



宏基因组二代测序技术对脊柱感染病原学诊断的价值

金文婷, 李娜, 周晓岗, 张尧, 黄英男, 苏逸, 姚雨濛, 缪青, 马玉燕, 李冰, 王青青, 王萌冉, 骆煜, 蔡思诗, 潘珏, 胡必杰

引用本文:

金文婷, 李娜, 周晓岗, 等. 宏基因组二代测序技术对脊柱感染病原学诊断的价值[J]. 中国临床医学, 2020, 27(4): 567-571.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200987>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

宏基因组二代测序技术对非结核分枝杆菌感染病原学诊断的价值

Etiological diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in non-tuberculous mycobacteria infection

中国临床医学. 2020, 27(4): 559-562 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201289>

宏基因组二代测序技术对慢性肺曲霉病病原学诊断的价值

Etiological diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in chronic pulmonary aspergillosis

中国临床医学. 2020, 27(4): 563-566 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201183>

宏基因组二代测序技术对医院传染性疾病预防的价值

Value of metagenomic next-generation sequencing in prevention and control of nosocomial infectious diseases

中国临床医学. 2020, 27(4): 554-558 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201747>

宏基因组二代测序技术指导下的皮肤炭疽院内感染防控1例报告

Prevention and control of nosocomial infection of cutaneous anthrax under the guidance of metagenomic next-generation sequencing: a case report

中国临床医学. 2020, 27(4): 575-577 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201737>

宏基因组二代测序技术辅助诊断波氏假阿利什霉肺部感染1例报告

Pulmonary infection caused by *Pseudallescheria boydii* diagnosed by metagenomic next-generation sequencing: a case report

中国临床医学. 2020, 27(4): 572-574 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200975>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200987

宏基因二代测序技术对脊柱感染病原学诊断的价值

金文婷, 李娜, 周晓岗, 张尧, 黄英男, 苏逸, 姚雨濛, 缪青, 马玉燕, 李冰, 王青青, 王萌冉, 骆煜, 蔡思诗, 潘珏*, 胡必杰*

复旦大学附属中山医院感染病科, 上海 200032

[摘要] **目的:**探讨宏基因二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)技术对脊柱感染病原学诊断的价值。**方法:**回顾性分析2018年1月至2019年12月复旦大学附属中山医院收治的24例疑似脊柱感染患者的病例资料,采用常规微生物培养法和mNGS技术检测脊柱组织标本。**结果:**mNGS总体检测阳性率高于常规培养法(62.5% vs 35.0%),mNGS平均耗时36~48 h,明显短于常规培养法的平均天数21.8 d。脊柱感染主要检出病原体为结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌。**结论:**mNGS能够快速检测脊柱感染病原体,为临床早期精准治疗提供重要的病原学依据。

[关键词] 脊柱感染;宏基因二代测序技术;病原学诊断

[中图分类号] R 681.2 **[文献标志码]** A

Etiological diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in spinal infection

JIN Wen-ting, LI Na, ZHOU Xiao-gang, ZHANG Yao, HUANG Ying-nan, SU Yi, YAO Yu-meng, MIAO Qing, MA Yuyan, LI Bing, WANG Qing-qing, WANG Meng-ran, LUO Yu, CAI Si-shi, PAN Jue*, HU Bi-jie*

Department of Infectious Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To explore the value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in the pathogen diagnosis of spinal infection. **Methods:** A retrospective analysis was performed in 24 hospitalized patients with spinal infection in Zhongshan Hospital, Fudan University from January 2018 to December 2019. Spinal tissues were detected by microbial culture method and mNGS. **Results:** The overall positive rate of mNGS was higher than that of culture method (62.5% vs 35.0%). The average detection time of mNGS was 36-48 h, significantly shorter than that of culture method (21.8 days). The main pathogens of spinal infection were *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. **Conclusions:** The mNGS is effective in quick detection of spinal infection pathogens, which can provide important etiological basis for early precise treatment.

