

二代测序技术应用于脑脊液检测 在结核性脑膜炎中的早期诊断价值

林爱清¹ 张璐² 成宝涛³ 刘世政⁴ 孙文青¹

【摘要】目的 评价二代测序技术应用于脑脊液检测在结核性脑膜炎(TBM)患者中的早期诊断价值。**方法** 前瞻性纳入2018年2月2日至2018年8月2日于山东省胸科医院就诊的临床怀疑TBM的患者共50例,并跟踪随访其诊疗结局。送检脑脊液标本均进行二代测序,测序所得原始序列与病原微生物数据库进行对比得到最终结果。二代测序结果以检测到结核分枝杆菌复合群唯一比对序列为阳性,未检测到唯一比对序列为阴性。以符合脑脊液结核分枝杆菌培养阳性、涂片阳性、Xpert MTB/RIF检测阳性及结核分枝杆菌核酸检测阳性等4项中至少1项即为确诊TBM患者;临床可疑TBM且抗结核治疗有效为临床诊断患者;有其他病原学依据或临床排除TBM者为非TBM患者。分析二代测序在TBM早期诊断中的敏感性和特异度。**结果** 确诊为TBM患者22例中Xpert MTB/RIF检测阳性13例,培养阳性6例,结核分枝杆菌核酸PCR检测阳性5例,临床诊断为TBM患者12例,非TBM患者16例。在确诊及临床诊断患者中,二代测序技术检测到结核分枝杆菌复合群系列20例,敏感性为58.8%(20/34),特异度为100%(16/16)。在确诊患者中,二代测序的敏感性为63.6%(14/22);在同步进行结核分枝杆菌培养、Xpert MTB/RIF检测与二代测序的50例标本中,以临床诊断为标准,3种方法的特异度均为100%(16/16);传统方法、Xpert MTB/RIF检测及二代测序的敏感性分别为29.4%(10/34)、38.2%(13/24)和58.8%(20/34),前两种检测方法与二代测序敏感性差异均有统计学意义(McNemar检验: $\chi^2 = 8.333$ 、 $P = 0.013$, $\chi^2 = 8.333$ 、 $P = 0.065$)。传统方法与二代测序联合检测的敏感性高达82.4%(28/34)。**结论** 二代测序技术能够较快速地检测脑脊液中的结核分枝杆菌复合群,且其敏感性和特异度均较高,可作为TBM的早期诊断指标。二代测序联合传统检测方法可提高检出率。

【关键词】 高通量核苷酸测序; 结核性脑膜炎; 脑脊液; 诊断; 二代测序

Evaluation of next-generation sequencing for early diagnosis of tuberculous meningitis Lin Aiqing¹, Zhang Lu², Cheng Baotao³, Liu Shizheng⁴, Sun Wenqing¹ ¹Department of Respiratory and Critical Care Medicine, ³Department of Quality Management, ⁴Department of Tuberculosis, Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan, 250013, China; ²College of Health Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Corresponding author: Sun Wenqing, Email: 13791122772@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the early diagnostic value of next-generation sequencing technology applied to cerebrospinal fluid detection in patients with tuberculous meningitis. **Methods** A total of 50 patients with clinically suspected tuberculous meningitis who were treated in Shandong Provincial Chest Hospital from February 2nd, 2018 to August 2nd, 2018 were collected prospectively, and the diagnosis and treatment outcomes of those patients were followed up. The submitted cerebrospinal fluid specimens were all subjected to next-generation sequencing, and the obtained original sequence was compared with the pathogenic microorganism database to get the final results. The next-generation sequencing results showed

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2020.04.005

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2019WS527)

