

· 综述 ·

宏基因组测序在骨关节感染诊断中的应用前景[△]

李 韬, 高琪乐, 刘少华, 郭超峰*

(中南大学湘雅医院骨科脊柱外科, 湖南长沙 410008)

摘要: 骨关节感染 (osteoarticular infections, OAI) 在临床上仍然是一种危害严重的疾病。准确和早期发现引起骨关节感染的病原体, 对于实施临床治疗很重要。传统的技术检测速度慢、阳性率低。因此, 特别需要发展出更好的方法或技术来确定引起骨关节感染的病原体。近年来, 越来越多的研究报道了宏基因组测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 检测骨关节感染病原体速度快、特异性和灵敏度高, 可作为有效的诊断工具。本文总结了主要传统技术在骨关节感染病原体诊断中的应用, 并讨论了宏基因组测序在骨关节感染病原体诊断中的应用前景。

关键词: 宏基因组测序, 骨关节感染, 病原体, 诊断

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 10-0898-04

The application prospects of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of osteoarticular infections // LI Tao, GAO Qi-le, LIU Shao-hua, GUO Chao-feng. Department of Spinal Surgery and Orthopaedics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: Osteoarticular infections (OAIs) are still serious diseases in clinical practice. Accurate and early detection of the pathogens that cause osteoarticular infections remains important for administering clinical treatment, however, the traditional detection methods is time consuming with lower positive rate. Therefore, it is necessary to develop better methods or techniques for determining the pathogens responsible for OAIs. In recent years, an increasing number of studies have reported that metagenomic next-generation sequencing (mNGS) is a fast approach with high specificity and sensitivity, and has potential to be used as an effective diagnostic tool. This article summarizes the application of major traditional techniques in the diagnosis of OAIs, and discuss the prospects of mNGS in the diagnosis of OAIs.

Key word: metagenomic next-generation sequencing, osteoarticular infections, pathogens, diagnosis

骨关节感染 (osteoarticular infections, OAIs), 又称骨和关节感染 (bone and joint infections, BJIs), 包括假体周围关节感染 (periprosthetic joint infections, PJI)、骨髓炎等, 在世界范围内都很常见。假体周围关节感染 (PJI) 是关节置换术后的灾难性并发症, 目前其全球发病率约为 2%^[1]。患者年龄以及相关微生物的类型和菌株, 均会影响骨关节感染的严重程度和治疗疗效。因此, 鉴定病原微生物是诊断和调整抗生素治疗的必要条件, 但传统细菌培养的高阴性率给临床治疗方案的选择带来了很大的困扰及挑战^[2,3]。目前仍然没有好的方法或技术来确定引起骨和关节感染的病原体, 以便早期正确治疗。近年来, 兴起的宏基因组测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) / 临床宏基因组 (clinical metagenomics, CMg), 包括第二代和第三代测序, 已被用于

检测包括关节液在内的多个样本中的病原体^[4]。

本文总结了传统技术在 OAIs/BJIs 诊断中的应用和现有技术的优势及局限性, 并讨论了 mNGS 在 OAIs 诊断中的潜力, 展望 mNGS 在未来的应用前景。

1 骨关节感染病原体鉴定的现状

骨关节感染 (OAIs), 可能对骨骼发育和功能造成严重后果, 需要早期诊断和及时的规范治疗^[5]。因此, 及早鉴定 OAIs 病原体对于治疗及减少其相关并发症极为重要。

OAIs 的传统诊断技术包括培养、病原特异性抗体或抗原的检测和微生物核酸 (DNA 或 RNA) 的分子鉴定, 最常用的方法是聚合酶链反应。然而, 传统的微生物培养方法虽然是大多数医院的主要诊断方

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.10.07

[△]基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82072460); 湖南省自然科学基金项目 (编号: 2019JJ40525; 2019JJ40523; 2020JJ4892)

