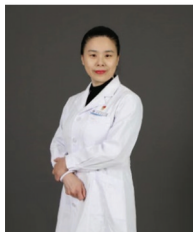


• 临床研究 •



专家介绍:

贾晨光,2008年毕业于河北医科大学。河北省胸科医院主任医师,教授,硕士生导师,在读博士。从事临床专业20余年,对脊柱、关节结核有深入研究,擅长脊柱结核、关节结核、化脓性脊柱炎、脊柱肿瘤、布鲁氏菌病脊柱炎、颈腰椎病等各种骨病的诊断与治疗,在全省范围内均居领先水平。发表多篇国家核心期刊文章,SCI,专利多项,科研课题,奖项。被评为河北省二层次人才。石家庄市拔尖人才和河北省拔尖人才。

靶向二代测序技术在骨关节布氏菌病临床诊断中的应用价值研究

姚晓伟,赵桂松,李卓,董昭良,刘树仁,贾晨光*

(河北省胸科医院骨科,河北石家庄 050041)

[摘要] 目的 评价靶向二代测序(targeted next generation sequencing, tNGS)技术在骨关节布氏菌病病原学诊断中的应用价值。方法 收集河北省胸科医院收治的108例疑似骨关节布氏菌病患者的病例资料进行研究,主要根据流行病学史、临床表现、影像学表现、实验室和病原学检查结果及抗布氏杆菌治疗效果进行临床综合诊断。根据最终临床诊断将患者分为骨关节布氏菌病组78例和非布氏菌病组30例。所有患者入院后均进行血清试管凝集试验(serum agglutination test, SAT)检测、采用CT导航穿刺或者手术取病灶组织样本进行细菌学培养(培养法)和tNGS检测。以最终临床诊断为参照标准,比较以上3种检测方法对骨关节布氏菌病的诊断效能。结果 108例疑似骨关节布氏菌病患者中,tNGS检测骨关节布氏菌病的阳性率(60/108,55.56%)明显高于SAT检测(57/108,52.78%)和培养法(25/108,23.15%),差异有统计学意义($\chi^2=24.982,37.934,P<0.001$)。以最终临床诊断为标准,tNGS检测、SAT检测和培养法检测骨关节布氏菌病的敏感度分别为76.92%、64.10%和32.05%,特异度分别为100.00%、76.67%和100.00%,诊断符合率分别为83.35%、67.59%和50.92%,Kappa值分别为0.799、0.590和0.504。结论 tNGS在骨关节布氏菌病患者的病原学诊断中具有较高的病原体检出率和敏感度,为骨关节布氏菌病患者的精准诊治提供重要参考。

[关键词] 布鲁杆菌病;骨关节炎;二代测序;诊断 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.10.013

[中图分类号] R516.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)10-1206-06

Study on the application value of targeted second-generation sequencing technology in the clinical diagnosis of osteoarticular brucellosis

YAO Xiao-wei, ZHAO Gui-song, LI Zhuo, DONG Zhao-liang,

LIU Shu-ren, JIA Chen-guang*

(Department of Orthopedics, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang 050041, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the application value of targeted next generation sequencing (tNGS) technology in the pathogenic diagnosis of osteoarticular brucellosis. **Methods** Case data of 108 patients with suspected osteoarticular brucellosis were included in Hebei Chest

[收稿日期]2024-05-31

[基金项目]河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目
(20191231)

[作者简介]姚晓伟(1983-),男,河北石家庄人,河北省胸科医院副主任医师,医学硕士,从事骨与关节感染性疾病诊治研究。

* 通信作者。E-mail:314072036@qq.com

Hospital. The comprehensive clinical diagnosis was primarily based on an analysis of the epidemiologic history, clinical manifestations, imaging findings, results of laboratory and pathogenic examination, and the effect of anti-Brucella treatment. The patients were classified into two groups: the osteoarticular brucellosis group ($n=78$), and the non-brucellosis group ($n=30$) based on the final clinical diagnosis. All patients underwent a serum agglutination test (SAT), CT navigational puncture or surgical sampling of lesions for bacteriological culture (culture method) and tNGS after admission to the hospital. The diagnostic efficacy of these three tests for osteoarticular brucellosis was then compared using the final clinical diagnosis as the reference standard. **Results** Among the 108 patients with suspected osteoarticular brucellosis, the positive rate of osteoarticular brucellosis detected by tNGS (60/108, 55.56%) was significantly higher than that of the SAT test (57/108, 52.78%) and culture method (25/108, 23.15%), suggesting significant differences ($\chi^2=24.982, 37.934, P<0.001$). The sensitivity of the tNGS test, SAT test and culture method for detecting osteoarticular brucellosis was 76.92%, 64.10% and 32.05%, respectively, when the final clinical diagnosis was taken as the criterion. The specificity was 100.00%, 76.67% and 100.00%, respectively, and the diagnostic compliance rate was 83.35%, 67.59% and 50.92%, respectively, with a Kappa value of 0.799, 0.590 and 0.504, respectively. **Conclusion** TNG has been demonstrated to have a high pathogen detection rate and sensitivity in the pathogenic diagnosis of patients with osteoarticular brucellosis, thereby providing an important reference for the precise diagnosis and treatment of patients with osteoarticular brucellosis.

