

DOI:10.13350/j.cjpb.250816

• 临床研究 •

血液 mNGS 检测败血症新生儿病原体的准确性评价 及病原菌分布特征

陈珺*, 程欢欢, 余静

(安徽省儿童医院新生儿科, 安徽合肥 230000)

【摘要】 **目的** 分析血液宏基因组二代测序(mNGS)检测新生儿败血症(NS)病原体的准确性,及 NS 患儿病原菌分布特征。**方法** 选取 2021 年 8 月~2024 年 11 月安徽省儿童医院新生儿科收治的 99 例疑似 NS 患儿作为研究对象,其中 77 例确定诊断为 NS。所有患儿均进行血培养和 mNGS 检测。mNGS 与金标准诊断 NS 的一致性采用 *Kappa* 检验分析。**结果** NS 患儿 C 反应蛋白(CRP)和降钙素原(PCT)水平显著高于非 NS 患儿($t=2.634, 9.095, P<0.05$)。早发型 NS(EOS)与晚发型 NS(LOS)患儿在胎膜早破(PROM)和宫内感染上存在显著差异($\chi^2=4.979, 4.614, P<0.05$)。77 例 NS 患儿中,50 例(64.94%)血培养阳性,单独采用血培养诊断 NS 的准确率为 72.73%。mNGS 诊断 NS 的敏感度为 89.61%,准确率为 91.92%。80.81%的送检患儿血培养及 mNGS 检测结果一致,且 *Kappa* 检验显示, mNGS 与金标准诊断 NS 的一致性较高(*Kappa* 值=0.793, $P<0.001$)。综合各项检测结果,77 例 NS 患儿中,革兰阴性菌(G^-)感染者 38 例(49.35%),革兰阳性菌(G^+)感染者 28 例(36.36%),真菌感染 11 例(14.29%)。EOS 及 LOS 患儿在病原菌类型存在显著差异($\chi^2=6.192, P<0.05$)。**结论** 血液 mNGS 诊断 NS 的准确性较高,NS 患儿以细菌为主要感染菌,EOS 及 LOS 患儿在病原菌类型存在差异。血液 mNGS 检测有助于快速进行 NS 诊断并了解感染病原体类型,指导进一步治疗工作。

【关键词】 宏基因组二代测序;新生儿败血症;病原菌分布特征

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)08-1055-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Aug.;20(08):1055-1058.]

Evaluation of the accuracy of blood mNGS in detecting pathogens of neonatal sepsis and distribution features of pathogenic bacteria

CHEN Jun, CHENG Huanhuan, YU Jing (Neonatology Department, Anhui Children's Hospital, Hefei 230000, China)*

【Abstract】 **Objective** To analyze the accuracy of metagenomics next generation sequencing (mNGS) in detecting pathogens of neonatal sepsis (NS) and the distribution features of pathogenic bacteria in NS children. **Methods** From August 2021 to November 2024, 99 suspected NS children accepted by the neonatology department of Anhui Children's Hospital were selected as the research subjects, of which 77 were diagnosed with NS. All children underwent blood culture and mNGS testing. The consistency between mNGS and the gold standard in diagnosing NS was analyzed using Kappa test. **Results** NS children had obviously higher levels of C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) than non NS children ($t=2.634, 9.095, P<0.05$). There were conspicuous differences in premature rupture of membranes (PROM) and intrauterine infection between early-onset NS (EOS) and late-onset NS (LOS) children ($\chi^2=4.979, 4.614, P<0.05$). Among 77 children with NS, 50 cases (64.94%) had positive blood culture, and the accuracy of diagnosing NS using blood culture alone was 72.73%. The sensitivity and accuracy of mNGS in diagnosing NS were 89.61% and 91.92%, respectively. 80.81% of the tested children had consistent blood culture results with mNGS test results, and Kappa test showed that mNGS had a high consistency with the gold standard diagnosis of NS (Kappa value=0.793, $P<0.001$). Based on the comprehensive test results, among 77 NS children, 38 cases (49.35%) were infected with Gram negative bacteria (G^-), 28 cases (36.36%) were infected with Gram positive bacteria (G^+), and 11 cases (14.29%) were infected with fungi. There was a obvious difference in the types of pathogenic bacteria between EOS and LOS children ($\chi^2=6.192, P<0.05$). **Conclusion** Blood mNGS has a high accuracy in diagnosing NS, and NS children are mainly infected with bacteria. There are differences in the types of pathogenic bacteria between EOS and LOS children. Blood mNGS helps to quickly diagnose NS, understand the types of infectious pathogen, and guide further treatment work.

