感染性疾病之一,具有病程进展迅速、病死率高等特点,主要包括感染性脑炎、脑膜炎、脑膜脑炎和脊髓炎,表现为精神行为异常、癫痫发作、头痛、发热、局灶性神经功能缺损,常见病原微生物为细菌、病毒、真菌、寄生虫等,若不及时对病原体进行针对性治疗,病情迅速加重,可出现癫痫持续状态、昏迷,甚至危及生命<sup>[1]</sup>。临床鉴别诊断中枢神经系统感染与自身免疫性脑炎、中枢神经系统血管炎、原发性或转移性脑肿瘤、代谢中毒性疾病困难,故病原学诊断至关重要。组织活检病理仍是确诊的“金标准”,但侵入性外科手术导致的并发症使得组织活检术的临床实际比例极低,故在缺乏病理学检查情况下,其诊断依赖脑脊液病原微生物的分离与培养<sup>[2]</sup>,但阳性率较低、耗时较长且存在一定比例的漏诊和误诊,无法为临床及时提供诊断与治疗信息<sup>[3]</sup>,迫切需要一种快速、敏感、可靠的病原学诊断方法。近年来,以不针对特

定病原微生物和高通量为特点的病原宏基因组第二代测序技术(mNGS)因检测速度快、覆盖病原微生物范围广、可为临床不典型病例提供诊断依据等优点,广泛应用于感染性疾病的诊断<sup>[4]</sup>。一方面,脑脊液病原mNGS测序在中枢神经系统感染性疾病中的诊断价值已获得越来越多的验证<sup>[5-8]</sup>;另一方面,临床有过分依赖mNGS测序和盲目送检脑脊液标本的趋势,造成不必要的浪费。鉴于此,我院对35例需排除中枢神经系统感染患者的脑脊液病原mNGS测序、传统病原学检测与临床最终诊断进行对比分析,再根据7条基于临床和常规辅助检查结果制定的脑脊液病原mNGS测序送检标准进行评分,探讨提高mNGS测序阳性符合率的脑脊液送检标准。

## 资料与方法

### 一、临床资料

#### 1. 纳入标准 (1)本研究送检脑脊液病原

mNGS 测序参照 2013 年国际脑炎联盟(IEC)共识<sup>[9]</sup>,符合以下 1 项及以上标准:①精神状态改变(定义为意识水平下降或改变、嗜睡或人格改变)持续时间  $\geq 24$  h。②癫痫发作,除外既往癫痫或者单纯热性惊厥。③发病前或发病后 72 h 内记录到体温  $\geq 38$  °C。④出现新的局灶性神经系统症状。⑤脑脊液白细胞计数  $\geq 5/\text{mm}^3$ 。⑥影像学显示的脑实质新发病灶提示脑炎。⑦脑电图异常提示脑炎。(2)即使不符合上述 7 项送检标准中任意一项,根据临床需要仍需送检脑脊液病原 mNGS 测序的患者。

2. 排除标准 (1)自身免疫性脑炎和神经系统副肿瘤综合征。(2)风湿免疫性疾病(包括系统性红斑狼疮、Behcet 综合征、血管炎等)继发累及中枢神经系统。(3)神经梅毒和获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。(4)临床资料不完整。

3. 一般资料 选择 2017 年 3 月至 2020 年 4 月由首都医科大学附属北京同仁医院神经内科送检的脑脊液标本共 35 份,其中,男性 24 例,女性 11 例;年龄 19~79 岁,中位年龄 52 岁。

## 二、研究方法

1. 脑脊液病原 mNGS 测序 (1)检测方法:所有患者均于入院 48 h 内完成首次腰椎穿刺抽取脑脊液 2 ml,送检深圳华大基因研究院、予果生物科技(北京)有限公司和北京金匙基因科技有限公司之一,行脑脊液病原 mNGS 测序。为减少不同公司检测技术对结果的影响,通过数据量进行序列数的均一化处理:mNGS 测序数据量为  $(15 \sim 20) \times 10^6$  条序列/样本,根据每例样本的实际总数据量将每个病原微生物的序列数进行均一化处理,计算公式为  $x$  条唯一比对序列数/百万条序列数,再与临床数据和信息对比分析。(2)检出病原微生物的致病性判断:①结合已发表文献与本组患者临床表现的一致性判断。②结合传统脑脊液病原学检测结果相互验证。③结合临床用药后症状改变和预后关联分析。