作者单位: 250013 济南市, 山东省胸科医院呼吸与危重症医学科七病区¹、质量管理部³、结核科五病区⁴; 250355 济南市, 山东中医药大学健康学院²

通信作者: 孙文青, Email: 13791122772@163.com

positive when detecting the unique alignment sequence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, and negative when no unique alignment sequence was detected. Tuberculous meningitis were confirmed with at least one of the four items: cerebrospinal fluid *Mycobacterium tuberculosis* culture positive, smear positive, Xpert MTB/RIF test positive and *Mycobacterium tuberculosis* nucleic acid test positive; clinically diagnosed tuberculous meningitis patients were with clinically suspected tuberculous meningitis and effective anti-tuberculosis treatment; non-tuberculous meningitis patients were with other etiological evidence or clinical exclusion of tuberculous meningitis. The sensitivity and specificity of next-generation sequencing in early diagnosis of tuberculous meningitis were analyzed, respectively. **Results** Among the 22 patients with confirmed tuberculous meningitis, 13 cases were positive for Xpert MTB/RIF test, 6 cases were positive for culture, and 5 cases were positive for *Mycobacterium tuberculosis* nucleic acid by PCR. There were 12 cases clinically diagnosed as tuberculous meningitis and 16 cases as non-tuberculous meningitis patients. Among the confirmed and clinically diagnosed patients, 20 cases of *Mycobacterium tuberculosis* complex series were detected by next-generation sequencing technology, with a sensitivity of 58.8% (20/34) and a specificity of 100% (16/16). Among the confirmed patients, the sensitivity of next-generation sequencing was 63.6% (14/22). Among the 50 specimens that were simultaneously submitted for *Mycobacterium tuberculosis* culture, Xpert MTB/RIF test and next-generation sequencing, the specificity of the three methods was 100% (16/16) with clinical diagnosis as the standard. The sensitivity of traditional method, Xpert MTB/RIF test and next-generation sequencing were 29.4% (10/34), 38.2 (13/24) and 58.8 (20/34), respectively. The sensitivity differences between the first two detection methods and next-generation sequencing were significantly different (McNemar test: $\chi^2 = 8.333$, $P = 0.013$; $\chi^2 = 8.333$, $P = 0.065$). The sensitivity of the combined detection of traditional method and next-generation sequencing was as high as 82.4% (28/34). **Conclusions** Next-generation sequencing technology could quickly detect the *Mycobacterium tuberculosis* complex in the cerebrospinal fluid, with significant sensitivity and specificity, and could be used as an early diagnosis index for tuberculous meningitis. Next-generation sequencing combined with traditional detection method could increase the detection rate.

【Key words】 High-through nucleotide sequencing; Tuberculous meningitis; Cerebrospinal fluid; Diagnosis; Nex-generation sequencing

结核性脑膜炎 (tuberculous meningitis, TBM) 是由结核分枝杆菌引起的中枢神经系统感染性疾病, 近年来其发病率在我国呈升高趋势, 其临床表现不典型, 致残率及致死率均较高, 给社会带来严重的经济负担^[1]。有研究表明, 早期诊断及及时治疗是影响TBM预后的重要因素^[2]。因此, 早诊断、早治疗至关重要。但因TBM的临床表现多样, 早期诊断仍是一个难题。脑脊液中找到结核菌为确诊TBM的“金标准”, 但该方法周期长, 阳性率低, 已经不能满足临床需求^[3]。

二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术是一种新兴的基于序列病原微生物鉴定方法^[4-6], 该技术已被应用于中枢神经系统感染诊断^[7-10], 然而, 该技术对于TBM的诊断价值尚未明确。本研究前瞻性选取临床怀疑TBM的患者为研究对象, 旨在评价NGS技术在TBM早期诊断中的效能, 并研究其相对于传统诊断手段、Xpert MTB/RIF

在TBM诊断上的效能差异, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

本研究为前瞻性研究, 按照入院时间连续纳入2018年2月2日至2018年8月2日于山东省胸科医院就诊的临床怀疑TBM的患者共56例, 根据纳入/排除标准^[11], 纳入50例进行分析。入组50例患者年龄20~61岁, 平均年龄 (35.67 ± 6.89) 岁; 其中男性30例, 女性20例。详细记录其病史、症状、体征、实验室及辅助检查结果。自患者出院日期起随访1年, 观察临床结局。本研究得到山东省胸科医院伦理委员会批准[批号: (2018) 伦审第 (15) 号]。

二、纳入排除标准和诊断依据

1. 纳入标准: ①年龄 > 18岁; ②临床怀疑TBM患者, 并具有相应提示TBM的临床症状及体

征,如明显的发热、头痛、呕吐及脑膜刺激征表现。③脑脊液标本送检至天津华大基因研究所二代测序平台,且标本符合NGS检测要求,脑脊液至少2 ml;④签署知情同意书。

2. 排除标准:①标本送检时患者主要诊断为除TBM以外的其他病原体感染或非感染性疾病;②送检标本量少于0.5 ml,不能满足NGS检测要求;③拒绝签署知情同意书者;④NGS检测没有配对的培养试验或Xpert MTB/RIF检测;⑤标本容器泄露;⑥标本不符合NGS检测的质控要求;⑦患者病史不完整;⑧失访患者。