作者简介: 李韬, 在读硕士研究生, 研究方向: 脊柱感染, (电话) 19198052406, (电子信箱) taoli91@csu.edu.cn

* 通信作者: 郭超峰, (电话) 18073111375, (电子信箱) guochaofeng2016@126.com

法,但是时间长、灵敏度低,而且受到许多因素的影响,如以前使用抗生素、病原体的选择性和生物膜粘附种植体表面的能力^[6]。近年来,分子诊断学已广泛应用于OAI的诊断,然而,不能识别真菌和多微生物感染,并且敏感性不高^[7]。虽然有多种检测病原体的综合方法,但高达60%的病例无法检测出致病菌,这迫使医生使用广谱抗生素,增加了耐药细菌的发病率^[8]。

在2017年之前,宏基因组学还未应用于BJIs样本^[9]。在2017年,有研究报道mNGS方法的使用显著提高了骨关节感染患者的病原体检测(敏感性88%,特异性89%)^[10]。在2018年的国际共识会议上,第二代测序技术被明确推荐为诊断假体周围关节感染的重要补充检查^[11]。

2 传统检测方法和技术

传统的微生物学培养是鉴定病原体的金标准。然而,培养不仅对培养基和人员有要求,而且速度慢、灵敏度低,在鉴定罕见的病原微生物和病毒方面的应用有限。初步结果通常需要2~3d,确诊则需要1周或更长时间^[12]。

组织病理学检查可用于区分致病菌的强弱毒性。组织病理学检查诊断PJI的敏感性为38.8%~96.6%,特异性为77%~100%,但未能检出致病菌^[13]。

大量研究表明,分子诊断的敏感性高于常规培养^[14]。16S rDNA PCR等分子检测方法结合DNA测序可以提供比培养更快、更准确的结果,在国外已得到广泛应用^[3]。Juchler等^[15]发现分子PCR无法检测骨关节感染中的大量微生物,因此需要开发新的鉴定技术^[10]。此外,分子检测方法不能识别真菌和多微生物感染,而且不是高度敏感^[7,8]。因此,分子检测是早期诊断的辅助检测手段,而不是传统培养的替代方法。发展一种快速、方便、特异的诊断方法是十分必要的。

靶向测序,如原核生物的16S rRNA测序,真核生物的18S rRNA测序,真菌的ITS rRNA测序,通过测序基因组的目标部分来识别病原体。对于选定的样本,它是高通量和敏感的检测,但是,它只涵盖选定的基因而不是整个基因组,依赖于已知微生物数据库,可能无法充分分析新的微生物^[16]。

3 宏基因组测序/临床宏基因组学

临床宏基因组学是一个新兴的医学领域。mNGS是一种对患者样本中微生物和宿主遗传物质(DNA和RNA)进行综合分析的技术,近年来逐步被应用于临床实践,为医生诊断和治疗传染病提供了有力证据^[4]。mNGS直接测序临床标本中微生物基因序列,克服了培养的缺点。Voelkerding等^[17]总结了mNGS对基础基因组学研究的重大影响,并预测了其在不久的将来应用于临床的潜力。自2013年以来,基于第三代测序(单分子实时测序)的新兴技术逐渐被用于病原体鉴定。Huang等^[18]应用mNGS诊断4例难治性非结核分枝杆菌肌肉骨骼感染,所有患者最后通过靶向抗生素抗感染和手术治愈,表明mNGS是一种新型的检测病原体的方法,预示着mNGS在未来有良好的应用前景^[19]。

