

高通量测序技术诊断儿童结核性脑膜炎合并血管炎 1 例

张芙蓉 陈锋

华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院重症医学科, 湖北武汉 430016

通信作者: 陈锋, Email: jmnba@163.com

【摘要】 儿童结核性脑膜炎(TBM)致死率和致残率高,部分患儿早期临床症状不典型,而且缺乏有效的检测手段,早期诊断存在一定的困难。采用高通量宏基因组测序技术(mNGS),通过检测致病病原体基因,能明确临床感染性疾病的病原学诊断。华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院于2020年3月31日收治1例TBM合并血管炎患儿,该患儿发病时仅表现为头晕及呕吐,疑似颅内占位性疾病。之后患儿出现频繁抽搐、发热,意识障碍迅速加重,结合颅脑磁共振成像(MRI)及脑脊液常规和生化等辅助检查,考虑患儿为中枢神经系统感染,多次行结核分枝杆菌(MTB)芯片检测为阴性,结核菌素试验及初期T细胞斑点试验(T-SPOT.TB)检测均为阴性,无法确诊TBM。最终应用mNGS技术在脑脊液中检测出MTB基因序列,符合MTB感染,排除其他感染病原体,最终确诊为TBM,给予抗结核治疗后患儿病情好转。提示临床可采用mNGS技术对儿童不典型TBM进行早期诊断,精准治疗,从而改善患儿预后。

【关键词】 高通量测序; 结核性脑膜炎; 儿童; 脑脊液; 血管炎

基金项目:湖北省三级医院临床重点专科项目(2018-15);湖北省武汉市市级临床重点专科项目(2017-34)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.026

Diagnosis of one child with tuberculous meningitis complicated with vasculitis confirmed by high-throughput sequencing technique Zhang Furong, Chen Feng

Intensive Care Unit, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430016, Hubei, China

Corresponding author: Chen Feng, Email: jmnba@163.com

【Abstract】 The mortality and disability rates of children with Tuberculous meningitis (TBM) are high. The early clinical symptoms of some children with this disease are not typical, and lack of effective detection means, thus doctors often meet certain difficulties in early diagnosis. Using high-throughput sequencing technology (mNGS) can identify the etiological diagnosis of clinical infectious diseases by detecting pathogenic genes. A child with TBM complicated with vasculitis was admitted to Wuhan Children's Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology on March 31, 2020. The child presented only with dizziness and vomiting, so at first the diagnosis was suspected of intracranial space-occupying disease. Afterwards, frequent convulsion and fever occurred in the child symptoms and signs, and conscious disturbance developed and aggravated rapidly in severity. Combined with cranial magnetic resonance imaging (MRI), routine and biochemical examinations of cerebrospinal fluid, etc. auxiliary tests, the child was considered to be a central nervous system infection. The child underwent multiple *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) chip tests, tuberculin test and initial T cell spot test of TB (T-SPOT.TB), because of negative results of all the above tests, a definite TBM diagnosis could not be made. Finally, the MTB gene sequence was positively detected by mNGS technique in cerebrospinal fluid, which was consistent with MTB infection, and in the mean time, other infectious pathogens were excluded. At last, the child was surely diagnosed with TBM. After anti-tuberculosis treatment, the child's condition was improved. It is suggested that mNGS can be used for early diagnosis and precise treatment of atypical TBM in children, so as to improve the prognosis of this disease.

【Key words】 High-throughput sequencing; Tuberculous meningitis; Child; Cerebrospinal fluid; Vasculitis

Fund program: Key Clinical Specialty Projects of Tertiary Hospitals in Hubei Province (2018-15); Wuhan Municipal Key Clinical Specialty Project of Hubei Province (2017-34)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.026

中枢神经系统感染是儿科常见的神经系统疾病,临床上多表现为发热、头痛、意识障碍等症状,虽然不同病原体引起的机体免疫系统反应不同,脑脊液细胞及生化指标存在一定差异,且聚合酶链反应(PCR)等技术在临床广泛应用^[1],但仍有部分患儿无法明确致病菌,尤其是结核性脑膜炎(TBM)。脑脊液高通量宏基因组测序技术(mNGS)通过基因检测,可以快速检测出中枢神经系统感染的病原体,明确致病菌^[2-3],特别是对临床表现缺乏特异性的TBM患儿可以进行早期诊断。现报告华中科技大学同济医学院附属武汉儿