3. 诊断依据^[12]:①确诊TBM:脑脊液结核分枝杆菌培养或涂片阳性,Xpert MTB/RIF检测阳性及结核分枝杆菌核酸检测阳性4项中至少1项符合即可确诊为结核性脑膜炎;②临床诊断为TBM:临床可疑为TBM,排除其他病原体感染或肿瘤、自身免疫性疾病等非感染性疾病,且抗结核药物治疗有效;③排除TBM:有其他病原学依据(如非结核分枝杆菌、布鲁杆菌、隐球菌或病毒等)或符合肿瘤、自身免疫性疾病等非感染性疾病诊断标准。

三、标本检测

选择2018年2月2日至2018年8月2日于本院就诊的50例临床怀疑为TBM患者的脑脊液标本进行NGS检测,同时进行Xpert MTB/RIF检测、脑脊液结核分枝杆菌培养、涂片及结核分枝杆菌核酸PCR检测。

送检标本均在BGISEQ-100平台上行NGS,测序所得病原序列和病原数据库进行比对得到最终结果。以检测到结核分枝杆菌复合群唯一比对序列为阳性,未检测到唯一比对序列为阴性。排除背景序列,脑脊液NGS共检测到结核分枝杆菌复合群唯一比对序列数1~189条,平均序列数为18条。

唯一比对序列:仅能比对上病原微生物数据库中特定分来层级下的参考序列,本研究中是指仅能比对到结核分枝杆菌上的序列,与其他微生物无交叉。

四、统计学处理

采用Microsoft Office Excel 2016和SPSS 22.0软件进行数据统计和分析。计数资料(各种检测方法检测的阳性病例数或阴性病例数)采用例(%)表示,计算NGS在TBM诊断中的敏感性、特异度(敏感性=该方法检出阳性例数/临床诊断为结核

性脑膜炎例数×100%;特异度=该方法检出阴性例数/排除结核性脑膜炎例数×100%)。配对样本与其他诊断手段的比较采用McNemar检验,并计算一致度(一致度:两种方法结果一致的例数除以总病例数)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、队列标本和诊断结果

确诊为TBM患者22例,其中Xpert MTB/RIF阳性者13例,培养阳性者6例,结核分枝杆菌核酸检测阳性者5例;临床诊断为TBM患者12例,非结核性脑膜炎患者16例。见图1。

二、NGS与传统TBM诊断试验检测结核分枝杆菌的敏感性 & 特异度

所有标本均行NGS和传统TBM诊断试验,结核分枝杆菌培养阳性及核酸阳性者共10例。NGS阳性而传统手段检测阴性者12例,传统手段检测单阳性2例。以传统诊断手段为金标准,22例确诊的TBM患者中,NGS敏感性为63.6%(14/22);以临床最终诊断为金标准,22例确诊患者和12例临床诊断为TBM患者中,NGS和传统手段检测的敏感性分别为58.8%(20/34)和29.4%(10/34),特异度均为100%,差异有统计学意义(McNemar检验: $\chi^2 = 8.333$ 、 $P = 0.013$)。见表1~2。16例排除TBM患者中,NGS均未检出结核分枝杆菌序列,特异度为100%。见表1。

三、NGS与Xpert MTB/RIF敏感性和特异度

在平行送检Xpert MTB/RIF与NGS的50例标本中,Xpert MTB/RIF阳性13例。Xpert MTB/RIF单阳性2例,NGS单阳性9例。以临床诊断为标准,NGS和Xpert MTB/RIF的敏感性分别为58.8%(20/34)和38.2%(13/34),特异度均为100%(16/16),差异无统计学意义(McNemar检验: $\chi^2 = 14.570$ 、 $P = 0.065$),一致度为75.4%。见表3。

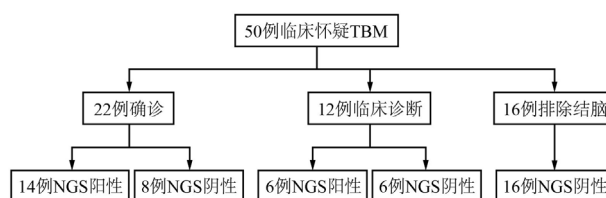


图1 本研究试验流程图

表1 NGS、传统手段与 Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌的敏感性与特异度

检测方法	敏感性 (%)	特异度 (%)	χ^2 值	P值
NGS	58.8 (20/34)	100.0 (16/16)	15.686	< 0.001
传统手段	29.4 (10/34)	100.0 (16/16)	5.882	< 0.001
X-pert	38.2 (13/34)	100.0 (16/16)	8.267	< 0.001

