



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2023.04.016

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2023.04.016

· 论著摘要 ·

宏基因组二代测序在结核性胸膜炎中的诊断价值

张梦月 杨炯 杜荣辉 刘修平

[关键词] 结核性胸膜炎; 宏基因组二代测序; 半巢式全自动实时荧光定量聚合酶链反应

[中图分类号] R561.1

[文献标识码] A

目前结核病疫情仍未得到有效控制,其中印度、印度尼西亚、中国是新发结核最多的3个国家^[1],约1/3的结核杆菌感染表现为结核性胸膜炎^[2]。我国结核性胸膜炎引起的胸腔积液约占胸腔积液所有类型的45%~55%^[3]。结核性胸膜炎确诊主要依赖胸膜或胸腔积液病原学检查结果和病理表现^[4,5],胸腔穿刺及胸腔镜下病理活检阳性率分别为54%~63%和66%^[6],但临床实践中胸膜活检操作难度大、对医师及设备要求高,限制了胸膜活检的应用。而由于胸腔积液的少菌性,病原学检查结果常为阴性,阳性率仅为15%~46%^[7],且耗时长。目前临床诊断主要综合临床表现和胸腔积液细胞学及生化检查结果,本文就结核性胸膜炎患者的临床资料进行前瞻性分析,探索宏基因组二代测序(mNGS)在结核性胸膜炎中的诊断价值。

对象与方法

1. 对象:纳入2020年6月10日~2021年1月23日武汉大学中南医院呼吸与危重病学科和武汉市肺科医院呼吸内科临床诊断为结核性胸膜炎的患者17例。纳入标准:临床首次诊断为结核性胸膜炎且未用药。结核性胸膜炎诊断标准参考文献^[8]:急性或亚急性起病,具有结核中毒症状的渗出性胸腔积液患者排除其他疾病且满足以下条件之一者即可诊断:(1)胸腔积液腺苷脱氨酶(ADA)>40 U/L;(2)胸腔积液半巢式全自动实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测(Xpert)或mNGS检出结核杆菌;(3)肺部CT检查结果提示结核病变,痰液或肺泡灌洗液(BALF)结核杆菌DNA检测结果为阳性。

2. 方法:收集患者性别、年龄、既往史、临床表现及实验室、肺部CT、ADA、胸腔积液及外周血结核菌感染T细胞斑点试验(T-SPOT)、结核杆菌DNA、胸腔积液Xpert检查结果。胸腔积液抗酸染色操作及结果判读参考文献^[4]。结核杆菌DNA结果判读:测定值≥500 copies/ml为阳性。Xpert操作步骤:取1 ml标本加入两倍体积稀释液震荡30 s,静置15 min,取2 ml稀释样本于检测匣内,反应2 h左右。Xpert结果判读:循环次数(CT)<16为结核杆菌高检出;CT在16~22为结核杆菌中检出,CT在22~28为结核杆菌低检出;CT在28~38为结核杆菌极低检出;CT

>38为结核杆菌未检出(阴性)。mNGS检测操作步骤:将标本从-80℃冰箱取出后解冻,取600 μl破壁,吸取300 μl提取DNA,经转座酶建库加上标签序列;制备好的文库经过纯化、扩增、再纯化,对文库片段大小和文库浓度定量(微远建库试剂盒);定量文库混合后测序。mNGS结果判读:至少1个片段映射到种或属水平时即为阳性^[9]。疗效有效定义为患者抗结核治疗后复诊时结核中毒症状明显缓解,胸腔积液明显减少。

3. 统计学处理:采用SPSS 22.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示;计数资料以例数和百分比表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 临床资料:17例患者中男13例、女4例,年龄22~84岁,平均年龄(49.0±17.3)岁;WBC计数(5.8±2.0)×10⁹/L,中性粒细胞计数(4.4±1.9)×10⁹/L,淋巴细胞计数(0.7±0.3)×10⁹/L,降钙素原0.09(0,0.17)ng/ml,红细胞沉降率(68.1±37.4)mm/h,ALT 15(12,32)U/L,AST 19.0(13.5,34.0)U/L,血肌酐72.6(58.0,91.1)μmol/L,尿素氮5.0(3.9,6.7)mmol/L。其中高血压病4例,糖尿病、哮喘各1例,1例3年前曾患肠结核,2例患肿瘤。临床表现包括呼吸困难(14例,82.4%)、咳嗽(12例,70.6%)、发热(10例,58.8%)、乏力(9例,52.9%)、咳痰(7例,41.2%)、胸痛(4例,23.5%)、盗汗(4例,23.5%)。17例患者的临床资料见表1。