童医院收治的1例TBM患儿的诊疗过程。

1 病例资料

患儿女性,10岁9个月,因“头晕1周、呕吐4d”于2020年3月31日入住本院神经外科。入院前1周患儿无明显诱因出现头晕,于当地医院就诊,予以输液治疗(具体用药不详),症状无明显好转;4d前出现呕吐,呕吐物为胃内容物,量中等;2020年3月31日外院颅脑CT检查提示右侧小脑占位性病变,遂至本院神经外科就诊。患儿既往体健,无基础疾病,按计划免疫接种。入院查体:患儿生长发育正常,

身高 145 cm, 体重 30 kg; 体温 36.8 ℃, 脉搏 88 次/min, 呼吸频率 25 次/min; 意识清楚, 精神萎靡, 全身浅表淋巴结未见肿大, 左上臂可见卡介苗接种疤痕; 颈软, 双侧瞳孔等大等圆, 直径约 2.5 mm, 对光反射灵敏; 胸部呼吸运动双侧对称, 双肺呼吸音清, 未闻及啰音; 心率 88 次/min, 律齐, 心音正常, 各瓣膜区未闻及杂音; 腹部外形正常, 全腹柔软, 无压痛和反跳痛, 腹部未触及包块, 肝脾肋下未触及; 四肢活动正常, 肌力 V 级, 肌张力无明显异常, 感觉正常, 病理反射未引出。实验室检查: 血常规示白细胞计数 $3.48 \times 10^9/L$, 中性粒细胞计数 $2.43 \times 10^9/L$, 淋巴细胞计数 $0.8 \times 10^9/L$, 超敏 C-反应蛋白 (hs-CRP) $< 0.75 \text{ mg/L}$, 降钙素原 (PCT) 检测 (定量) $0.070 \mu\text{g/L}$ 。

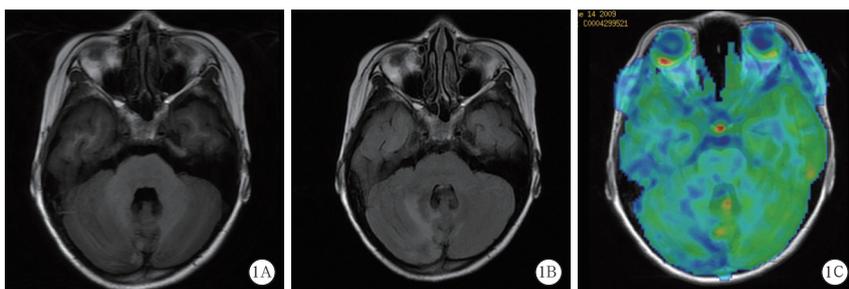
入院后患儿反复抽搐伴发热, 2020 年 4 月 2 日颅脑磁共振成像 (MRI) 检查提示右侧小脑半球内侧区见一稍长 T1 长 T2 片状异常信号, 扩散加权成像 (DWI) 信号无明显异常, 无占位效应, 增强时在病灶外侧见多处点状强化, 动脉自旋标记 (ASL) 信号稍低 (图 1), 考虑中枢神经系统免疫性脱髓鞘病, 患儿出现意识障碍, 遂转入重症监护病房 (ICU)。多次腰椎穿刺脑脊液检查 (表 1), 考虑可能为病毒性脑炎, 给予抗病毒、甘露醇脱水、营养脑神经等对症支持治疗。4 月 4 日结核感染 T 细胞斑点试验 (T-SPOT.TB) 检测阴性, 结核菌素试验阴性。4 月 6 日患儿出现中枢性呼吸衰竭, 自主呼吸浅慢、节律不齐, 予以经口气管插管机械辅助通气。4 月 10 日脑脊液 mNGS 技术检测显示, 脑脊液结核分枝杆菌 (MTB) 的基因序列数为 47, 未检出其他细菌、真菌、病毒、寄生虫及