[Key Words] spinal infection; metagenomic next-generation sequencing; microbiological diagnosis

脊柱感染包括脊椎骨髓炎、椎间盘炎和硬膜外脓肿,常由远处病灶血行播散至一个或多个椎体引起^[1]。感染可累及邻近椎间隙,也可在手术^[2]或椎间隙注射后发生,或从邻近软组织邻接播散而来。脊柱感染是引起腰背痛的潜在原因之一,虽然临床发病率不高,但一旦发生,如不及时和恰当治疗,将造成破坏性的损害。

导致脊柱感染最常见的病原体为金黄色葡萄球菌,其他病原体包括大肠埃希菌、念珠菌、链球菌、结核分枝杆菌、布鲁菌等^[3]。目前脊柱感染病原体的检测方法主要基于病史联合血培养或血清学

检测结果,但阳性率普遍较低,不利于疾病的早诊早治。宏基因二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)技术是新兴的病原体检测手段,已被广泛应用于血液^[4-5]、呼吸道标本^[6-7]、脑脊液^[8-9]、人工关节标本^[10-11]等多种标本的检测,取得了显著成效,但目前缺乏其在脊柱感染病原学诊断中的应用分析。因此,本研究以疑似脊柱感染患者为研究对象,采用常规微生物培养法和mNGS技术检测脊柱感染组织标本,对比诊断效能,探讨mNGS对脊柱感染病原学诊断的价值。

[收稿日期] 2020-04-28

[接受日期] 2020-05-23

[基金项目] 复旦大学附属中山医院临床研究专项基金(2018ZSLC06)。Supported by Clinical Research Funds of Zhongshan Hospital, Fudan University (2018ZSLC06)。

[作者简介] 金文婷, 硕士, 主治医师。E-mail: jin.wenting@zs-hospital.sh.cn

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-64041990, E-mail: pan.jue@zs-hospital.sh.cn; E-mail: hu.bijie@zs-hospital.sh.cn

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2018年1月至2019年12月复旦大学附属中山医院收治的疑似脊柱感染患者,共24例。纳入标准:年龄大于14周岁;临床怀疑脊柱感染;进行CT引导下脊柱病灶穿刺或脊柱手术;留取穿刺或手术组织;病理排除肿瘤性疾病;骨组织匀浆行mNGS检测及常规微生物培养。排除标准:穿刺或手术组织匀浆太少仅行常规微生物培养,未送组织行mNGS。本研究经复旦大学附属中山医院伦理委员会审核批准(No. B2017-193R),所有患者均知情并签署知情同意书。

1.2 常规微生物学培养 研磨穿刺组织标本成组织匀浆,分别接种于血琼脂平板、巧克力平板行细菌培养,接种于念珠菌显色平板、沙式葡萄糖琼脂培养基(SDA)平板行真菌培养,分枝杆菌培养系统(MGIT960)进行分枝杆菌培养。

1.3 mNGS

1.3.1 样本处理及DNA提取 穿刺组织标本经研磨成组织匀浆,取0.6~0.7 mL匀浆,经玻璃珠混合震荡后按照TIANamp DNA提取试剂盒(DP316,天根生化科技有限公司,中国)步骤提取DNA。

1.3.2 文库构建和测序 采用Agilent2100生物分析仪(Agilent,美国)质控文库插入片段大小,采用Qubit dsDNA HS分析试剂盒(Thermo Fisher,美国)质控DNA文库浓度,经环化形成单链环形结构。环化后的文库经滚环复制生成DNA纳米球(DNA nanoball, DNB)。制备好的DNB加载到测序芯片,采用BGISEQ-50高通量台式测序系统(深圳华大基因科技有限公司,中国)进行测序。

1.3.3 数据分析 测序数据下机后去除低质量的和长度小于35 bp的数据以获得高质量的数据。通过BWA(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)比对,

将高质量数据中比对人参考基因组序列的数据去除。剩余数据在去除低复杂度序列后与专用的微生物大数据库比对,并将比对后的数据按照病毒、细菌、真菌和寄生虫等进行分类和排列。

1.4 mNGS阳性标准 细菌:种水平覆盖度为其他任何微生物10倍以上(结核分枝杆菌复合群严格比对序列数至少1条);真菌:种水平覆盖度为其他真菌5倍以上;病毒:种水平覆盖度为其他病毒5倍以上。

1.5 统计学处理 采用Microsoft Office 2017及SPSS 20.0处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以 $n(\%)$ 表示。

