 DOI: https://doi.org/10.12345/yzlcyxzz.v7i10.21679

The Diagnosis Value of Pathogen-targeted Next-generation Sequencing Technologyfor Tuberculous

Yuanyuan Tang Yanyan Zhang* Hanhan Zhu Suyun Yuan Fang Xu

Weifang Second People's Hospital, Weifang, Shandong, 261041, China

Abstract

Objective: To explore the diagnostic efficacy of targeted Next-Generation Sequencing of bronchoalveolar lavage fluid compared to traditional testing methods for pulmonary tuberculosis, as well as its diagnostic value for tuberculosis and tuberculous mixed infections. **Methods:** From August 2023 to August 2024, 93 bronchoalveolar lavage fluid samples from patients diagnosed with pulmonary tuberculosis at Weifang Second People's Hospital were analyzed. The samples were tested using targeted Next-Generation Sequencing, traditional molecular biology detection, and culture methods. The diagnostic efficacy of traditional testing methods and tNGS for Mycobacterium tuberculosis and tuberculous mixed infections was assessed. **Results:** The positive detection rates of Mycobacterium tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid using Xpert MTB/RIF, qRT-PCR, and tNGS were 40.9%, 38.7%, and 54.8%, respectively. There was a statistically significant difference between qRT-PCR and tNGS (P<0.05). The sensitivity and specificity of traditional molecular biology methods and tNGS for detecting MTB were 92.1%, 85.2% and 97.4%, 74.5%, respectively, with a statistically significant difference (P<0.05). The positive detection rates of tuberculous mixed infections using traditional testing methods and tNGS were 33.3% and 51.0%, respectively, with a statistically significant difference (P<0.05). **Conclusion:** Pathogen-targeted high-throughput sequencing has higher diagnostic efficacy for Mycobacterium tuberculosis infections and tuberculous mixed infections compared to traditional testing methods.

Keywords

targeted next-generation sequencing; pulmonary tuberculosis; mixed infection.

支气管肺泡灌洗液病原体靶向高通量测序对肺结核的诊断价值

唐媛媛 张艳艳* 朱寒寒 袁素云 徐芳

潍坊市第二人民医院，中国 · 山东 潍坊 261041

摘 要

目的：探讨支气管肺泡灌洗液病原体靶向高通量测序与传统检验方法诊断肺结核的效能及对肺结核及结核性混合感染的诊断价值。**方法：**2023年8月—2024年8月潍坊市第二人民医院诊断为肺结核患者的93例肺泡灌洗液标本，分别采用病原体靶向高通量测序、传统分子生物学检测及培养检测，分析传统检验方法与病原体靶向高通量测序法对结核分枝杆菌及结核性混合感染的诊断效能。**结果：**支气管肺泡灌洗液中Xpert MTB/RIF、qRT-PCR法以及tNGS法检测结核分枝杆菌的阳性率分别为：40.9%、38.7%、54.8%。qRT-PCR法与tNGS法比较，差异具有统计学意义（P < 0.05）。传统分子生物学法和tNGS法在检测MTB的灵敏度、特异度分别为92.1%、85.2%和97.4%、74.5%，差异有统计学意义（P < 0.05）。传统检测法以及tNGS法检测结核性混合性感染的阳性率分别为33.3%、51.0%，差异有统计学意义（P < 0.05）**结论：**病原体靶向高通量测序诊断结核分枝感染及结核性混合感染的效能高于传统检验方法。

关键词

病原体靶向高通量测序；肺结核；混合性感染

【基金项目】潍坊市科技发展计划项目（项目编号：2022YX103）；山东省医药卫生科技项目（项目编号：202302070979）。

【作者简介】唐媛媛（1984–），女，中国山东沂源人，硕士，主治医师，从事病原微生物检验研究。

【通讯作者】张艳艳（1985–），女，中国山东临沂人，硕士，主治医师，从事免疫学研究。

1 引言

结核病是由结核分枝杆菌复合体（Mycobacterium tuberculosis，MTB）引起的一种慢性传染病。其中，结核分枝杆菌占肺结核病原菌的 90%，是最常见的一种疾病 [1]。结核病是全球公共卫生和社会关注的问题，也是中国疾病控制工作的重点。为了有效控制结核病的传播并降低死亡率，关键在于早期诊断和及时治疗，以消除传染源。

在结核病患者的诊断和治疗中，快速准确地检测结核菌

至关重要。但现有的传统细菌学、血清学等检测方法，因其耗时长、低灵敏度等原因，越来越不能满足临床诊疗需要[2]。分子生物学检测方法的发展能够提供更快速、更准确的检测结果，有助于提高结核病的诊断效率和治疗效果。靶向高通量测序（targeted Next-Generation Sequencing，tNGS）是一种新兴的病原体检测技术。它通过靶向扩增或捕获特定的DNA 区域，并结合超多重 PCR 和二代测序技术，实现对病原体的精确识别[3-5]。这种方法不仅能鉴定病原微生物的种类，还能深入分析特定的耐药基因和毒力因子基因，为临床提供精准的诊断信息。在本研究中，我们对 198 例疑似肺结核患者的支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）进行了传统病原体检测方法与 tNGS 的对比分析，以评估 tNGS 在肺结核诊断中的临床价值。