【Keywords】 Metagenomics next generation sequencing; Neonatal sepsis; Distribution features of pathogenic bacteria

* **【通信作者(简介)】** 陈珺(1988-),女,安徽合肥市人,本科,主治医师,从事新生儿感染和营养方面研究工作。E-mail: cj9401@126.com

新生儿败血症(NS)是指发生于出生日龄不超过28 d 婴儿的感染性综合征,在活产新生儿中的发病率接近10%^[1]。NS 和分为早发型 NS(EOS)和晚发型 NS(LOS),EOS 常由母体直接传染,大肠埃希菌等革兰阴性菌为主要病原体,早产、羊水感染、胎膜早破(PROM)等为其危险因素^[2-3]。LOS 指3日龄后发生的NS,其发生与抗菌药物不合理使用、机械通气、中心静脉置管等因素有关^[4]。NS 发病早期症状不明显,可能会出现反应差、少吃、少动、发热等,严重时会出现黄疸加深、肝脾肿大、休克等^[5]。血培养是诊断败血症的金标准,但新生儿抽血量较少,且血液可能会受到污染,因此对NS 的敏感度并不高,血培养阴性时仍需进行脑脊液或其它组织液检查^[6]。宏基因组二代测序(mNGS)是近年发展起来的检测技术,通过提取血液、组织液等样本中的DNA 并进行测序,判断有无病原体感染^[7]。目前,mNGS 在脓毒症患者病原学检测中发挥重要价值,但在NS 中的相关研究报道较少^[8]。因此,本研究对疑似NS 患儿进行血液 mNGS 检测,分析血液 mNGS 诊断NS 的效能,并了解NS 患儿病原菌分布特征,为NS 的准确诊断及治疗提供帮助。

材料与方法

1 一般资料

前瞻性选取2021年8月~2024年11月安徽省儿童医院新生儿科收治的99例疑似NS 患儿为研究对象。纳入标准:(1)出生1~28 d;(2)进行血液mNGS 及传统培养,且检测前未进行抗生素治疗。排除标准:(1)中途转院;(2)临床资料不全;(3)先天性心脏病、免疫缺陷病;(4)伴遗传代谢性疾病;(5)合并血液系统疾病。本研究经安徽省儿童医院医学伦理委员会审核通过,所有患儿家属签署研究知情同意书。依据NS 诊断标准^[9],77例确定诊断为NS,22例排除NS。

2 方法

2.1 标本采集 所有患儿疑似NS 时采集静脉血、脑脊液(腰椎穿刺法采集)或其他腔液,传统培养至少采集1 mL 血液/脑脊液。mNGS 至少采集2 mL 血液,采集时使用保护游离DNA 或RNA 的G 管,采集的血液6~35℃保存,24 h 内由专业人员送往深圳华大基因股份有限公司检测。

2.2 血液 mNGS 首先对采集的血液进行离心,离心后吸取上清,采用DNA 提取试剂盒提取各个样本中DNA,之后进行核酸片段化、末端修复及接头连接,连接后进行PCR 扩增,对扩增好的DNA 文库进行质控并检测浓度,文库经过Pooling 后在Illumina Next-Seq 550 平台上测序(测序模式SE75)。从测序平台中