支原体等; 抗酸染色及墨汁染色阴性; 自身免疫性脑炎抗体及寡克隆区带阴性。多次 MTB 芯片检测阴性。4 月 16 日脑脊液结核 DNA 测定显示 $510 \text{ 拷贝}/\text{mL}$, 利福平耐药基因突变未检出; 当日颅脑 MRI 提示大脑、小脑、脑干内异常信号较前明显, 考虑感染性病变; 双侧硬膜下积液或积液, 窦汇处充盈缺损, 考虑静脉血栓 (图 2)。颅脑磁共振血管造影 (MRA) 扫描未见明显异常征象。5 月 12 日及 28 日 T-SPOT.TB 检测均呈阳性。临床考虑 TBM 合并血管炎, 给予异烟肼注射液 + 莫西沙星注射液 + 利福平 + 吡嗪酰胺 + 丁胺卡那 + 地塞米松注射液等治疗。5 月 20 日全麻下行立体定向脑活检、脑室 Ommaya 泵置入术、皮瓣修整术、硬脑膜下钻孔引流术及气管切开术。经治疗, 患儿体温逐渐稳定, 抽搐症状缓解, 自主呼吸逐渐恢复, 于 6 月 11 日拔除气管导管撤离呼吸机, 之后转出 ICU 继续给予抗结核及康复治疗。

表 1 1 例 10 岁 9 个月女性 TBM 合并血管炎患儿住院期间多次脑脊液检查结果

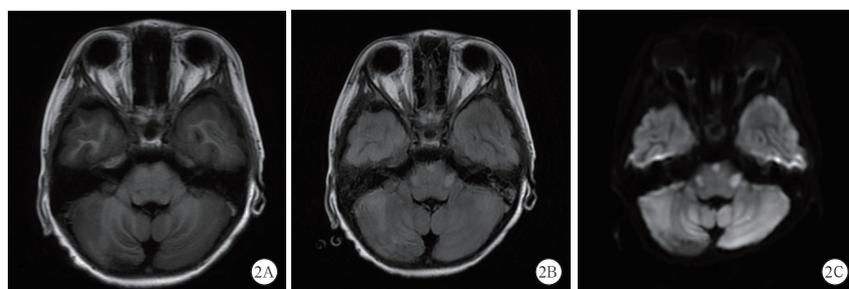
日期	性状	细胞总数 ($\times 10^6/L$)	主要细胞类型	蛋白 (g/L)	糖 (mmol/L)	氯化物 (mmol/L)
4 月 4 日	无色清亮	59	单核细胞	>3.00	2.37	109.8
4 月 10 日	无色清亮	19	单核细胞	2.40	3.27	137.5
4 月 17 日	无色微混	198	多核细胞	>3.00	5.18	102.3
4 月 26 日	淡黄清亮	134	单核细胞	2.37	3.22	123.1
5 月 6 日	淡黄清亮	249	单核细胞	>3.00	2.83	119.8
5 月 17 日	微黄微混	444	单核细胞	1.59	2.73	118.4
6 月 2 日	微黄清亮	8		0.21	4.23	123.4

注: TBM 为结核性脑膜炎; 空白代表无此项



注: TBM 为结核性脑膜炎, MRI 为磁共振成像; 颅脑 MRI 的 T1WI 序列上 (1A) 右侧小脑半球见片状稍低信号及结节状稍高信号; 颅脑 MRI 的 T2WI FLAIR 序列上 (1B) 右侧小脑半球见片状及结节状高信号; 颅脑 MRI 的 3D-ASL 序列上 (1C) 右侧小脑病变区呈低信号

图 1 1 例 10 岁 9 个月女性 TBM 合并血管炎患儿 2020 年 4 月 2 日颅脑 MRI



注: TBM 为结核性脑膜炎, MRI 为磁共振成像; 颅脑 MRI 的 T1WI 序列上 (2A) 右侧小脑半球皮质见片状低信号, 邻近脑沟稍宽, 脑干表面见结节样等信号, 边界模糊; 颅脑 MRI 的 T2WI FLAIR 序列上 (2B) 右侧小脑半球见片状高信号, 脑干表面见数个结节状高信号; 颅脑 MRI 的 DWI 序列上 (2C) 右侧小脑见片状低信号, 脑干表面见结节高信号, 边界清楚