2. 传统病原学检测 所有患者均于入院 48 h 内完成首次腰椎穿刺抽取脑脊液 8~10 ml,行传统病原学检测,包括病原微生物培养、聚合酶链反应(PCR)、病原体抗体测定等。必要时完善血浆真菌 1-3- $\beta$ -D 葡聚糖动态定量检测(G 试验)/半乳甘露聚糖检测(GM 试验)和血清病原体抗体测定。

3. 中枢神经系统感染临床拟诊标准 参照 2013 年国际脑炎联盟共识<sup>[9]</sup>,临床拟诊脑炎应满足以下条件:(1)主要标准,精神状态改变(定义为意

识水平下降或改变、嗜睡或人格改变)持续时间  $\geq 24$  h,除外其他原因;癫痫发作,除外既往癫痫或单纯热性惊厥。(2)次要标准,符合以下 2 项标准诊断为脑炎可能,符合  $\geq 3$  项标准诊断为脑炎可能性大。

①发病前或者发病后 72 h 内记录到体温  $\geq 38$  °C。②出现新的局灶性神经系统症状。③脑脊液白细胞计数  $\geq 5/\text{mm}^3$ 。④影像学显示的脑实质新发病灶提示脑炎。⑤脑电图异常提示脑炎。参照欧洲各国[欧洲神经科学协会联盟(EFNS)、荷兰和英国]脑膜炎诊断标准<sup>[10-12]</sup>,临床拟诊为脑膜炎应符合以下  $\geq 2$  项标准,(1)头痛。(2)发热(发病前或发病后 72 h 内记录到体温  $\geq 38$  °C)。(3)颈项强直。(4)意识水平下降[Glasgow 昏迷量表(GCS)评分  $< 14$ ],且腰椎穿刺脑脊液白细胞计数  $\geq 5/\text{mm}^3$ 。

4. 临床最终诊断 为出院诊断或死亡诊断,结合临床拟诊、脑脊液病原 mNGS 测序、传统病原学检测和辅助检查(包括腰椎穿刺脑脊液常规检测、头部影像学检查和脑电图检查等)结果综合判断。

5. 统计分析方法 本研究所有数据均采用 R version 3.5.3 软件进行处理与分析。计数资料以相对数构成比(%)或率(%)表示,采用 Fisher 确切概率法。以临床最终诊断为参照,分别计算脑脊液病原 mNGS 测序和传统病原学检测的灵敏度和特异度、假阳性率和假阴性率、准确度、Youden 指数;绘制受试者工作特征(ROC)曲线并计算曲线下面积(AUC),采用 Delong 检验比较脑脊液病原 mNGS 测序与传统脑脊液病原学检测的诊断效能。根据送检脑脊液病原 mNGS 测序的客观标准进行评分(满足 1 条计 1 分),计算不同评分下 mNGS 测序的阳性符合率。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

本组 35 例患者中 19 例临床最终诊断为中枢神经系统感染,详见表 1。其中精神状态改变  $> 24$  h 者 13 例(13/19),主要表现为嗜睡、意识障碍、性格改变等;伴癫痫发作 4 例(4/19);发病前或发病后 72 h 内记录到体温  $\geq 38$  °C 者 12 例(12/19);出现新的局灶性神经系统症状 16 例(16/19);MRI 显示颅内病灶为 14 例(14/19),仅累及脑干 1 例、额叶 2 例、枕叶 2 例、颞叶 1 例,以及多发病灶(同时累及多个脑叶、丘脑、基底节区、小脑、脑膜等)8 例;脑脊液白细胞计数  $\geq 5/\text{mm}^3$  者 14 例(14/19);14 例完善脑电图检查,异常 10 例(10/14)。16 例患者不符合中枢神经系统感染

表1 19例临床最终诊断为中枢神经系统感染患者的临床资料

Table 1. Clinical information of 19 patients clinically final diagnosed as central nervous system infection