2 结果

2.1 一般资料分析 疑似脊柱感染患者共24例,男性17例,女性7例;年龄14~78岁,平均年龄为(54.0±19.0)岁,红细胞沉降(56.2±19.6)mm/h, C-反应蛋白(46.7±62.5)mg/L。

2.2 阳性率比较 结果(图1A)显示:共24例样本,mNGS阳性结果17例,符合临床诊断的结果15例,2例不确定,符合临床诊断的阳性率62.5%(15/24)。4例因穿刺标本有限,仅送mNGS检测,未送常规微生物培养。常规微生物培养7例阳性结果,阳性率为35.0%(7/20)。

2.3 检测时间比较 结果(图1B)显示:mNGS平均检测时间为36~48 h,明显低于常规培养的检测出平均时间21.8 d。

2.4 病例检测结果与临床诊断符合情况 结果(图2)显示:符合临床诊断的15例患者中结核分枝杆菌6例,金黄色葡萄球菌5例,大肠埃希菌2例,马尔尼菲蓝状菌1例,诺卡菌1例。常规培养阳性共7例,其中6例与mNGS结果一致,1例培养结果为野油黄单胞菌(考虑污染可能性大)。

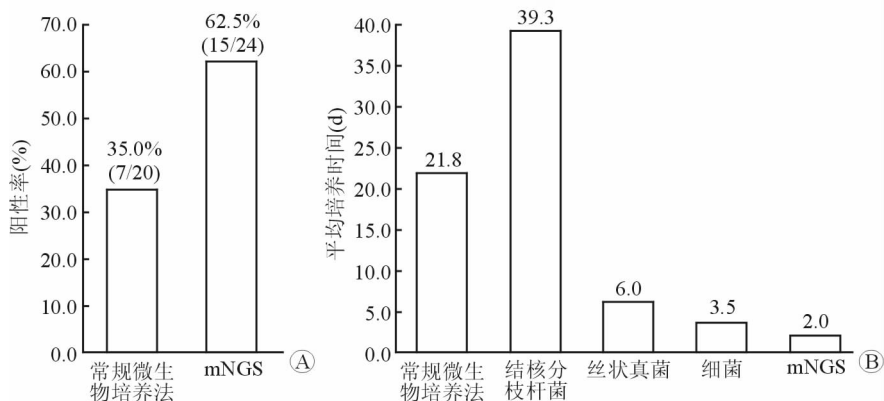


图1 常规微生物培养法和mNGS的阳性率(A)和检测时间(B)比较

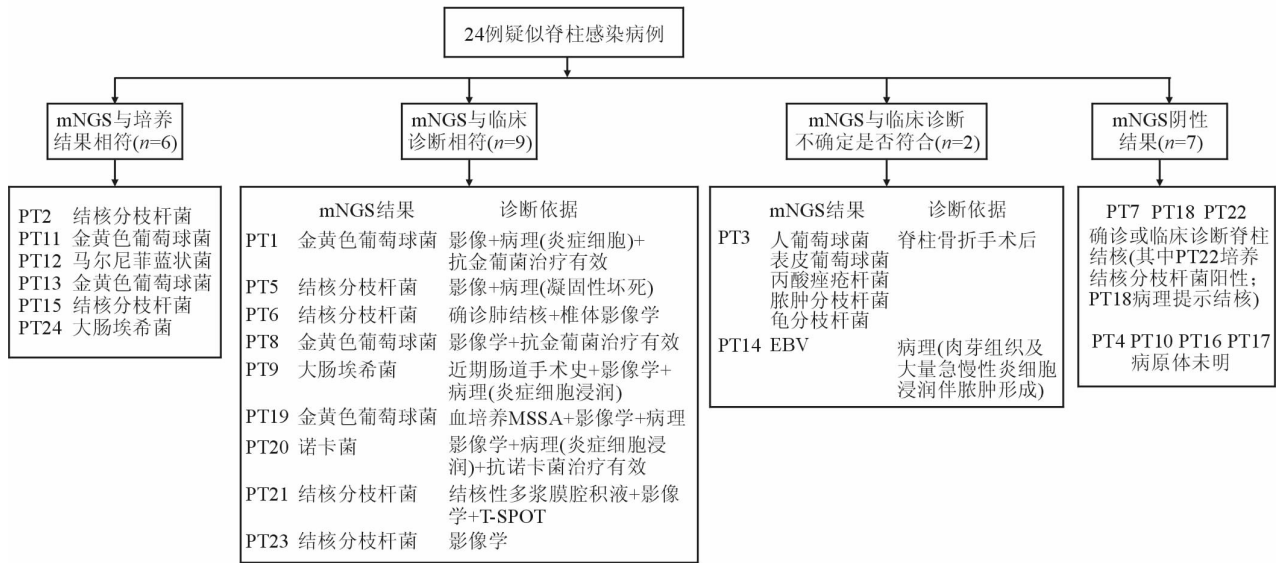


图2 24例病例样本检测结果与临床诊断符合情况

MSSA: 甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌; T-SPOT: 结核菌感染 T 细胞斑点试验; EBV: EB 病毒

2.4 典型病例简介 在常规微生物培养结果阴性情况下, mNGS 额外检出 9 例符合临床意义的病原体, 其中结核分枝杆菌 4 例, 金黄色葡萄球菌 3 例, 大肠埃希菌 1 例, 诺卡菌 1 例。现将其中 3 例典型病例报告如下。