输出数据并进行处理,将获得的数据与微生物基因组数据库进行比对,获得与病原体匹配的序列数,根据序列数、覆盖度等确定病原体种类。

2.3 临床资料收集、检测 统计患儿性别、分娩方式、胎龄、出生体重及临床表现,统计患儿母亲是否存在妊娠糖尿病和PROM 等高危因素。疑似NS 时采集静脉血,血细胞分析仪进行白细胞计数(WBC),免疫比浊法检测血清C 反应蛋白(CRP),电化学发光法检测血清降钙素原(PCT)。

3 统计学分析

SPSS 25.0 处理数据。计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验。计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验。 $Kappa$ 检验分析mNGS 与金标准诊断NS 的一致性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 非 NS 和 NS 患儿临床资料比较

NS 组患儿中,61.04%为男性,38.96%为女性,59.74%为经阴道分娩,胎龄33~41周,平均 (37.46 ± 2.07) 周,出生体重2095.24~4245.86 g,平均 (3078.17 ± 499.94) g。NS 患儿CRP 和PCT 水平显著高于非NS 患儿($t = 2.634, 9.095, P < 0.05$),临床表现等差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 非NS 和NS 患儿临床资料对比 $[n(\%), \bar{x} \pm s]$
Table 1 Comparison of clinical data between non NS and NS children

指标	非 NS (n=22)	NS (n=77)	t/χ^2 值	P 值
胎龄(周)	37.18±1.95	37.46±2.07	0.566	0.572
出生体重(g)	3035.52±487.63	3078.17±499.94	0.355	0.724
CRP(mg/L)	7.57±2.14	9.36±2.97	2.634	0.010
PCT(mg/L)	2.08±0.64	4.75±1.33	9.095	<0.001
性别				
男	12(54.55)	47(61.04)	0.300	0.584
女	10(45.45)	30(38.96)		
分娩方式				
阴道分娩	15(68.18)	46(59.74)	0.516	0.473
剖宫产	7(31.82)	31(40.26)		
WBC				
减低	3(13.64)	18(23.38)	1.212	0.546
正常	15(68.18)	39(50.65)		
升高	4(18.18)	20(25.97)		
黄疸	8(36.36)	26(33.77)	0.051	0.821
临床表现				
呼吸异常	5(22.73)	23(29.87)	0.430	0.512
体温异常	4(18.18)	19(24.68)	0.405	0.525
反应差	5(22.73)	15(19.48)	0.112	0.738

2 比较 EOS 与 LOS 患儿临床资料

77例NS 患儿中,EOS 有49例,LOS 有28例。EOS 与LOS 患儿在PROM 和宫内感染上差异有统计学意义($\chi^2 = 4.979, 4.614, P < 0.05$),在分娩方式和出生体重等差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

3 NS 患儿血培养及 mNGS 检测结果

77例NS 患儿中,50例(64.94%)血培养阳性,27

例(35.06%)血培养阴性。单独采用血培养诊断 NS 的敏感度为 64.94%,准确度为 72.73%。

77 例 NS 患儿中,mNGS 诊断出 69 例,阳性率为 89.61%,高于单独血培养($\chi^2=13.348,P<0.001$)。mNGS 诊断 NS 的准确度为 91.92%,敏感度和特异度分别为 89.61%和 100%,阳性预测值 100%,阴性预测值 73.33%。

根据血培养和 mNGS 检测结果,将 99 例送检患儿分为血培养和 mNGS 双阳(50 例,50.51%)、mNGS 单阳(19 例,19.19%)、血培养和 mNGS 双阴(30 例,30.30%)、血培养单阳(0 例)。综上,血培养和 mNGS 检测结果一致的有 80 例,占比 80.81%。

表 2 EOS 与 LOS 患儿一般资料及高危因素分析[n(%), $\bar{x}\pm s$]
Table 2 General information and high risk factors analysis of EOS and LOS children