序号	性别	年龄(岁)	临床诊断	临床表现和常规辅助检查结果							符合条目数	脑脊液病原mNGS测序	传统病原学检测	抗感染治疗效果	
				标准①	标准②	标准③	标准④	标准⑤	标准⑥	标准⑦					
1	女性	53	细菌性脑膜炎, 神经型布鲁菌病	无	无	无	有	有	无	无	2	-	虎红平板凝集试验(+), 脑脊液涂片(+)	有效	
2	男性	52	李斯特菌脑膜炎	有	有	有	有	有	有	无	6	单核细胞增生李斯特菌	-	有效	
3	男性	31	脑囊虫病	无	无	无	有	有	有	未检测	3	囊虫	血清和脑脊液囊虫抗体(+)	有效	
4	女性	52	真菌性脑脓肿	有	无	有	有	无	有	无	4	烟曲霉菌	血清G试验(+), 血清和脑脊液GM试验(+)	死亡	
5	男性	64	病毒性脑炎, 眼内炎	有	无	有	有	有	有	有	6	HSV-4	HSV-4 PCR反应(+)	有效	
6	女性	27	伪狂犬病毒脑炎	有	有	有	无	有	有	有	6	伪狂犬病毒1型	-	死亡	
7	女性	49	脑脓肿	无	无	有	有	无	有	有	4	中间链球菌	脑组织活检细菌涂片革兰阳性球菌	有效	
8	男性	42	病毒性脑炎, 眼内炎	无	无	有	无	有	有	有	4	HSV-1	血清HSV-1-IgM(+), HSV-1 PCR反应(+)	有效	
9	男性	52	带状疱疹病毒性脑膜炎(面部皮损)	无	无	有	有	无	有	未检测	3	-	血清和脑脊液VZV-IgM(+)	有效	
10	男性	19	病毒性脑炎	有	无	有	有	无	无	有	4	HSV-5	脑脊液HSV-5-IgM(+)	有效	
11	男性	64	奴卡菌脑脓肿, 肺脓肿	有	无	无	有	无	有	未检测	3	鼻疽诺卡菌	肺泡灌洗液培养鼻疽诺卡菌(+)	死亡	
12	男性	54	化脓性脑膜炎	有	无	有	有	有	无	有	5	肺炎链球菌	脑脊液肺炎链球菌抗体(+)	有效	
13	女性	28	单纯疱疹病毒性脑炎	有	有	有	有	有	有	未检测	6	HSV-1	脑脊液HSV-1 PCR反应(+)	有效	
14	女性	60	带状疱疹病毒性脑干脑炎(面部皮损)	无	无	无	有	有	有	有	未检测	3	HSV-3	-	有效
15	男性	32	单纯疱疹病毒性脑炎	有	无	有	有	有	有	有	6	HSV-1	-	有效	
16	男性	56	细菌性脑膜炎, 肝脓肿	有	无	无	有	有	有	有	5	肺炎克雷伯菌	脑脊液培养肺炎克雷伯菌(+)	有效	
17	男性	57	新型隐球菌脑膜炎	有	有	无	有	有	无	有	5	新型隐球菌	脑脊液涂片新型隐球菌(+)	有效	
18	男性	50	单核细胞增生李斯特菌脑膜炎	有	无	无	无	有	无	无	2	单核细胞增生李斯特菌	-	有效	
19	男性	68	单核细胞增生李斯特菌脑干脑炎	有	无	有	有	有	有	有	6	单核细胞增生李斯特菌	脑脊液培养单核细胞增生李斯特菌(+)	有效	

+, positive, 阳性; -, negative, 阴性。mNGS, metagenomic next-generation sequencing, 宏基因组第二代测序技术; HSV, herpes simplex virus, 单纯疱疹病毒; PCR, polymerase chain reaction, 聚合酶链反应; VZV, varicella-zoster virus, 水痘-带状疱疹病毒

的诊断,分别为海绵窦非特异性炎症4例、视神经脊髓炎谱系疾病3例、特发性视神经炎3例、多发性硬化1例、其他5例。

本组有18例脑脊液病原mNGS测序呈阳性,总阳性率为51.43%(18/35)。临床最终诊断为中枢神经系统感染的患者中17例mNGS测序呈阳性,其诊断灵敏度为17/19、特异度为15/16, Youden指数为0.832, 准确度为91.43%(表2)。其中,有8例病原体为细菌,分别为单核细胞增生李斯特菌3例、链球菌2例、鼻疽诺卡菌1例、肺炎克雷伯菌1例、新型隐球菌1例;有7例患者病原体为病毒,其分别为人类疱疹病毒1型(HSV-1)3例, HSV-3、HSV-4和HSV-5各1例, 伪狂犬病毒1型1例;1例病原体为真菌(烟曲

霉菌);余1例病原体为寄生虫(囊虫)。非中枢神经系统感染患者中1例mNGS测序呈阳性,其诊断假阳性率为1/16、假阴性率为2/19(表2), mNGS测序检出代尔夫特食酸菌、HSV-1和HSV-4、人类腺病毒B1型、近平滑假丝酵母菌、汉氏德巴利氏酵母、扩展青霉菌、烟曲霉菌、人隐孢子虫,但传统脑脊液病原检测均呈阴性,临床表现为双眼视力下降和眼动受限,辅助检查结果亦未提示感染,最终诊断为多组脑神经麻痹,予以甲泼尼龙治疗后脑神经麻痹症状好转并痊愈,进一步证实mNGS测序结果为假阳性结果。