2. 胸腔积液检查结果:所有患者经抗结核治疗后结核中毒症状明显好转,胸腔积液明显减少。所有患者胸腔积液均为渗出液,其中12例为单侧。胸腔积液ADA(42.9±18.3)U/L,乳酸脱氢酶(477.0±301.7)U/L,单核细胞占比(95.0±21.7)%。所有标本抗酸染色均为阴性。胸腔积液mNGS检测结核杆菌阳性率(35.3%,6/17)明显高于Xpert(11.8%,2/17; $P < 0.05$)。见表1。病例5连续行3次Xpert才检出结核杆菌,而mNGS第1次检测即为阳性。在胸腔积液mNGS检测为阴性的患者中,2例(病例14、15)肺泡灌洗液结核杆菌DNA检测阳性,1例(病例10)痰液、肺泡灌洗液结核杆菌DNA检测阳性,这3例患者肺部CT结果均见结核病变。病例3曾患肠结核,且已治愈,入组1个月前未服用抗结核药物。7例患者ADA<40 U/L,其中胸腔积液mNGS阳性3例,胸腔积液mNGS诊断ADA<40 U/L的结核性胸膜炎患者阳性率为42.9%。

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院呼吸与危重病学科(张梦月、杨炯);武汉市肺科医院呼吸内科(杜荣辉、刘修平)

通讯作者:杨炯,E-mail:yangjiogwh@126.com

注:第一作者现在襄阳市中心医院呼吸与危重症医学科工作

表 1 17 例患者的临床资料

编号	性别	年龄 (岁)	既往史	临床 表现	肺部 CT	胸腔积液 性质	T-SPOT	ADA (U/L)	结核杆菌 DNA	胸腔积液 Xpert	胸腔积液 mNGS	疗效
1	男	67	高血压病、肺腺癌	ABDEF	(-)	渗出性	(+)	35.0	(-)	(+)	(+)	有效
2	男	66	高血压病、哮喘	ABD	(-)	渗出性	(+)	37.0	未行	(-)	(+)	有效
3	女	51	肠结核	ACDF	(-)	渗出性	(-)	40.0	(-)	(-)	(-)	有效
4	男	56	无	ACDFG	(-)	渗出性	未行	30.0	(-)	(-)	(-)	有效
5	男	32	纵隔肿瘤切除术后	ACDEF	(-)	渗出性	(+)	71.0	(-)	(+)	(+)	有效
6	男	22	无	ABDG	(-)	渗出性	未行	54.0	(-)	(-)	(-)	有效
7	男	24	无	ABC	(-)	渗出性	未行	64.0	(-)	(-)	(+)	有效
8	男	70	高血压病	ABDF	(-)	渗出性	未行	84.0	(-)	(-)	(+)	有效
9	男	44	无	CE	(+)	渗出性	未行	62.5	(-) ^a	(-)	(-)	有效
10	男	61	糖尿病	ACDF	(+)	渗出性	(-)	11.5	(+) ^{ab}	(-)	(-)	有效
11	女	28	无	ACDF	(+)	渗出性	未行	49.8	(-) ^{ab}	(-)	(-)	有效
12	女	36	无	CD	(+)	渗出性	未行	38.1	(-)	(-)	(-)	有效
13	女	53	无	DF	(+)	渗出性	未行	42.9	(-)	(-)	(-)	有效
14	男	53	无	ABCG	(+)	渗出性	未行	52.9	(+) ^b	(-)	(-)	有效
15	男	46	无	CDF	(+)	渗出性	未行	63.0	(+) ^b	(-)	(-)	有效
16	男	84	无	ABD	(-)	渗出性	未行	31.9	(-)	(-)	(+)	有效
17	男	61	高血压病	DG	(-)	渗出性	未行	28.4	(-)	(-)	(-)	有效

注:A:咳嗽;B:咳痰;C:发热;D:呼吸困难;E:胸痛;F:乏力;G:盗汗;肺部CT(+)为肺部CT提示结核病变,(-)为未见结核病变;除病例2外,所有患者均行胸腔积液结核杆菌DNA检测且结果均为阴性;^a:同时行痰液结核杆菌DNA检测;^b:同时行肺泡灌洗液结核杆菌DNA检测

讨 论

结核性胸膜炎早期诊断对病情控制和治疗的意
义极大,然而现有的诊断方法并不理想。本研究
结果发现胸腔积液 mNGS 检出结核杆菌阳性
率为 35.3%,与 Zhou 等^[10]的研究结果相似。
这两项研究均以临床诊断为金标准,但后者未
对胸腔积液单独研究,本研究针对结核性胸膜
炎患者进行研究,为 mNGS 在结核性胸膜炎
诊断中的价值提供更为具体的证据。本研究
中 Xpert 阳性患者仅 2 例,检出率远低于
mNGS;7 例患者胸腔积液 ADA <40 U/L,
其中胸腔积液 mNGS 阳性 3 例,胸腔积液
mNGS 诊断 ADA <40 U/L 的结核性胸膜炎
患者阳性率为 42.9%。对于胸腔积液 ADA
水平升高不明显或未升高的结核性胸膜炎患
者可采用胸腔积液 mNGS 检测辅助诊断。