与常规方法相比,mNGS有许多优点。最初的大量研究表明,mNGS在传染病诊断方面优于传统的培养方法^[10,20,21],这意味着这种新的临床检测方法也具有排除感染的能力。Miao等^[21]在511份样本中比较mNGS和培养对微生物检出率的影响,发现mNGS诊断传染病的敏感性和特异性分别为50.7%和85.7%,优于培养物,特别适用于结核分枝杆菌、病毒、厌氧菌和真菌。Huang等^[22]发现mNGS检测到的病原菌总体比例明显高于传统培养,这可能是诊断OAI的最佳方法。此外,Wang等^[23]比较了mNGS与广式聚合酶链反应(BR-PCR)诊断PJI患者关节液中病原体的一致性,发现mNGS比BR-PCR检测更敏感。许多研究表明,mNGS可以在培养结果为阴性的情况下识别病原体,甚至在使用抗生素治疗的情况下,或在病原体很少出现的情况下^[18],证明了基于mNGS的方法可以识别罕见的病原体^[24]。Miao等^[21]也发现mNGS不受抗生素使用的影响,是一种很有前途的病原学检测技术。Huang等^[22]采集了92例OAI患者的130份关节液、超声液和组织标本,发现mNGS的总敏感性(88.5%)显著高于微生物培养(69.2%),mNGS比培养诊断病原体更有价值,特别对于难以培养的病原体或曾使用抗生素治疗的患者^[22]。因此,mNGS受抗生素治疗的影响较小^[22],表明mNGS对检测样品中的低水平微生物或残留核酸具有足够的敏感性。此外,mNGS可以检测出OAI患者培养物中被遗漏的潜在病原体,有助于识别被低估的微生物,从而降低复发率^[20]。目前,培养流程需要2~14d,而mNGS在收到待测标本后,只需24~48h就能得到最终结果,这取决于临床医生使用的测序技术、模式和生物信息学软件^[25]。这将

有助于临床医生尽早调整对患者的抗菌治疗。

mNGS在传染病诊断方面很有前途,并正迅速从研究转向临床实验室^[21]。如引言部分所述, mNGS在2017年之前尚未应用于BJI样本^[9]。但近年来,关于mNGS成功检测出引起OAI的病原体越来越多。例如, Huang等^[24]报道了一种PJI病原体,在血培养瓶中进行7 d有氧和厌氧培养后发现没有生长,但最终通过mNGS鉴定为微小单胞菌,并通过翻修手术和青霉素治疗得以控制,这表明mNGS可能具有识别PJI中培养阴性罕见病原体的潜力。Ruppé等^[9]证明mNGS可以指导正确运用抗生素,对单一和多细菌骨关节感染的敏感性分别为94.1%和76.5%,并发现临床宏基因组学在OAI样本中的应用是支持传统培养的潜在工具。Street等^[10]的研究也发现mNGS可以为PJI提供准确的诊断信息,可能成为一套潜在的PJI快速诊断工具的一部分。Thoendel等^[26]报告了1例52岁的男子在全膝关节置换术后半年出现窦道炎症,反复抗生素治疗无效,所有培养和其他病原学测试均为阴性,最后利用mNGS在假体关节超声振荡液中检测到唾液支原体,随后通过PCR的靶向扩增得到证实,这表明mNGS可以检测到意外或难以检测的病原体,并指导基于基因含量分析的治疗^[26]。Thoendel等^[20]对408例髌关节、膝关节置换术的超声液体样本进行检测, mNGS检测阳性率可达94.8%,与传统检测方法基本一致,此外,相对于传统培养阴性的样本, mNGS的检出率可达43.9%,表明对于范围广泛的PJI病原体,包括难以检测导致培养阴性感染的病原体,宏基因组测序技术可能是一个强有力的工具^[20]。Ivy等^[27]利用mNGS和传统培养检测了168例全膝关节置换术失败需要翻修的假体关节液样本,发现mNGS比培养具有更高的敏感性和特异性,可以检测潜在的感染,这对培养阴性的患者特别有用。最近,发表在Nature Medicine的一篇论文也指出mNGS是诊断不明体液感染的一种有前途的工具^[19]。因此, mNGS是诊断PJI的新型有力工具。