本组有17例传统病原学检测(包括脑脊液病原微生物培养和PCR反应、血浆G试验/GM试验、脑脊



**表 2** 脑脊液病原 mNGS 测序、传统病原学检测与临床最终诊断的比较(例)**Table 2.** Comparison of CSF pathogen mNGS, conventional pathogen test and clinical final diagnosis (case)

临床最终诊断	脑脊液病原 mNGS 测序			传统病原学检测		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
符合	17	2	19	14	5	19
不符合	1	15	16	3	13	16
合计	18	17	35	17	18	35

脑脊液病原 mNGS 测序的诊断灵敏度为 17/19, 特异度为 15/16, 假阳性率为 1/16, 假阴性率为 2/19, 准确度  $91.43\% = (17 + 15) / 35 \times 100\%$ ; 传统病原学检测的诊断灵敏度为 14/19, 特异度为 13/16, 假阳性率为 3/16, 假阴性率为 5/19, 准确度为  $77.14\% = (14 + 13) / 35 \times 100\%$ 。mNGS, metagenomic next-generation sequencing, 宏基因组第二代测序技术

液和血清病原体抗体测定)呈阳性,总阳性率约 48.57%(17/35)。临床最终诊断为中枢神经系统感染的患者中 14 例传统病原学检测呈阳性,其诊断灵敏度为 14/19、特异度为 13/16, Youden 指数为 0.612, 准确度为 77.14%(表 2)。其中,7 例病原体为细菌,分别为链球菌 2 例、鼻疽诺卡菌 1 例、布鲁杆菌 1 例、肺炎克雷伯菌 1 例、新型隐球菌 1 例、单核细胞增生李斯特菌 1 例;有 5 例病原体为病毒,分别为 HSV-1 2 例, HSV-2、HSV-4 和 HSV-5 各 1 例;1 例病原体为真菌(烟曲霉菌);1 例病原体为寄生虫(囊虫)。非中枢神经系统感染患者中 3 例传统病原学检测呈阳性,其诊断假阳性率为 3/16、假阴性率为 5/19(表 2)。

进一步绘制 ROC 曲线,脑脊液病原 mNGS 测序的曲线下面积为 0.916(95%CI: 0.822 ~ 1.000,  $P = 0.000$ );传统病原学检测的曲线下面积为 0.806(95%CI: 0.674 ~ 0.938,  $P = 0.000$ )(图 1);二者诊断效能差异无统计学意义( $Z = 1.245, P = 0.213$ )。