2 对象与方法

2.1 研究对象

回顾性分析 2023 年 8 月—2024 年 8 月，潍坊市第二人民医院诊治 198 例疑似肺结核患者，且符合纳入标准：①临床症状及影像学检查怀疑继发性肺结核，可进行纤维支气管镜检测的患者；②临床资料完整无缺；③临床样本和资料通过 tNGS 质量控制。

排除标准：①临床和实验室资料不完整；②诊断不明确；③临床样本未通过 tNGS 质量控制。根据中华人民共和国卫生行业标准 WS 288-2017[6] 对 198 例疑似肺结核患者进行临床确诊诊断，最终确诊肺结核 93 例。本研究为回顾性分析，已通过潍坊市第二人民医院伦理委员会批准（意见号：ky2022-0036-01）。

2.2 研究方法

2.2.1 临床资料收集

收集患者临床资料收集患者临床资料，包括性别、年龄、合并症、BALF tNGS、Xpert 及培养结果等。支气管肺泡灌洗液标本采集具备支气管镜专业资质的医师严格按照操作流程行支气管镜检查及肺泡灌洗术，并留取 BALF。

2.2.2 实验方法

Xpert MTB/RIF 则按照美国 Cepheid 公司提供的利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测系统的使用说明书进行操作，其检测结果通过仪器自动判读得出。实时聚合酶链反应检测法（qRT-PCR）采用达安基因公司股份有限公司的实时聚合酶链反应检测试剂盒进行呼吸道病毒核酸检测。传统分子生物学方法包括 Xpert MTB/RIF 和（qRT-PCR）。传统检测法包括常规细菌、真菌培养及 BALF 呼吸道病原学核酸（包括腺病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、肺炎支原体、新型冠状病毒）检测。上述传统检测法检测或培养出病原体，则结果判定为阳性。病原体分类为细菌、病毒、真菌、非典型病原体。

2.2.3 tNGS 检测

根据标准程序采集纳入患者的 BALF 3 mL，储存无菌冻存管中，24 小时内进行检测。样本按照核酸提取或纯化试剂盒和 PTseqTM 呼吸道感染病原微生物靶向高通量基因检测试剂盒步骤提取 DNA，然后经过逆转录、一链合成、靶向扩增、扩增后纯化、PCR 扩增、PCR 后纯化进行文库构建，文库≥ 1ng/μL 为合格，通过 BGIG99 平台对质量确认的文库进行测序，排除人源序列后的其余数据与华大建立的基于 NCBI（GenBank /RefSeq /NT）的微生物参考数据库对比进行高级数据分析。

2.3 统计学分析

患者资料录入 Excel 整理成数据库，采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。计数资料用［n（%）］表示，组间比较采用 $\chi 2$ 检验。以临床最终诊断为参考标准，建立 2×2 列联表以确定敏感度、特异度，结果以 % 表示。$P < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果

3.1 Xpert MTB/RIF、qRT–PCR 法以及 tNGS 法在灌洗液标准中检测 MTB 的结果分析

灌洗液中 Xpert MTB/RIF、qRT-PCR 法以及 tNGS 法 MTB 的阳性率分别为：40.9%、38.7%、54.8%。qRT-PCR 法与 tNGS 法比较，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 1。

表 1 三种分子生物学方法在灌洗液样本中检测结核分枝杆菌的阳性率比较

检测方法	灌洗液（n=93）			$\chi 2$	P 值
	阳性（例）	阴性（例）	阳性率（%）		
Xpert MTB/RIF	38	55	40.9	0.090[a]	0.764
qRT-PCR 法	36	57	38.7	4.859[b]	0.028
tNGS 法	51	42	54.8	3.641[c]	0.056

a Xpert MTB/RIF 与 qRT-PCR 法比较，b qRT-PCR 法与 tNGS 法比较，c Xpert MTB/RIF 与 tNGS 法比较。

3.2 灌洗液样本中传统检测法和 tNGS 法检测 MTB 的效能

以 MGIT960 培养法为金标准，传统分子生物学法和 tNGS 法在检测 MTB 的灵敏度、特异度分别为 92.1%、85.2% 和 97.4%、74.5%，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 2。

表 2 灌洗液样本中传统检测法和 tNGS 法检测 MTB 的效能

培养法	传统分子生物学法		tNGS 法	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性（例）	35	3	37	1
阴性（例）	9	46	14	41
灵敏度（%）	92.1		97.4	
特异度（%）	85.2		74.5	
$\chi 2$	51.798		46.928	
P 值	< 0.001		< 0.001	

3.3 灌洗液样本中传统检测法和 tNGS 法检测 MTB 混合性感染的效能分析

93 例患者中，传统检测法检出 44 例 MTB 感染，tNGS 法检出 51 例 MTB 感染。支气管肺泡灌洗液中传统检测法以及 tNGS 法检测 MTB 与细菌 / 病毒 / 真菌混合性感染的阳性率分别为 33.3%、51.0%，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 3。