指标	EOS (n=49)	LOS (n=28)	t/ χ^2 值	P 值
胎龄(周)	37.35 $\pm$ 2.04	37.64 $\pm$ 2.12	0.592	0.556
出生体重(g)	3092.47 $\pm$ 496.28	3053.15 $\pm$ 506.35	0.332	0.741
性别	男 32(65.31)	15(53.57)	1.032	0.310
	女 17(34.69)	13(46.43)		
分娩方式	阴道分娩 30(61.22)	16(57.14)	0.123	0.725
	剖宫产 19(38.78)	12(42.86)		
妊娠期高血压疾病	有 9(18.37)	4(14.29)	0.021	0.886
	无 40(81.63)	24(85.71)		
妊娠期糖尿病	有 8(16.33)	6(21.43)	0.312	0.577
	无 41(83.67)	22(78.57)		
PROM	有 21(42.86)	5(17.86)	4.979	0.026
	无 28(57.14)	23(82.14)		
宫内感染	有 16(32.65)	3(10.71)	4.614	0.032
	无 33(67.35)	25(89.29)		

4 mNGS 与金标准的诊断一致性评价

Kappa 检验结果显示,mNGS 诊断 NS 的结果与金标准一致性较高(Kappa 值为 0.793, $P<0.001$)。见表 3。

表 3 mNGS 与金标准诊断 NS 的一致性
Table 3 Consistency between mNGS and gold standard in the diagnosis of NS

mNGS	金标准		合计
	阳性	阴性	
阳性	69	0	69
阴性	8	22	30
合计	77	22	99

5 mNGS 阳性患儿病原菌分布特征

69 例 mNGS 检测阳性的 NS 患儿中,35 例(50.72%)为革兰阴性菌感染,25 例(36.23%)为革兰阳性菌感染,9 例(13.04%)为真菌感染。革兰阴性菌中,以肺炎克雷伯菌(7 株,10.14%)和铜绿假单胞菌(7 株,10.14%)占比最高,其次为大肠埃希菌(5 株,7.25%),阴沟肠杆菌复合群 4 株(占 5.80%)、副流感

嗜血杆菌 3 株(占 4.35%),洋葱伯克霍尔德菌复合群、皮氏罗尔斯顿菌、卡他莫拉菌、鲍曼不动杆菌、异栖克雷伯菌、约氏不动杆菌、琼氏不动杆菌、空肠弯曲杆菌、流感嗜血杆菌均为 1 株。革兰阳性菌中,以粪肠球菌、屎肠球菌、肺炎链球菌和表皮葡萄球菌占比较多,均为 3 株,无乳链球菌、溶血葡萄球菌、单核细胞增生性李斯特菌均为 2 株,人葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、银色棒状杆菌、腐生葡萄球菌、缓症链球菌群、金黄色葡萄球菌、鸟-胞内分枝杆菌复合群均为 1 株。真菌中,以白念珠菌和近平滑念珠菌占比较多,均为 2 株,桔青霉、桔青毒、米根霉、中间假丝酵母、葡萄牙念珠菌均为 1 株。

6 EOS 及 LOS 患儿感染病原菌特征

8 例血液 mNGS 检测阴性的 NS 患儿中,经脑脊液或其他腔液检查,3 例为 G⁻ 感染(大肠埃希菌 1 例,鲍曼不动杆菌 1 例,空肠弯曲杆菌 1 例),3 例为 G⁺ 感染(表皮葡萄球菌 1 例,人葡萄球菌 1 例,金黄色葡萄球菌 1 例),2 例为真菌感染(白念珠菌 1 例,葡萄牙念珠菌 1 例)。因此 77 例 NS 患儿中,38 例(49.35%)为 G⁻ 感染,28 例(36.36%)为 G⁺ 感染,11 例(14.29%)为真菌感染。EOS 及 LOS 患儿感染的病原体类型差异有统计学意义($\chi^2=6.192,P=0.045$)。