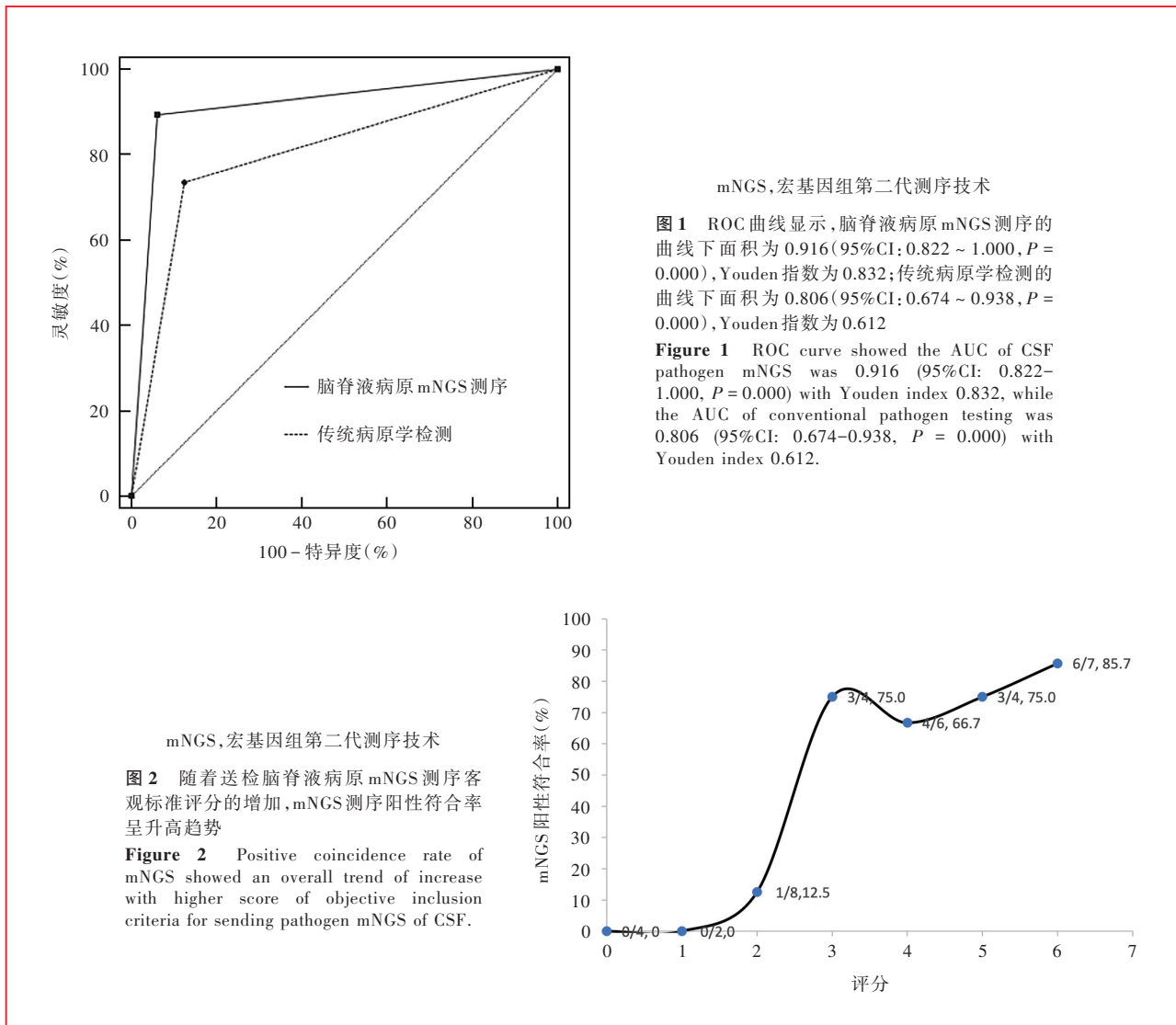
本研究 35 例患者根据送检脑脊液病原 mNGS 测序的客观标准进行评分,其中,0 为 4 例,1 为 2 例,2 为 8 例,3 为 4 例,4 为 6 例,5 为 4 例,6 为 7 例;17 例经脑脊液病原 mNGS 测序阳性证实诊断的患者,2 为 1 例,3 为 3 例,4 为 4 例,5 为 3 例,6 为 6 例。计算不同评分下 mNGS 测序阳性符合率并绘制曲线,可见随着评分的增加, mNGS 测序阳性符合率呈升高趋势(图 2),其中评分  $\geq 3$  组 mNGS 测序阳性符合率高于评分  $< 3$  组且差异有统计学意义(16/21 对 1/14; Fisher 确切概率法:  $P = 0.000$ )。

## 讨 论

mNGS 测序可以对病原微生物进行高通量筛查

以发现未知感染,对疾病诊断与治疗方案的制定具有重要意义,且相较于传统病原学检测,可以更快获得检测结果,为患者获得更良好预后争取机会。mNGS 测序作为感染性疾病的诊断方法,可高敏感性检出多部位感染,包括神经系统<sup>[1,13-14]</sup>、血液<sup>[15]</sup>、呼吸道<sup>[16]</sup>、胃肠道<sup>[17]</sup>、泌尿系统<sup>[18]</sup>和眼部<sup>[19]</sup>等,还可以对细菌、病毒、真菌和寄生虫等各类广泛病原体进行筛查<sup>[20]</sup>,该项技术在中枢神经系统感染性疾病中也发挥重要作用。既往不乏脑脊液病原 mNGS 测序明确诊断罕见或临床症状不典型的中枢神经系统感染的报道,如伪狂犬病毒致脑炎<sup>[21]</sup>、人类细小病毒 B19 相关病毒性脑炎<sup>[22]</sup>、中间型链球菌致脑脓肿<sup>[23]</sup>、广州管圆线虫致脑炎<sup>[24]</sup>等。