图 2 1 例 10 岁 9 个月女性 TBM 合并血管炎患儿 2020 年 4 月 16 日颅脑 MRI

2 讨论

结核病是由 MTB 引起的一种慢性传染性疾病, 严重危害儿童健康^[4], TBM 发生在中枢神经系统, 是致死率和致残率最高的肺外结核, 20%~30% 的存活患者可遗留永久性中枢神经系统后遗症^[5]。MTB 还可侵犯血管引起结核性血管炎, 导致血管闭塞, 继发脑卒中。少数 TBM 患者以脑血管炎或脑卒中为主要表现。儿童 TBM 的主要临床表现为高热、头痛、呕吐、消瘦、颈项强直、意识障碍、脑膜刺激征; 脑脊液检测出现蛋白及白细胞计数升高, 葡萄糖及氯化物水平下降等^[6]。但部分 TBM 患儿的临床特征不典型, 在疾病初期并无明确的头痛、喷射性呕吐等中枢神经系统症状, 目前临床多应用病理学染色镜检、MTB 培养、免疫学检查等进行 TBM 的病原学检测。病理学染色镜检临床敏感性低; MTB 细胞壁的脂质含量较高, 影响营养物质的吸收, 故生长缓慢, 其培养周期长达 2~8 周, 且灵敏度低; 而免疫学方法 (如结核芯片、T-SPOT.TB 检测) 则受 MTB 感染时机、

既往感染、卡介苗接种及宿主免疫状态等干扰,假阴性及假阳性率均较高。近年来 GeneXpert 基因检测技术开始应用于临床,2017 年被世界卫生组织(WHO)认可,成为耐多药肺结核和结核性脑膜炎初次诊断的推荐方法,但其阳性率并不稳定。布丽红和智霞萍^[7]研究表明,286 例 TBM 患者中仅 48 例 GeneXpert MTB/RIF 检测阳性,阳性率 16.8%;而李秋平等^[8]利用 Xpert 技术检测疑似结核患者的体液标本 638 份,阳性 245 份(阳性率 38.40%),其中 232 份 MTB 培养阳性,与 MTB 培养的符合率高达 95.5%。这是否与检测人员的操作技术有关尚不可知,但其阳性率的明显差距仍使临床医师对其灵敏度和准确度表示质疑。因此,目前医疗机构常用的结核相关实验室检查灵敏度低,在临床极易被误诊或延误诊断。

本例患儿发病时无发热等症状,仅表现为头晕及呕吐,疑似颅内占位性疾病,故住院拟行手术治疗,之后患儿出现频繁抽搐、发热及意识障碍,且意识障碍程度迅速加重,结合颅脑 MRI 及脑脊液常规和生化等辅助检查考虑患儿为中枢神经系统感染,多次行 MTB 芯片检测阴性,结核菌素试验阴性,初期 T-SPOT.TB 检测亦阴性,无法确诊 TBM。最终应用 mNGS 技术在脑脊液中检测出 MTB 基因序列,符合 MTB 感染,并排除其他感染病原体,最终确诊为 TBM 合并血管炎。

mNGS 技术是一种新型病原微生物检测技术,通过对样本中微生物核酸序列进行分析,与数据库中已有微生物的核酸序列进行比对,从而对微生物进行鉴定,可直接由患者病变脑组织、脑脊液甚至尿液中获取病原微生物信息^[9]。近年来 NGS 技术越来越多地应用于临床感染性疾病的病原学诊断,2018 年周晔等^[10]报道了 mNGS 技术对活动性结核病的诊断价值。马海畅等^[11]认为, mNGS 技术在 MTB 检测方面具有一定的优势,即使在较低基因序列数的情况下,也能够有效识别病原体,而且不受抗结核药应用后死菌的影响,同时还可以检测其他病原体,如细菌、真菌、寄生虫、DNA 病毒,一般在 36~48 h 内就能提供结果,为临床早期精准诊断提供了便利。

本例患儿初始被误诊为小脑占位性疾病,但患儿并无共济失调等表现,之后患儿反复抽搐、意识障碍迅速加重,出现中枢性呼吸衰竭,症状和体征与小脑占位性病变不符,结合颅脑 MRI 最终排除了小脑占位性病变。住院初期反复进行结核相关检查均为阴性,不能明确诊断,之后脑脊液 mNGS 技术检出 MTB 基因序列,结合患儿症状和体征等明确诊断,且 T-SPOT.TB 检测阳性,脑脊液 MTB DNA 测定阳性亦证实结核病诊断。但值得注意的是,本例患者脑脊液 mNGS 检出序列数仅为 47,考虑其原因:①可能与 MTB 为胞内菌,细胞壁不易被打破,核酸提取困难有关;②可能与 MTB 复合群成员间的同源性有关,MTB 复合群之间的核苷酸差异仅 0.01%~0.03%。因此,在临床上,对于高度疑似 MTB 感染患者,需反复送检脑脊液行 mNGS 检测,并结合其他检测方法,完成 TBM 的早期诊断。脑脊液 NGS 检测中一旦发现 MTB,即使序列数低,也需要高度警惕 TBM。近年来