目前,一个完整的mNGS分析可以在24~48 h内完成,成本约3 000元。由于目前的临床实践中mNGS的成本较高,大多数情况下只有在常规检测失败后才考虑使用^[28]。虽然目前mNGS的价格相对昂贵,但对病原微生物的准确识别非常重要,有效的抗菌治疗可以改善预后,对康复和降低治疗成本极为重要^[29]。近年来,随着mNGS的成本降低,运用于诊断骨和关节感染的前景更加广阔^[10],并最终可能取

代一些方法如培养、抗原检测和PCR方法,但仍有许多传统方法,如病毒血清学测试,将继续发挥感染诊断和研究的重要作用^[28]。

在OAI样品中运用mNGS也存在一些限制。首先, mNGS也可能导致不正确或不一致的结果,甚至产生假阴性^[20],由于测序长度短、数据库不完整等,可能会被错误分类^[30]。对mNGS报告的另一种解释可能比较复杂的情况是,来自瞬时菌落、实验室环境或空气等背景信号的出现也会对mNGS检测结果产生干扰^[31],增加mNGS结果解释的复杂性^[8]。如何建立一个最佳阈值并从背景生物体中识别真正的病原体,对mNGS检测而言仍然是一个挑战。因此,在未来的临床工作中, mNGS检测还需要开发一种标准化算法,以便更准确地区分致病微生物体和背景污染物。

mNGS在感染性疾病诊断方面具有很大的吸引力,特别是传统检测方法局限的领域^[32, 33]。mNGS是一项正在积极开发的复杂技术,受到成本、方法标准化和数据分析工具等诸多因素的影响^[32, 34]。目前的研究正在努力解决这些不足^[35], mNGS也逐渐被越来越多的医师视为诊断感染问题的最后手段。

总之, mNGS检测速度快,具有高特异性和敏感性,能有效帮助临床医师开始精准、早期的抗生素治疗,并及时调整抗生素方案。它是骨和关节感染诊断方法的有效补充,甚至是必要的检测方法。因此, mNGS可作为OAI病原体检测的有效诊断工具,在临床运用的前景将更加广阔。

参考文献

- [1] Kurtz SM, Lau E, Watson H, et al. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States [J]. J Arthroplasty, 2012, 27 (8 Suppl): 61-65.
- [2] Ilharborde B, Bidet P, Lorrot M, et al. New real-time PCR-based method for *Kingella kingae* DNA detection: application to samples collected from 89 children with acute arthritis [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47 (6): 1837-1841.
- [3] Marín M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, et al. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50 (3): 583-589.
- [4] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20 (6): 341-355.
- [5] Dodwell ER. Osteomyelitis and septic arthritis in children: current concepts [J]. Curr Opin Pediatr, 2013, 25 (1): 58-63.
- [6] Tzeng A, Tzeng TH, Vasdev S, et al. Treating periprosthetic joint infections as biofilms: key diagnosis and management strategies [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 81 (3): 192-200.