脑脊液病原 mNGS 测序的高敏感性和特异性业已得到广泛证实。Xing 等<sup>[25]</sup>的前瞻性研究评价脑脊液病原 mNGS 测序在脑炎和脑膜炎中的诊断效能,并首次根据其检出的序列数绘制 ROC 曲线再计算各序列数的曲线下面积以确定 mNGS 测序的阳性阈值,结果显示,脑脊液病原 mNGS 测序可以有效识别中枢神经系统感染病原体,检出序列数  $\geq 5$  或 10 时,细菌性脑膜炎的诊断效能最佳(曲线下面积为 0.846, 95%CI: 0.711 ~ 0.981);检出序列数  $\geq 2$  时,隐球菌性脑膜炎和脑曲霉病的灵敏度分别为 76.92% 和 80%。Yan 等<sup>[8]</sup>对结核性脑膜炎患者同时行脑脊液抗酸杆菌培养、结核分枝杆菌培养、实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)、结核分枝杆菌及利福平快速耐药检测(Xpert MTB/RIF)、mNGS 测序,以临床最终诊断为参照,脑脊液病原 mNGS 测序的诊断灵敏度(84.4%)高于抗酸杆菌培养(0,  $P = 0.000$ )、结核分枝杆菌培养(22.2%,  $P = 0.000$ )、实时 FQ-PCR 反应(24.4%,  $P = 0.000$ )和 Xpert MTB/RIF 检测(40%,  $P = 0.000$ );进一步绘制 ROC 曲线,发现脑脊液蛋白定量和白细胞计数与 mNGS 测序阳性率呈正相关关系,即蛋白定量越高、白细胞计数越高, mNGS 阳性检出率越高。Zhang 等<sup>[6]</sup>的研究纳入疑似中枢神经系统感染患者,对比分析脑脊液病原 mNGS 测序与传统病原学检测(包括脑脊液常规和生化,细菌、真菌和结核分枝杆菌培养和涂片,自身免疫抗体和乳胶凝集试验,以及血清病原体抗体测定,组织活检术,核酸扩增试验等)的诊断效能,发现 mNGS 测序在中枢神经系统感染中表现出令人满意的诊断效能,其阳性检出率高于传统病原学检测。本研究脑脊液病原 mNGS 测序对中枢神经系统感染的诊断灵



灵敏度为17/19、特异度15/16,假阳性率为1/16、假阴性率2/19,准确度为91.43%,与既往文献报道的该项技术特异性高于敏感性相符<sup>[25]</sup>。进一步绘制ROC曲线,脑脊液病原mNGS测序的曲线下面积为0.916、传统病原学检测为0.806,尽管二者诊断效能差异无统计学意义,但值得指出的是,mNGS测序较细菌培养等传统病原学检测方法节约了大量时间。

近年来,mNGS测序技术迅速发展,已成为感染性疾病的重要诊断方法,高通量特点使其具有独特优势,但局限性也同样来自高通量,深度测序检出的微生物可能来自无致病性的正常菌群,目前对此类背景微生物的界定暂无统一标准,测序结果的判读尚待进一步规范统一;此外,疾病早期药物治疗也可能影响结果判读,因此,mNGS测序技术的应用应紧密结合临床实际。

本研究还分析mNGS测序阳性符合率与送检脑脊液病原mNGS测序客观标准评分的关系,结果显示,随着评分的增加,mNGS测序阳性符合率总体呈升高趋势。本组19例临床最终诊断中枢神经系统感染的患者中仅2例mNGS测序结果未能提示感染来源,评分分别为2和3;再以评分3为分界点,评分 $\geq 3$ 组mNGS测序阳性符合率高于评分 $< 3$ 组。基于上述结果,笔者研究团队提出了脑脊液病原mNGS测序的送检标准为:(1)精神状态改变(定义为意识水平下降或改变、嗜睡或人格改变)的持续时间 $\geq 24$ 小时。(2)癫痫发作,除外既往癫痫或者单纯热性惊厥。(3)发病前或发病后72小时内记录到体温 $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。(4)出现新的局灶性神经系统症状。(5)脑脊液白细胞计数 $\geq 5/\text{mm}^3$ 。(6)影像学显示的脑实质新发病灶提示脑炎。(7)脑电图异常提示脑炎。

每项标准赋值为 1, 评分  $\geq 3$  可考虑行脑脊液病原 mNGS 测序。送检前应尽可能排除其他疾病, 主要是自身免疫性脑炎。

本研究还出现评分为 3 患者 mNGS 测序阳性符合率高于评分为 4 患者 (3/4 对 4/6) 的反常现象, 考虑可能是由于本研究数据来自单中心且样本量相对较小所致; 此外, 尽管本研究的纳入标准主要参照 2013 年国际脑炎联盟共识<sup>[9]</sup>, 但未参照该共识采取分层设置, 也未重新分配各项权重, 尚待在未来的多中心研究中进一步扩大样本量、确定各项送检标准的权重。同时也提醒广大临床医师应尽可能同步送检或留取脑脊液行病原 mNGS 测序和传统病原学检测, 最终做到脑脊液 mNGS 测序送检有的放矢、结果有据可依, 以为中枢神经系统感染性疾病的精准诊断与治疗提供更加有力的保障。