脑脊液 mNGS 技术正在逐渐被应用于中枢神经系统感染性疾病的诊断^[12],在临床工作中可应用 mNGS 对儿童不典型 TBM 进行早期诊断,精准治疗,从而改善患儿预后。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 林瀛,陈小岩,俞训彬. 结核分枝杆菌 DNA 实时定量 PCR 技术在临床病理诊断中的应用[J]. 实用检验医师杂志, 2015, 7(3): 143-147. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.03.004.
- [2] Lin Y, Chen XY, Yu XB. Clinical application of real-time fluorescence quantitative PCR detection in *Mycobacterium tuberculosis* pathological diagnosis [J]. Chin J Clin Pathol, 2015, 7(3): 143-147. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.03.004.
- [3] Fan S, Ren H, Wei Y, et al. Next-generation sequencing of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of neurobrucellosis [J]. Int J Infect Dis, 2018, 67: 20-24. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.11.028.
- [4] 李颖,麻锦敏. 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版)[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(5): 531-536. DOI: 10.3760/ema.jen121430-20200228-00095.
- [5] Li Y, Ma JM. Expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing in the pathogen diagnosis in clinical moderate and severe infections (first edition) [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32(5): 531-536. DOI: 10.3760/ema.jen121430-20200228-00095.
- [6] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017 [EB/OL]. [2020-10-10]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259366>.
- [7] 黄麦玲,马艳,陈红梅,等. 44 例老年结核性脑膜炎的临床特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(8): 883-889. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2017.08.018.
- [8] Huang ML, Ma Y, Chen HM, et al. Analysis on clinical characteristics in 44 elderly patients with tuberculous meningitis [J]. Chin J Antituberc, 2017, 39(8): 883-889. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2017.08.018.
- [9] 廖亦男,罗如平,甘路民. 儿童结核性脑膜炎临床特征分析[J]. 医学临床研究, 2015, 12(10): 2056-2058. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7171.2015.10.062.
- [10] Liao YN, Luo RP, Gan LM. Clinical characteristics of tuberculous meningitis in children [J]. J Clin Res, 2015, 12(10): 2056-2058. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7171.2015.10.062.
- [11] 布红丽,智霞萍. GeneXpert/MTB/RIF 快速分子诊断在结核性脑膜炎诊断中的应用价值[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(4): 667-668. DOI: 10.11655/zgywylc.2019.04.064.
- [12] Bu HL, Zhi XP. Application value of GenExpert/MTB/RIF rapid molecular diagnosis in the diagnosis of tuberculous meningitis [J]. Chin Rem Clin, 2019, 19(4): 667-668. DOI: 10.11655/zgywylc.2019.04.064.
- [13] 李秋平,霍丽静,张雪丽,等. GeneXpert MTB/RIF 系统联合抗酸涂片镜检在结核病诊断中的价值[J]. 山东医药, 2021, 61(5): 57-59. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2021.05.015.
- [14] Li QP, Huo LJ, Zhang XL, et al. The value of GeneXpert MTB/RIF system combined with acid-fast smear in the diagnosis of tuberculosis [J]. Shandong Med J, 2021, 61(5): 57-59. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2021.05.015.
- [15] 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. DOI: 10.1016/j.jinf.2017.12.014.
- [16] 周晔,艾静文,崔鹏,等. 二代测序技术对活动性结核病患者诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(2): 153-156. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2018.02.008.
- [17] Zhou X, Ai JW, Cui P, et al. Evaluation of next generation sequencing for the diagnosis of active tuberculosis infection [J]. Chin J Antituberc, 2018, 40(2): 153-156. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2018.02.008.
- [18] 马海畅,王晓娟,王月,等. 二代测序技术在结核性脑膜炎早期诊断中的意义[J]. 医药论坛杂志, 2019, 40(5): 19-21, 25.
- [19] Ma HC, Wang XJ, Wang Y, et al. Significance of next-generation sequencing in early diagnosis of tuberculous meningitis [J]. J Med Forum, 2019, 40(5): 19-21, 25.
- [20] Tang P, Croxson MA, Hasan MR, et al. Infection control in the new age of genomic epidemiology [J]. Am J Infect Control, 2017, 45(2): 170-179. DOI: 10.1016/j.ajic.2016.05.015.

(收稿日期:2020-10-28)