- [7] Huang Z, Wu Q, Fang X, et al. Comparison of culture and broad-range polymerase chain reaction methods for diagnosing periprosthetic joint infection: analysis of joint fluid, periprosthetic tissue, and sonicated fluid [J]. *Int Orthop*, 2018, 42 (9) : 2035–2040.
- [8] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141 (6) : 776–786.
- [9] 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.
- [10] Street TL, Sanderson ND, Atkins BL, et al. Molecular diagnosis of orthopedic-device-related infection directly from sonication fluid by metagenomic sequencing [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55 (8) : 2334–2347.
- [11] Shohat N, Bauer T, Buttaro M, et al. Hip and knee section, what is the definition of a periprosthetic joint infection (PJI) of the knee and the hip? Can the same criteria be used for both joints: proceedings of international consensus on orthopedic infections [J]. *J Arthroplasty*, 2019, 34 (2S) : S325–327.
- [12] Bernard L, Sadowski C, Monin D, et al. The value of bacterial culture during clean orthopedic surgery: a prospective study of 1,036 patients [J]. *Infection Control Hospital Epidemiol*, 2004, 25 (6) : 512–514.
- [13] Bauer TW, Bedair H, Creech JD, et al. Hip and knee section, diagnosis, laboratory tests: proceedings of international consensus on orthopedic infections [J]. *J Arthroplasty*, 2019, 34 (2S) : S351–359.
- [14] Gan C, Hu J, Cao Q, et al. Rapid identification of pathogens involved in pediatric osteoarticular infections by multiplex PCR [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (5) : 203.
- [15] Juchler C, Spyropoulou V, Wagner N, et al. The contemporary bacteriologic epidemiology of osteoarticular infections in children in Switzerland [J]. *J Pediatr*, 2018, 194:190–196.
- [16] Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, et al. Metagenomics: the next culture-independent game changer [J]. *Frontiers Microbiol*, 2017, 8: 1069.
- [17] Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics [J]. *Clin Chem*, 2009, 55 (4) : 641–658.
- [18] Huang Z, Zhang C, Fang X, et al. Identification of musculoskeletal infection with non-tuberculous mycobacterium using metagenomic sequencing [J]. *J Infection*, 2019, 78 (2) : 158–169.
- [19] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids [J]. *Nat Med*, 2021, 27 (1) : 115–124.
- [20] Thoendel MJ, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, et al. Identification of prosthetic joint infection pathogens using a shotgun metagenomics approach [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67 (9) : 1333–1338.
- [21] 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) : S231–240.
- [22] Huang Z, Zhang Z, Yang B, et al. Pathogenic detection by metagenomic next-generation sequencing in osteoarticular infections [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10:471.
- [23] Wang CX, Huang Z, Fang X, et al. Comparison of broad-range polymerase chain reaction and metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of prosthetic joint infection [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 95 (1) : 8–12.
- [24] Huang Z, Zhang C, Li W, et al. Metagenomic next-generation sequencing contribution in identifying prosthetic joint infection due to *Parvimonas micra*: a case report [J]. *J Bone Joint Infect*, 2019, 4 (1) : 50–55.
- [25] Simner 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.
- [26] Thoendel M, Jeraldo P, Greenwood-Quaintance KE, et al. A novel prosthetic joint infection pathogen, *Mycoplasma salivarium*, identified by metagenomic shotgun sequencing [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65 (2) : 332–335.
- [27] Ivy MI, Thoendel MJ, Jeraldo PR, et al. Direct detection and identification of prosthetic joint infection pathogens in synovial fluid by metagenomic shotgun sequencing [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56 (9) : e00402–00418.
- [28] Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18 (7) : 605–615.
- [29] Singh JA, Yu S. The burden of septic arthritis on the U.S. inpatient care: a national study [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (8) : e0182577.
- [30] McIntyre ABR, Ounit R, Afshinnekoo E, et al. Comprehensive benchmarking and ensemble approaches for metagenomic classifiers [J]. *Genome Biol*, 2017, 18 (1) : 182.
- [31] Bukowska-Osko I, Perlejewski K, Nakamura S, et al. Sensitivity of next-generation sequencing metagenomic analysis for detection of RNA and DNA viruses in cerebrospinal fluid: the confounding effect of background contamination [J/OL]. *Adv Exp Med Biol*, 2016. Doi:10.1007/5584-2016-138
- [32] Han D, Li Z, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity [J]. *Critical Rev Microbiol*, 2019, 45 (5–6) : 668–685.
- [33] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. *Ann Rev Pathol*, 2019, 14 (2) : 319–338.
- [34] Simner PJ, Miller HB, Breitwieser FP, et al. Development and optimization of metagenomic next-generation sequencing methods for cerebrospinal fluid diagnostics [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56 (9) : e00472–00418.
- [35] Luan Y, Hu H, Liu C, et al. A proof-of-concept study of an automated solution for clinical metagenomic next-generation sequencing [J]. *J App Microbiol*, 2021, 131 (2) : 1007–1016.

(收稿:2021-06-01 修回:2021-09-06)
(同行评议专家: 赵明伟 张 强)
(本文编辑: 宁 桦)