利益冲突 无

#### 参 考 文 献

- [1] Wilson MR, O'Donovan BD, Gelfand JM, Sample HA, Chow FC, Betjemann JP, Shah MP, Richie MB, Gorman MP, Hajj-Ali RA, Calabrese LH, Zorn KC, Chow ED, Greenlee JE, Blum JH, Green G, Khan LM, Banerji D, Langelier C, Bryson-Cahn C, Harrington W, Lingappa JR, Shanbhag NM, Green AJ, Brew BJ, Soldatos A, Strnad L, Doernberg SB, Jay CA, Douglas V, Josephson SA, DeRisi JL. Chronic meningitis investigated via metagenomic next-generation sequencing [J]. *JAMA Neurol*, 2018, 75:947-955.
- [2] Wang JW, Song ZH. Clinical application of cerebrospinal fluid testing in central nervous system infectious diseases [J]. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2013, 13:87-91. [王佳伟, 宋兆慧. 中枢神经系统感染性疾病脑脊液检查的临床应用[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2013, 13:87-91.]
- [3] Khatib U, van de Beek D, Lees JA, Brouwer MC. Adults with suspected central nervous system infection: a prospective study of diagnostic accuracy [J]. *J Infect*, 2017, 74:1-9.
- [4] Mulcahy - O'Grady H, Workentine ML. The challenge and potential of metagenomics in the clinic [J]. *Front Immunol*, 2016, 7:29.
- [5] 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.
- [6] Zhang Y, Cui P, Zhang HC, Wu HL, Ye MZ, Zhu YM, Ai JW, Zhang WH. Clinical application and evaluation of metagenomic next-generation sequencing in suspected adult central nervous system infection [J]. *J Transl Med*, 2020, 18:199.
- [7] Hasan MR, Sundararaju S, Tang P, Tsui KM, Lopez AP, Janahi M, Tan R, Tilley P. A metagenomics-based diagnostic approach for central nervous system infections in hospital acute care setting [J]. *Sci Rep*, 2020, 10:11194.
- [8] Yan L, Sun W, Lu Z, Fan L. Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of Tuberculosis meningitis in HIV-negative population [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 96:270-275.
- [9] Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Luring AS, Sejvar J, Bitnun A, Stahl JP, Mailles A, Drebrot M, Rupprecht CE, Yoder J, Cope JR, Wilson MR, Whitley RJ, Sullivan J, Granerod J, Jones C, Eastwood K, Ward KN, Durrheim DN, Solbrig MV, Guo-Dong L, Glaser CA; International Encephalitis Consortium. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57:1114-1128.
- [10] van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351:1849-1859.
- [11] Chaudhuri A, Martinez-Martin P, Kennedy PG, Andrew Seaton R, Portegies P, Bojar M, Steiner I; EFNS Task Force. EFNS guideline on the management of community-acquired bacterial meningitis: report of an EFNS Task Force on acute bacterial meningitis in older children and adults [J]. *Eur J Neurol*, 2008, 15:649-659.
- [12] McGill F, Heyderman RS, Michael BD, Defres S, Beeching NJ, Borrow R, Glennie L, Gaillemain O, Wyncoll D, Kaczmarek E, Nadel S, Thwaites G, Cohen J, Davies NW, Miller A, Rhodes A, Read RC, Solomon T. The UK joint specialist societies guideline on the diagnosis and management of acute meningitis and meningococcal sepsis in immunocompetent adults [J]. *J Infect*, 2016, 72:405-438.
- [13] Salzberg SL, Breitwieser FP, Kumar A, Hao H, Burger P, Rodriguez FJ, Lim M, Quiñones - Hinojosa A, Gallia GL, Tornheim JA, Melia MT, Sears CL, Pardo CA. Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3:e251.
- [14] Simner PJ, Miller HB, Breitwieser FP, Pinilla Monsalve G, Pardo CA, Salzberg SL, Sears CL, Thomas DL, Eberhart CG, Carroll KC. Development and optimization of metagenomic next-generation sequencing methods for cerebrospinal fluid diagnostics [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56:e00472-18.
- [15] Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, Blair L, Lindner MS, Vilfan ID, Kawli T, Christians FC, Venkatasubrahmanyam S, Wall GD, Cheung A, Rogers ZN, Meshulam-Simon G, Huijse L, Balakrishnan S, Quinn JV, Hollemon D, Hong DK, Vaughn ML, Kertesz M, Bercovici S, Wilber JC, Yang S. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4:663-674.
- [16] Pendleton KM, Erb - Downward JR, Bao Y, Branton WR, Falkowski NR, Newton DW, Huffnagle GB, Dickson RP. Rapid pathogen identification in bacterial pneumonia using real-time metagenomics [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196:1610-1612.
- [17] Zhou Y, Wylie KM, El Feghaly RE, Mihindukulasuriya KA, Elward A, Haslam DB, Storch GA, Weinstock GM. Metagenomic approach for identification of the pathogens associated with diarrhea in stool specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54:368-375.
- [18] Burnham P, Dadhania D, Heyang M, Chen F, Westblade LF, Suthanthiran M, Lee JR, De Vlaminck I. Urinary cell-free DNA is a versatile analyte for monitoring infections of the urinary