注：以上3种检测方法均以临床诊断为标准；敏感性 = 该方法检出阳性例数 / 临床诊断为结核性脑膜炎例数 × 100%；特异度 = 该方法检出阴性例数 / 排除结核性脑膜炎例数 × 100%

表2 NGS与传统手段检测结核分枝杆菌50例结果(例)

NGS	传统手段		合计	χ^2 值	P值
	+	-			
+	8	12	20	8.333	0.013
-	2	28	30		
合计	10	40	50		

表3 NGS与Xpert MTB/RIF检测结核分枝杆菌50例结果(例)

NGS	X-pert		合计	χ^2 值	P值
	+	-			
+	11	9	20	14.570	0.065
-	2	28	30		
合计	13	37	50		

讨 论

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染引起的严重危害人类健康和生命的慢性传染病^[13]。世界卫生组织估计,2018年有150万人死于结核病^[14]。TBM是结核分枝杆菌侵犯中枢神经系统导致的一种结核病,是肺外结核病中最严重的类型,其致残率、病死率^[15-16]均较高。近年来,难治性TBM患者数量不断增加^[17],且早期病原学确诊困难、疗程长、预后差。有研究表明,早期诊断与治疗是提高疗效、改善TBM患者预后的关键^[18]。

目前TBM诊断的金标准是脑脊液中检测到结核分枝杆菌,但脑脊液涂片抗酸染色的阳性率仅为10%,而结核分枝杆菌培养耗时较长,通常需要2周以上,且阳性率仅为20%~30%^[19],对临床早期诊断价值有限。近年来出现了多种结核病诊断的新技术,分子诊断技术为重要突破,其代表即Xpert MTB/RIF检测试剂盒。但无论是细菌培养还是Xpert MTB/RIF,其检测敏感度在结核性脑膜炎中仍然很低。

随着现代科学技术的发展,高通量测序已经成功应用于肿瘤、糖尿病、产前诊断等领域,目前高

通量技术已运用于病原体检测^[20-21],但大部分为个案报道,该技术的临床应用需要更加全面系统的评价。二代测序技术具有准确性高、通量高等特点,在临床中发挥着越来越重要的作用^[22-23],其作为新兴的分子诊断技术已被报道用于细菌^[24]、真菌^[25]和病毒^[26]等多种感染性疾病的诊断。本研究对50份疑似TBM患者的脑脊液样本进行二代测序,并与临床检验结果比较,以评估二代测序在TBM早期诊断中的价值。

二代测序不但能检测已知病原体,而且能检测未知病原体。同时,基于全基因组的测序分析可有效回避细菌培养结果相似而难以区分的问题;还具有敏感性高的特点。本研究中50例疑似TBM患者的脑脊液样本经常规检测方法共检出13例,而基于二代测序技术检测到20例,运用NGS诊断TBM敏感性显著高于传统的结核分枝杆菌培养或涂片方法。NGS敏感性虽高于Xpert MTB/RIF,但差异无统计学意义,二者诊断效能相似。就检测速度而言,NGS检测时间一般为72 h,而传统MTB培养长达14~28 d,NGS较传统MTB培养显著缩短了检测时间,可作为TBM的快速诊断手段。NGS可为临床决策和临床实验室改善培养条件提供一定参考。

但NGS也有其不可避免的缺陷,首先,受标

本制备过程限制, NGS能较好地检测出DNA类型的病原体, 但对RNA类型的病原体还需要进一步探索。其次, 目前NGS检测费用相对较高, 导致其使用受限^[27]。再次, NGS尚不能直接检测MTB菌株是否耐药, 对耐药MTB的检测受到限制。

综上, 二代测序相比传统检测TBM方法敏感性高, 检测速度快, 在TBM的早期诊断方面有广阔的应用前景。本研究为二代测序应用于TBM的精准诊断和早期诊断提供了探索; 但在评估NGS对TBM的诊断价值时, 分别以确诊患者和临床诊断患者为标准, 以减少偏倚; 但存在样本量少、二代测序深度相对较低等不足, 有待在今后的大样本研究中进一步完善。