2.4.1 典型病例 PT6 男性, 61 岁, 11 个月前确诊肺结核, 至今仍处于治疗中。9 个月前开始胸背痛, 胸椎 MRI 平扫(图 3A) 示 T₉ 椎体楔形变, T₈₋₉ 椎体信号异常, T₂ 抑脂高信号, T₁ WI 呈低信号, 临近软组织稍肿胀, 信号高。CT 引导下穿刺未见肉芽肿及凝固性坏死, 抗酸染色阴性; 胸部 CT(图 3A) 示右肺上叶结节病灶伴纤维条索影。入院前胸椎 MRI 平扫(图 3B) 示 T₉ 椎体明显楔形变, T₈₋₉ 椎体信号异常, T₂ 抑脂呈高信号, T₁ WI 呈低信号, 邻近软组织肿胀、信号增高, T₈₋₉ 椎间盘内见斑片状长 T₂ WI 信号影, 椎体边缘见骨质增生征象。抗结核过程中, 脊柱病灶逐渐增大并出现压迫症状, 曾穿刺培养, 但无结核证据。脊柱穿刺组织液的细菌、真菌、分枝杆菌培养结果均为阴性, 脊柱组织经 mNGS 检出结核分枝杆菌复合群 2 条。

2.4.2 典型病例 PT20 男性, 15 岁, 腰痛 2 月就诊, 炎症标志物升高不明显, 结核菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT) 结果为阴性。腰椎病灶穿刺病理仅提示慢性炎症伴纤维组织增生。腰椎 MRI(图 4A) 示 L₃ 下缘、L₄ 椎体上缘骨质破坏, 伴局部骨质硬化, 腰 L₃₋₄ 椎间隙变窄, 邻近腰大肌未见明显肿大及异常强化灶。该患者影像学不排除结核但依据不足, 外院仍建议抗

结核治疗, 且用药后消化道副反应明显。穿刺组织 mNGS 检出诺卡菌属, 为该患者提供了重要的病原学依据, 抗诺卡菌治疗后复查 MRI(图 4B) 明显好转。

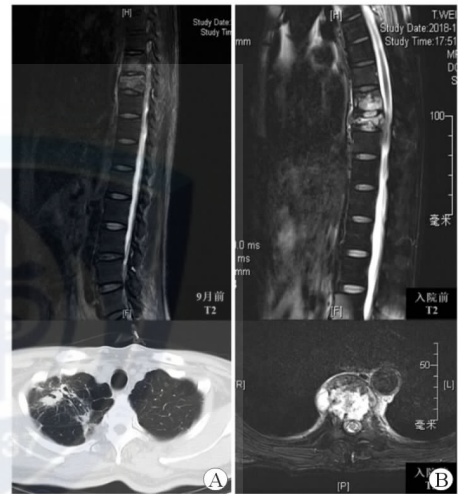


图3 PT6 脊柱结核合并肺结核影像学资料

A: 9 个月前胸椎 MRI 平扫(上)和胸部 CT(下); B: 入院前胸椎 MRI 平扫(上)和 T₈₋₉ 椎间盘 CT(下)