- tract[J]. Nat Commun, 2018, 9:2412.
- [19] Li Z, Breitwieser FP, Lu J, Jun AS, Asnaghi L, Salzberg SL, Eberhart CG. Identifying corneal infections in formalin-fixed specimens using next generation sequencing [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59:280-288.
- [20] Mitchell SL, Simmer PJ. Next-generation sequencing in clinical microbiology: are we there yet[J]? Clin Lab Med, 2019, 39:405-418.
- [21] Liu Q, Wang X, Xie C, Ding S, Yang H, Guo S, Li J, Qin L, Ban F, Wang D, Wang C, Feng L, Ma H, Wu B, Zhang L, Dong C, Xing L, Zhang J, Chen H, Yan R, Wang X, Li W. A novel human acute encephalitis caused by pseudorabies virus variant strain[J]. Clin Infect Dis, 2020.[Epub ahead of print]
- [22] Cao J, Zhu XQ. Acute viral encephalitis associated with human parvovirus B19 infection: unexpectedly diagnosed by metagenomic next-generation sequencing [J]. J Neurovirol, 2020, 26:980-983.
- [23] Gao LY, Xu GR, Dai TJ. Precision diagnosis and therapy of a case of brain abscesses associated with asymptomatic pulmonary arteriovenous fistulas[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20:370.
- [24] Feng L, Zhang A, Que J, Zhou H, Wang H, Guan Y, Shen C, Sun X, Lai R, Peng F, Feng H, Chen L. The metagenomic next-generation sequencing in diagnosing central nervous system angiostrongyliasis: a case report [J]. BMC Infect Dis, 2020, 20:691.
- [25] Xing XW, Zhang JT, Ma YB, He MW, Yao GE, Wang W, Qi XK, Chen XY, Wu L, Wang XL, Huang YH, Du J, Wang HF, Wang RF, Yang F, Yu SY. Metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of infectious encephalitis and meningitis: a large, prospective case series of 213 patients [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:88.

(收稿日期:2021-05-13)

(本文编辑:彭一帆)

## 《中国现代神经疾病杂志》关于谨防伪造微信采编中心的声明

《中国现代神经疾病杂志》编辑部近期发现伪造本刊微信采编中心的非法行为,微信号 1025282431,昵称麦芽糖,伪造《中国现代神经疾病杂志》采编中心。该微信号以核对作者信息为由,请我刊作者添加其为微信好友,借以窃取相关信息甚至索取审稿费和版面费等,此举对我刊及广大作者、读者造成严重不良影响。

《中国现代神经疾病杂志》特此郑重声明:我刊迄今为止并未建立微信平台的采编中心,作者投稿的唯一途径是登录我刊官方网站 [www.xdjb.org](http://www.xdjb.org),进入“作者在线投稿”界面,按照操作提示提交稿件。稿件经外审通过后,需作者配合修改,达到发表要求后方可待编、排期和刊出,这一过程中编辑部人员与作者之间的联系均采用我刊公共邮箱([xdsjbzz@263.net.cn](mailto:xdsjbzz@263.net.cn))和公用电话[(022)59065611,59065612]。

若遇假冒我刊网站、伪造我刊采编中心、中介、代理等不法事件,欢迎广大作者和读者向我刊提供相关线索!对于以我刊名义从事非法活动的个别网站或微信号,我刊保留通过法律途径解决问题的权利。此声明长期有效,最终解释权归我刊所有。

## 欢迎订阅 2021 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生健康委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、循证神经病学、流行病学调查研究、基础研究、临床研究、综述、临床医学图像、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法等。

《中国现代神经疾病杂志》为北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》2017年版(即第8版)核心期刊和国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731, CN 12-1363/R。国际大16开型,彩色插图,48页,月刊,每月25日出版。每期定价15元,全年12册共计180元。2021年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址:天津市津南区吉兆路6号天津市环湖医院A座二楼西区,邮政编码:300350。

联系电话:(022)59065611,59065612;传真:(022)59065631。网址:[www.xdjb.org](http://www.xdjb.org)(中文),[www.ejenn.org](http://www.ejenn.org)(英文)。