牟向欣^[11]和 Burgess 等^[12]研究中使用免
疫生化指标诊断结核性胸膜炎的阳性率明显
高于本研究,和 Zhou 等^[13]的研究结果。除
试验设计的影响,可能与结核杆菌 DNA 提取
难度高有关,也可能与结核性胸膜炎发病机制
有关。有研究者认为结核性胸膜炎的发病机制
是结核杆菌直接侵犯胸膜所致,也有学者认为
其机制是迟发性变态反应所致,还有学者认为
是淋巴细胞及细胞因子渗出所致^[14]。Zhou
等^[13]和本研究中胸腔积液 mNGS 结核杆菌
低检出率提示结核性胸膜炎的发病机制可能
既有结核杆菌侵犯胸膜,又有免疫反应累及胸
膜,两者在结核性胸膜炎发病机制中占比尚不
确定需进一步研究。

目前国内外针对结核性胸膜炎患者胸腔积
液行 mNGS 检测以探究其诊断效能的研究较
少,为降低检测方法对研究结果的影响,mNGS
均由微远基因公司进行检测(病例 1 为华大基
因公司检测)。本研究随访了所有患者,规律
抗结核治疗后症状均好转,胸腔积液也明显减
少。本研究不足之处为随访时间仅 4 周,随访
时间较短,且纳入样本量较少,部分患者未行
T-SPOT 检查,纳入的患者并未行结核杆菌培
养或胸膜活检。

综上,胸腔积液 mNGS 诊断结核性胸膜炎
具有快速、无创、

阳性率高的特点,阳性率高于 Xpert,对于疑
诊结核性胸膜炎而胸腔积液 ADA <40 U/L
的患者,可结合胸腔积液 mNGS 检测结果提
高诊断率。

参 考 文 献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2022 [EB/OL]. (2022-10-27) [2023-2-20] <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>

[2] Ogawa K, Koga H, Hirakata Y, et al. Differential diagnosis of tuberculous pleurisy by measurement of cytokine concentrations in pleural effusion [J]. *Tuber Lung Dis*, 1997, 78 (1): 29-34.

[3] 高俊峰, 张齐武. 胸腔镜胸膜活检联合外周血 T-SPOT-TB 试验对结核性胸膜炎的诊断价值分析 [J]. *临床肺科杂志*, 2017, 22 (2): 244-247.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准 (WS 288-2017) [J]. *新发传染病电子杂志*, 2018, 3 (1): 59-61.

[5] 曹探曦, 梅春林, 商会会, 等. 经皮肺穿刺组织行结核分枝杆菌/利福平耐药基因快速检测对涂阴肺结核的诊断价值 [J]. *临床内科杂志*, 2022, 39 (2): 125-126.

[6] Santos AP, Correa R, Ribeiro-Alves M, et al. Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN-gamma, IP-10 and adenosine deaminase [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (8): e202481.

[7] Maurya AK, Kant S, Kushwaha RA, et al. The advantage of using IS6110-PCR vs. BACTEC culture for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from pleural fluid in northern India [J]. *Biosci Trends*, 2011, 5 (4): 159-164.

[8] Porcel JM, Palma R, Valdes L, et al. Xpert (R) MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2013, 17 (9): 1217-1219.

[9] Simmer PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66 (5): 778-788.

[10] Zhou X, Wu H, Ruan Q, et al. Clinical Evaluation of Diagnosis Efficacy of Active Mycobacterium tuberculosis Complex Infection via Metagenomic Next-Generation Sequencing of Direct Clinical Samples [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 351.

[11] 牟向欣. 胸腹水结核斑点试验在诊断结核性胸膜炎中的临床价值 [J]. *中国医药指南*, 2020, 18 (18): 94-95.

[12] Burgess LJ, Maritz FJ, Le Roux I, et al. Use of adenosine deaminase as a diagnostic tool for tuberculous pleurisy [J]. *Thorax*, 1995, 50 (6): 672-674.

[13] Zhou X, Jiang P, Huan X, et al. Ultrasound-Guided versus Thoracoscopic Pleural Biopsy for Diagnosing Tuberculous Pleurisy Following Inconclusive Thoracentesis: A Randomized, Controlled Trial [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7238-7248.

[13] 李嫣红. 结核性胸膜炎的发病机制研究进展 [J]. *国外医学 (内科学分册)*, 2002, 29 (9): 373-376.