[Key words] brucellosis; osteoarthritis; nextgeneration sequencing; diagnosis

布氏杆菌病是一种临床中较少见的人畜共患性疾病,属自然疫源性疾病,常常侵袭骨关节部位引起感染性病变,形成骨关节布氏菌病。为非对称性,单发或多发,晚期可发展为关节强直、肌肉挛缩、畸形、瘫痪造成终身残疾。其临床症状表现不一,影像学表现缺乏特异性,临床诊断较困难,误诊率比较高,常误诊为结核分支杆菌或其他细菌感染等^[1]。目前骨关节布氏菌病的诊断主要依据临床表现、血清学检查和细菌培养。临床表现和初筛试验有助于早期发现疑似病例,血清学试验是诊断布氏杆菌病的基础性检验,细菌培养是诊断布氏杆菌感染的金标准,但是细菌培养的阳性率较低,且耗时较长,延误疾病及时治疗。另外,经验性广谱抗生素使用也会导致细菌培养的阳性率降低。因此,在临床上确诊布鲁氏杆菌病需要结合流行病学、临床表现、影像学表现、实验室和病原学检查结果等进行临床综合诊断。靶向二代测序(targeted next generation sequencing, tNGS)技术是在大规模平行测序之前对特定感兴趣的基因组区域进行 PCR 选择性富集,一种新研发的病原微生物检测手段,是相对于一代 DNA 测序技术而言的新型测序技术。目前,tNGS 已应用于多种感染性疾病的病原学诊断^[2],并表现出良好的诊断性能。目前有报道关于 tNGS 技术检出布氏杆菌

序列,确诊布氏杆菌病,但仅为病案报道或者小队列研究^[3],参考价值有限。本研究评估 tNGS 技术检测对骨关节布氏菌病的诊断价值,以及其作为一种新型的检测技术在骨关节布氏菌病同时感染其他病原体检测中的应用价值,提高临床医师对骨关节型布氏杆菌患者感染的诊疗水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集分析 2022 年 1 月—2024 年 1 月河北省胸科医院骨科收治的 108 例疑似骨关节布氏菌病患者的临床资料。包括患者性别、年龄、流行病学史、临床表现、血清试管凝集试验、病灶组织培养、tNGS 检查结果等。根据流行病学史、临床表现、影像学表现、实验室和病原学检查结果及抗布氏杆菌治疗效果进行临床综合诊断。以临床诊断病例为标准,分为布氏杆菌病组(78 例)和非布氏杆菌病组(30 例)。

本研究经河北省胸科医院科研项目伦理审核批准(批准编号 2022071 号),所有患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

纳入标准:①患者临床症状、体征、实验室检查及影像学检查疑似骨关节型布氏杆菌病;②患者行感染病灶组织活检(通过 CT 引导下穿刺活检或手术

中留取)、tNGS、组织培养及血清学试验检查。需同时满足以上2条标准。排除标准:①临床资料不完整;②未行病灶组织培养、tNGS或血清学试验检查。③合并艾滋病等影响检测结果的疾病。

根据《中华人民共和国卫生部,布鲁氏菌病诊疗指南》^[4],疑似患者为:符合临床表现(有发热、多汗、关节疼痛、乏力、厌食、肌肉疼痛、体重减轻或局灶器官累及心内膜炎、肝脾肿大、睾丸炎、附睾炎等),且流行病学相关,与疑似或确诊动物、患者或污染动物制品、培养物有接触史、生活在布鲁菌病流行区、与菌苗的生产、使用和研究有密切关系等。确诊患者为:①发病前有畜、畜产品、布鲁杆菌培养物等接触史或有布鲁杆菌病流行区游历史;②布鲁杆菌病全身症状表现,X线、CT或MRI证实骨关节受累,符合骨关节型布鲁杆菌病特点;③血清学检查中一项及以上阳性及病理结果证实为非结核性肉芽组织,从患者临床标本中或者血培养分离出布鲁杆菌^[5]。