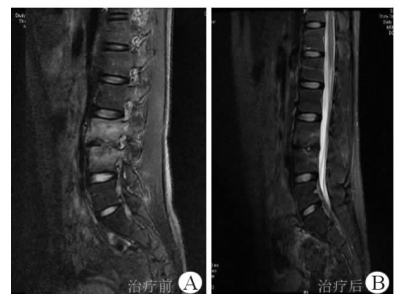


图4 PT20 诺卡菌脊柱感染治疗前后腰椎 MRI 图像

A: 治疗前腰椎 MRI; B: 抗诺卡菌治疗后复查 MRI

2.4.3 典型病例 PT24 男性,68岁,因发热待查收治入院,外院曾血培养示大肠埃希菌。入院后炎症标志物升高,多次血培养结果均阴性,血 mNGS 检出大肠埃希菌序列。因无法确定脊柱病灶是否可用大肠埃希菌血流感染一元论解释,行 CT 引导下胸椎病灶穿刺,病理结果示:部分为骨组织,骨组织中骨小梁间可见增生纤维组织、骨髓造血组织,其部分区可见大量中性粒细胞及嗜酸粒细胞浸润,倾向急性炎症。PET/CT(图 5A、5B)示 L₃ 椎体及 L₄ 椎体后部见溶骨性骨质破坏伴糖代谢异常增高,最大标准摄取值(SUV 值)分别约为 15.2 和 14.4;腰椎 MRI(图 5C)示 L₃ 信号异常,T₁WI 呈稍低信号,T₂WI 呈不均匀稍高信号,显著强化,L₄ 椎体见可疑类似信号,椎管前缘局部强化。骨组织 mNGS 检出大量大肠埃希菌序列(种严格序列数 8 116 条)。

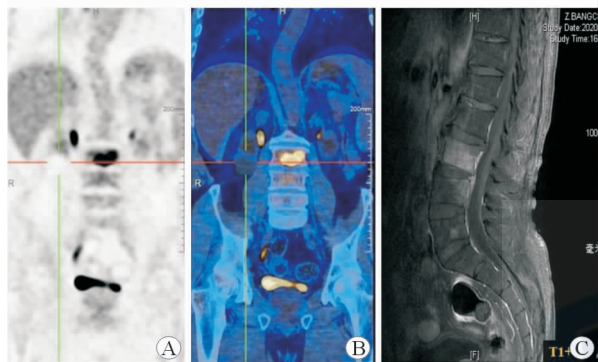


图 5 PT24 大肠埃希菌脊柱感染腰椎 PET/CT 及 MRI 图像
A: CT 图像; B: PET 图像; C: MRI 图像

3 讨论

脊柱感染发病率低,感染病科、骨科及影像科医生很难将其与非感染性疾病区分,且很难鉴别感染病原体,更多会经验性抗感染治疗。mNGS 是一种非培养技术,能够快速全面地检测病原体,之前研究^[12]结果也显示,mNGS 具有更高的病原体鉴定灵敏度,且受抗生素暴露影响小。

对于难以诊断的脊柱感染病例,诊断性穿刺活检是确诊并鉴别诊断的最佳方案。但有研究^[13]显示,经 CT 引导下穿刺的阳性率为 47%~100%。但若穿刺前接受过抗感染治疗,活检微生物结果可能会出现假阴性。本研究结果也显示,组织病理诊断缺乏特异性,对结核、真菌等感染部分可有肉芽肿改变、抗酸染色或过碘酸希夫染色(PAS)、六胺银染色阳性的结果,但对于细菌性感染组织学可能并