讨 论

NS 是威胁新生儿生命的常见疾病之一,由于新生儿免疫功能较差,病原菌很容易侵入新生儿血液并生长繁殖,引起 NS^[10]。NS 常导致多系统受累,病情危急,相比 LOS,EOS 的死亡率更高,为 5%~20%^[11]。NS 的治疗主要为抗菌治疗及呼吸支持、抗惊厥等对症治疗,由于血培养时间较长,在血培养结果出来之前,需经验性使用抗生素,且有时血培养过程中受到污染,导致结果不准确,影响正确用药^[12]。mNGS 是在基因芯片和 PCR 基础上发展而来的测序技术,具有检测速度快、覆盖的病原体范围广的优势,且检测出的序列数能够反映病原体的载量^[13]。因此,血液 mNGS 检测可作为血培养的补充,有助于快速检测 NS 患儿感染的病原体类型。

本研究收治的 99 例疑似 NS 的患儿中,77 例确定诊断为 NS,其中男、女各占 61.04%、38.96%,与非 NS 患儿相比,NS 患儿 CRP 和 PCT 水平显著较高,可见 CRP 和 PCT 等非特异性指标有助于 NS 诊断。此外,本研究对 EOS 和 LOS 患儿一般情况和高危因素进行对比,结果显示,EOS 患儿 PROM 和宫内感染的占比较 LOS 患儿更高,可见 PROM 和宫内感染容易促使 EOS 的发生,与姚艳青等^[14]的报道基本一致,但姚艳青等^[14]的报道还表明,两类患儿在胎龄和出生体

重也存在差异,与本研究存在偏倚,有待后续验证。

77例NS患儿血培养及血液mNGS检测结果显示,50例(64.94%)血培养阳性,27例(35.06%)血培养阴性,可见血培养诊断NS的敏感度为64.94%,准确度为72.73%。mNGS检测的敏感度为89.61%,准确度为91.92%。血培养和血液mNGS诊断NS的特异度均为100%,但经检验血液mNGS检测的阳性率(敏感度)明显高于血培养,可见血液mNGS检测对NS的诊断较能较高。尹云玉等^[15]研究报道,105例脓毒症患者进行血液mNGS和血培养,血液mNGS检测的阳性率高于血培养,且56%的患者两项检验结果一致。本研究进一步统计发现,50例(50.51%)为血培养和mNGS双阳,30例(30.30%)为血培养和mNGS双阴,综上,80.81%的患儿血培养和mNGS检测结果一致,可见血液mNGS检测结果较为准确。此外,77例确定诊断为NS的患儿中,血液mNGS诊断出69例,仅8例漏诊,Kappa检验显示,NS的结果与金标准一致性较高。综上,血液mNGS检测病原体的准确性较高,能够弥补血培养的不足,提高病原体检出率。

进一步分析NS患儿病原菌情况,77例NS患儿中,49.35%为G⁻感染,36.36%为G⁺感染,仅14.29%为真菌感染,可见细菌为NS主要致病菌,尤其是G⁻。然而卞赵男等^[16]对201例细菌感染的NS患儿病原菌进行统计也发现,检出的208株病原菌中60.6%为G⁺,与本研究结果不一致,结果偏倚与研究EOS和LOS患儿的占比密切相关,既往研究^[17-18]显示,EOS患儿G⁻感染率高于LOS患儿G⁻感染率,本研究结果也得到了一致的结果。此外,G⁻中,以肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌感染占比最高;G⁺中,以粪肠球菌、屎肠球菌、肺炎链球菌和表皮葡萄球菌占比较多;真菌中主要为念珠菌。卞赵男等^[16]的检测也结果显示,G⁻感染的NS患儿中,肺炎克雷伯菌占比最高,然而钱玉萍等^[18]研究显示,NS患儿G⁻感染中以大肠埃希菌为主。G⁺和真菌感染的主要种属类型与既往研究^[16,18]基本一致。可见,不同研究中检出的病原体分布特征有共同点,也有不同点。

综上所述,血液mNGS对NS的诊断准确性较高,细菌为NS患儿主要感染菌,尤其是G⁻,血液mNGS检测有助于NS的准确诊断并及时了解感染病原体类型,指导抗生素的使用,改善NS患儿预后。本研究为单中心、小样本研究,因此血液mNGS在NS诊断及病原体检测中的应用价值有待进一步验证。

【参考文献】

[1] Van Leeuwen LM, Fourie E, Van den Brink G, et al. Diagnostic

value of maternal, cord blood and neonatal biomarkers for early-onset sepsis: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Microbiol Infect, 2024, 30(7): 850-857.