表 3 灌洗液样本中传统检测法和 tNGS 法检测 MTB 混合性感染的效能

检测方法	MTB 混合性感染		阳性率（%）	χ2	*P* 值
	是（例）	否（例）			
传统检测法	11	33	33.3	6.705	0.01
tNGS 法	26	25	51.0		

4 讨论

在全球范围内，结核病仍然是单一传染源所致个人死亡的主要原因（世界卫生组织，2020 年）[7]。自 2000 年以来，结核病死亡率以每年约 3% 的速度下降。虽然这一成就令人鼓舞，但在实现到 2035 年将结核病相关死亡减少 95%，从而终结结核病的目标方面仍有差距 [8]。临床实践中采用了多种方法来及时确认结核病感染。传统的病原微生物检测技术在临床肺结核诊断中仍然被广泛使用，但它们在灵敏度、特异性、检测速度和信息量方面存在一些限制。近年来随着新一代基因组测序技术应用，tNGS 已成为辅助结核病患者临床诊断的快速而全面的工具 [9]。该技术针对百余种与呼吸道感染相关的致病基因和耐药基因 / 基因变异。它采用超多重 PCR 文库制备系统选择性扩增目标序列进行富集，然后利用第二代测序技术实现高通量、有针对性的测序，以精确检测病原体 [10]。本研究探讨 tNGS 对肺结核的诊断价值，可为临床早期诊断肺结核提供依据。tNGS 检出细菌、病毒、真菌、非典型病原体的阳性检出率均明显高于常规方法。

tNGS 联合 Xpert 诊断肺结核的灵敏度高于 Xpert，表明 tNGS 对肺结核患者有良好的筛选能力，tNGS 联合 Xpert 可进一步提高诊断肺结核的灵敏度。整体而言，在肺结核的早期诊断中 tNGS 较传统病原学检测方法具有一定优势。

对于出现特征性肺部影像学改变、伴有或不伴有肺结核症状的疑似肺结核患者，常规的痰标本酸性耐药杆菌涂片、培养和基因 Xpert 等分子生物学检测可能都会得出阴性结果。此外，在某些病例中，支气管肺泡灌洗液的传统微生物学检查（如抗酸染色和培养）也无法得出结论，因此需要进一步的辅助诊断。因此，对于这些具有挑战性的病例，尤其是当传统检测无法提供明确诊断时，应考虑将 tNGS 作为辅助诊断工具。

基于培养的分枝杆菌菌种鉴定被认为是“金标准”。然而，这种方法耗时较长。相比之下，tNGS 可直接检测呼吸道分泌物标本（包括痰和支气管肺泡灌洗液）以及脓液和脑脊液等其他标本中的核酸。然而，在去除人类背景核酸的过程中，细胞内细菌（如结核分枝杆菌）的检测会受到影响，从而导致较高的假阴性率，这也是 tNGS 技术的局限性。此外，tNGS 无法区分活的和死的结核分枝杆菌。因此，它需要与结核分枝杆菌序列数量、临床症状、放射学检查结果和其他标准等因素紧密结合，才能做出更明确的诊断。

综上所述，tNGS 在肺结核早期诊断及肺结核混合其他细菌、真菌、病毒等混合性感染时敏感度和特异性优于传统检验方法。因这是一项在结核病专科医院进行的单中心研究，最终入组样本量较少，仍需要在更大规模的前瞻性研究中进一步研究论证。但本研究的主要发现仍对潍坊地区疑似肺结核患者防控、诊疗有一定意义，tNGS 可能成为结核诊断领域有较高应用价值的工具。

参考文献

[1] Singh V. Tuberculosis treatment-shortening[J]. Drug Discov Today, 2024, 29(5): 103955.

[2] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14:319-338.

[3] Hilt EE, Ferrieri P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases[J]. Genes (Basel), 2022, 13(9):1566.

[4] 肺结核诊断WS 288—2017[J].中国感染控制杂志,2018,17(7):642-652.

[5] Zhonghua Jie, He He, Hu Xi, et al. Consensus of clinical pathways of metagenomic next-generation sequencing test in diagnosis of lower respiratory tract infections in China[J]. Chinese Thoracic Society, 2023, 46(4):322-335.

[6] 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.

[7] Iyer A, Ndlovu Z, Sharma J, et al. Operationalising targeted next-generation sequencing for routine diagnosis of drug-resistant TB[J]. Public Health Action,2023,13(2):43-49.

[8] Dookie N, Khan A, Padayatchi N, et al. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field[J]. Front Microbiol, 2022,13:775030.

[9] Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S. Application of Targeted Next-Generation Sequencing Assay on a Portable Sequencing Platform for Culture-Free Detection of Drug-Resistant Tuberculosis from Clinical Samples[J]. Clin Microbiol, 2020, 58(10): e00632-620.

[10] Colman RE, Mace A, Seifert M, et al. Whole-genome and targeted sequencing of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis on the iSeq100 and MiSeq: A performance, ease-of-use, and cost evaluation[J]. PLoS Med, 2019, 16(4): e1002794.