无特异性改变,只表现为炎症细胞浸润或脓肿形成。

本研究结果显示,mNGS 的总体阳性率高于常规培养(62.5% vs 30.0%),检出病原体主要为结核分枝杆菌,骨结核在肺外结核中发病率约为 10%^[14]。本研究检出率高可能与中国结核患者基数大及本病区收治病种有关。其次为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌,细菌性病原体的检出情况与既往文献报道^[2]相符。分枝杆菌及其他细菌的 mNGS 检出率都高于常规培养,且检测时间上存在明显优势,36~48 h 即可取得结果,而分枝杆菌培养、真菌培养通常耗时较长,阳性率低,故 mNGS 在检出阳性率及检出时间上均有优势。以往研究^[15]显示,对于培养阳性率低或培养时间长的病原体,mNGS 检测具有优势,与本研究结论一致。图 2 中 mNGS 与临床诊断情况相符的患者中,在疾病诊治早期,mNGS 为治疗方案的决策提供了非常重要的依据。

mNGS 因其具有无靶病原检测的特性,理论上可检测样本中所有微生物信息,可能检出多种病原体,也可能出现检出多种病原体但无法确定致病病原体或无法确定是否与临床相符的情况^[16]。例如 PT3 脊柱骨折术后发热患者,mNGS 检出大量人葡萄球菌、表皮葡萄球菌、丙酸痤疮杆菌和少量非结核分枝杆菌,此时还需要结合临床资料及有经验的感染病科医生来综合决策。本研究中有 3 例结核病例出现假阴性的情况,可能与结核分枝杆菌为胞内菌,目前破壁技术局限有关。

综上所述,mNGS 能够快速检测脊柱感染病原体,为临床早期精准治疗提供重要的病原学依据。

参考文献

- [1] CORNETT C A, VINCENT S A, CROW J, et al. Bacterial spine infections in adults: evaluation and management[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2016, 24(1):11-18.
- [2] DYM H, ZEIDAN J. Microbiology of acute and chronic osteomyelitis and antibiotic treatment[J]. Dent Clin North Am, 2017, 61(2): 271-282.
- [3] BERBARI E F, KANJ S S, KOWALSKI T J, et al. 2015 infectious diseases society of America (IDSA) clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of native vertebral osteomyelitis in adults[J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(6): e26-e46.
- [4] BRENNER T, DECKER S O, GRUMAZ S, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in sepsis (Next GeneSiS-Trial): study protocol of a prospective,

- observational, noninterventional, multicenter, clinical trial [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(6): e9868.
- [5] GRUMAZ S, STEVENS P, GRUMAZ C, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients[J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 73.
- [6] PENDLETON K M, ERB-DOWNWARD J R, BAO Y, et al. Rapid pathogen identification in bacterial pneumonia using real-time metagenomics[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(12): 1610-1612.
- [7] LANGELIER C, KALANTAR K L, MOAZED F, et al. Integrating host response and unbiased microbe detection for lower respiratory tract infection diagnosis in critically ill adults[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(52): E12353-E12362.
- [8] WILSON M R, SUAN D, DUGGINS A, et al. A novel cause of chronic viral meningoencephalitis: Cache Valley virus [J]. *Ann Neurol*, 2017, 82(1): 105-114.
- [9] WILSON M R, NACCACHE S N, SAMAYOA E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(25): 2408-2417.
- [10] RUPPÉ E, LAZAREVIC V, GIRARD M, et al. Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7718.
- [11] THOENDEL M J, JERALDO P R, GREENWOOD-QUAINTANCE K E, et al. Identification of prosthetic joint infection pathogens using a shotgun metagenomics approach [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(9): 1333-1338.
- [12] MIAO Q, MA Y, WANG Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(suppl_2): S231-S240.
- [13] FANTONI M, TRECARICHI E M, ROSSI B, et al. Epidemiological and clinical features of pyogenic spondylodiscitis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16 Suppl 2: 2-7.
- [14] United States Centers for Disease Control and Prevention. Reported tuberculosis in the United States, 2016[EB/OL]. (2018-03-29) [2020-03-03] https://www.cdc.gov/tb/statistics/reports/2016/pdfs/2016_Surveillance_FullReport.pdf.
- [15] ZHANG H C, AI J W, CUI P, et al. Incremental value of metagenomic next generation sequencing for the diagnosis of suspected focal infection in adults[J]. *J Infect*, 2019, 79(5): 419-425.
- [16] CHIU C Y, MILLER S A. Clinical metagenomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6): 341-355.

[本文编辑] 翟铖铖, 贾泽军