[2] Hayes R, Hartnett J, Semova G, et al. Neonatal sepsis definitions from randomised clinical trials [J]. Pediatr Res, 2023, 93(5): 1141-1148.

[3] Russell N, Barday M, Okomo U, et al. Early-versus late-onset sepsis in neonates-time to shift the paradigm [J]. Clin Microbiol Infect, 2024, 30(1): 38-43.

[4] Gatseva P, Blazhev A, Yordanov Z, et al. Early Diagnostic Markers of Late-Onset Neonatal Sepsis [J]. Pediatr Rep, 2023, 15(3): 548-559.

[5] Huang YH, Yeh YR, Lien RI, et al. Molecular characteristics and clinical features of Staphylococcus epidermidis healthcare-associated late-onset bacteremia among infants hospitalized in neonatal intensive care units [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2023, 56(6): 1214-1225.

[6] Dierikx TH, Van Kaam AHL, De Meij TGJ, et al. Umbilical cord blood culture in neonatal early-onset sepsis: a systematic review and meta-analysis [J]. Pediatr Res, 2022, 92(2): 362-372.

[7] Wu J, Song W, Yan H, et al. Metagenomic next-generation sequencing in detecting pathogens in pediatric oncology patients with suspected bloodstream infections [J]. Pediatr Res, 2024, 95(3): 843-851.

[8] Yang Y, Liu Z, Chen X, et al. Association between vaginal microbiomes and neonatal septicemia in pregnant women with preterm premature rupture of membranes based on metagenome sequencing [J]. Am J Transl Res, 2023, 15(7): 4544-4557.

[9] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中国医师协会新生儿科医师分会感染专业委员会. 新生儿败血症诊断及治疗专家共识(2019年版) [J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(4): 252-257.

[10] Roca A, Camara B, Bognini JD, et al. Effect of intrapartum azithromycin vs placebo on neonatal sepsis and death: A randomized clinical trial [J]. JAMA, 2023, 329(9): 716-724.

[11] Schrag SJ, Whitney CG. Still Looking for a simple, effective prevention measure for neonatal sepsis in high-mortality settings [J]. JAMA, 2023, 329(9): 711-712.

[12] Yadav P, Yadav SK. Progress in Diagnosis and Treatment of Neonatal Sepsis: A Review Article [J]. JNMA J Nepal Med Assoc, 2022, 60(247): 318-324.

[13] Fang Q, Xie J, Yin S, et al. Analysis of blood microbiota in patients with adult-onset Still's disease and sepsis by metagenomic next-generation sequencing [J]. Br J Hosp Med (Lond), 2024, 85(7): 1-16.

[14] 姚艳青, 李雪. 新生儿败血症的临床特征及高危因素分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(21): 2331-2335.

[15] 尹云玉, 丁雪峰, 王大庆, 等. 宏基因组二代测序对脓毒症患者血流感染的病原学诊断价值 [J]. 中华急诊医学杂志, 2024, 33(4): 497-501.

[16] 卞赵男, 查新伟, 张熙, 等. 新生儿败血症病原学特征及革兰阴性菌感染影响因素分析——基于5年临床分析 [J]. 临床儿科杂志, 2024, 42(3): 204-210.

[17] 乔岩岩, 李燕, 李明超, 等. 151例新生儿败血症临床特征、病原菌分布及耐药性 [J]. 中国合理用药探索, 2023, 20(5): 74-79.

[18] 钱玉萍, 戴立英, 刘光辉. 安徽省儿童医院败血症新生儿血标本病原菌及耐药性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(2): 200-203.

【收稿日期】 2025-02-20 【修回日期】 2025-05-12