参 考 文 献

- [1] Yu J, Wang ZJ, Chen LH, et al. Diagnostic accuracy of interferon gamma release assays for tuberculous meningitis: a Meta-analysis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2016, 20(4):494-499.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017[EB/OL]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed Dec 31, 2017).
- [3] 甘靖, 叶少林, 罗蓉, 等. 近10年国内外儿童结核性脑膜炎研究论文的可视化研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18(5):415-420.
- [4] Miao Q, Hu J, Ma Y, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(2):231-240.
- [5] Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases[J]. *J Infect*, 2018, 76(3):225-240.
- [6] Guo L, Liu G, Li Y, Liu L, et al. Detection of pediatric bacterial meningitis pathogens from cerebrospinal fluid by next-generation sequencing technology[J]. *J Infect*, 2019, 78(4):323-337.
- [7] Salzberg SL, Breitwieser FP, Kumar A, et al. Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3(4):e251.
- [8] Mai NTH, Phu NH, Nhu LNT, et al. Central nervous system infection diagnosis by next-generation sequencing: a glimpse into the future?[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2017, 4(2):ofx046.
- [9] Mongkolrattanothai K, Naccache SN, Bender JM, et al. Neurobrucellosis: unexpected answer from metagenomic next-generation sequencing[J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2017, 6(4):393-398.
- [10] Wilson MR, Suan D, Duggins A, et al. A novel cause of chronic viral meningoencephalitis: cache valley virus[J]. *Ann Neurol*, 2017, 82(1):105-114.
- [11] 周晔, 艾静文, 崔鹏, 等. 二代测序技术对活动性结核患者的诊断价值[J]. *中国防痨杂志*, 2018, 40(2):153-156.
- [12] Marais S, Thwaites G, Schoeman JF, et al. Tuberculous meningitis: a uniform case definition for use in clinical research[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11):803-812.
- [13] Wang L, Zhang H, Ruan Y, et al. Tuberculosis prevalence in China, 1990-2010: a longitudinal analysis of national survey data[J]. *Lancet*, 2014, 383(9934):2057-2064.
- [14] World Health Organization (2019) Global Tuberculosis Report 2019. WHO, Geneva, 15-40. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- [15] Brancusi F, Farrar J, Heemskerk D, et al. Tuberculous meningitis in adults: a review of a decade of developments focusing on prognostic factors for outcome[J]. *Future Microbiol*, 2012, 7(9):1101-1116.
- [16] Thuong NTT, Heemskerk D, Tram TTB, et al. Leukotriene A4 hydrolase genotype and HIV infection influence intracerebral inflammation and survival from tuberculous meningitis[J]. *J Infect Dis*, 2017, 215(7):1020-1028.
- [17] 陈颜强, 李军, 张雪萍, 等. 难治性结核性脑膜炎的影响因素分析[J]. *河北医科大学学报*, 2017, 38(4):378-381.
- [18] Thwaites G, Chau TT, Mai NT et al. Tuberculous meningitis[J]. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000, 68(3):289-299.
- [19] Naoki Sato. Epidemiology of heart failure in Asia[J]. *Heart Fail Clin*, 2015, 11(4):573-579.
- [20] Yao M, Zhou J, Zhu Y, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in CSF from three patients with meningoencephalitis by next-generation sequencing[J]. *J Clin Neurol*, 2016, 12(4):446-451.
- [21] Hu Y, Zhang Y, Ren X, et al. A case report demonstrating the utility of next generation sequencing in analyzing serial samples from the lung following an infection with influenza A (H7N9) virus[J]. *J Clin Virol*, 2016, 76:45-50.
- [22] 邓少丽, 陈鸣. 关注基因检测在临床实践中的伦理学问题[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(7):481-483.
- [23] 徐锦, 徐梦华. 下一代测序技术在临床病毒学检验中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(5):338-340.
- [24] Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al. Diagnosis of sepsis with cell-free DNA by next-generation sequencing technology in ICU patients[J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(5):365-371.
- [25] Ai JW, Zhang HC, Cui P, et al. Dynamic and direct pathogen load surveillance to monitor disease progression and therapeutic efficacy in central nervous system infection using a novel semi-quantitative sequencing platform[J]. *J Infect*, 2018, 76(3):307-310.
- [26] Guan H, Shen A, Lv X, et al. Detection of virus in CSF from the cases with meningoencephalitis by next-generation sequencing[J]. *J Neurovirol*, 2016, 22(2):240-245.
- [27] Greninger AL, Zerr DM, Qin X, et al. Rapid metagenomic next-generation sequencing during an investigation of hospital-acquired human parainfluenza virus 3 infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 55(1):177-182.

(收稿日期: 2019-10-27)

(本文编辑: 孙荣华)

林爱清, 张璐, 成宝涛, 等. 二代测序技术应用于脑脊液检测在结核性脑膜炎中的早期诊断价值[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2020, 14(4):291-295.