1.2 研究方法 入院时完善血常规、C反应蛋白、红细胞沉降率、血清试管凝集试验等相关实验室检查。同时完成X线、CT及MRI检查,评估骨关节局部骨破坏、脓肿情况。

1.2.1 血清学检查 血清试管凝集试验(serum agglutination test, SAT),为每份待检血清准备5只小试管,分别加入生理盐水。在第1管中加入待检血清,依次稀释至第5管。将稀释后的血清与稀释好的抗原液混合,放置温箱中孵育18~24 h。根据凝集反应程度判读结果。布鲁菌病试管凝集试验血清效价在1:100及以上者为阳性,1:50为可疑,1:25及以下为阴性^[6]。

1.2.2 细菌培养 所有患者均经过彩色超声或CT定位引导下穿刺或手术途径获取感染病灶核心部位的组织样本,分别对病灶标本进行细菌培养。标本先在琼脂干培养基中进行接种,然后在哥伦比亚血琼脂平板上35 °培养18~24 h,发现琼脂干培养基中有菌落出现,且显示菌群为致病菌,则结果为阳性^[7]。

1.2.3 tNGS检测

1.2.3.1 样本处理和DNA提取 术中获取标本装入不同的无菌容器,送至实验室(中国上海冰缘医学检验实验室)。脓液标本,直接使用玻璃珠破壁处理,黏稠的脓液标本先进行液化处理;骨组织标本切成小块研磨后,再进行破壁处理。具体破壁方法如下:在破壁管中加入1 g直径0.5 mm的玻璃珠,再加入0.6 mL处理好的标本,2 800~3 200 r/min高

速振荡30 min,取300 μ L按照NATIANamp Micro DNAKit试剂盒(DP316,北京天根生化科技有限公司)流程进行核酸提取。提取后将DNA超声破碎至200~300 bp左右的片段。

1.2.3.2 文库构建和测序 使用Agilent 2100Bioanalyzer和QubitdsDNA HS Assay Kit(Thermo Fisher Scientific Inc)进行文库片段大小和文库浓度质控。采用上海冰缘医疗研发的GenSeizer靶向捕获建库技术,先使用大量针对目标基因的引物组对待测样品中的核酸进行超多重PCR扩增,以靶向富集基因扩增产物,再通过一轮PCR反应给不同样本的扩增产物加上特定的测序接头和标签,即完成文库构建。将DNA文库变性解开为单链环形DNA,然后进行滚环复制扩增生成DNB纳米球。之后加载到测序芯片,利用MGISEQ-2000测序平台进行测序。高通量测序平台(圣湘测序平台)。

1.2.3.3 生物信息学分析 测序数据去除低质量和短reads序列(长度<35 bp),使用Burrows-Wheeler alignment(BWA; <http://bio-bwa.sourceforge.net>)将高质量reads数据比对到人参考基因组序列,去除比对上的序列,判定该部分为人源宿主序列。将剩余的reads序列使用病原专用的微生物数据库比对,数据库包括临床常见的4 000多种病原微生物:细菌、真菌、寄生虫、DNA病毒、RNA病毒等,以及细菌重要的耐药基因和毒力基因提供快速鉴定。通过比对算法获得能够匹配到各种病原体特异序列的reads数目,根据序列数的高低以及临床其他检测来判断可能的病原体。

1.3 统计学方法 应用SPSS 21.0统计软件分析数据。计数资料比较采用 χ^2 检验,以临床诊断为参考标准,计算并比较tNGS、SAT检测及细菌培养的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率、Kappa值及约登指数。同时采用受试者工作特征曲(receiver operating characteristic curve, ROC)计算曲线下的面积,以评估三种方法在骨关节布氏菌病中的诊断价值。其中,Kappa值在0.00~0.20为极低一致性、0.21~0.40为一般一致性、0.41~0.60为中度一致性、0.61~0.80为高度一致性、0.81~1.00为完全一致;AUC的取值范围为0.5~1,AUC值越大,越说明该诊断方法效果越好。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者一般资料 108例患者中,男性57例,女

性 51 例, 年龄 12~66 岁, 中位年龄 43 岁; 并发 2 型糖尿病 28 例, 高血压 26 例, 冠心病 16 例; 有与牛密切接触史 49 例, 与羊密切接触史 20 例, 与犬密切接触史 16 例, 服用羊奶史 9 例; 感染部位: 颈椎 7 例, 胸椎 20 例, 腰椎 31 例, 骶椎 5 例, 髋关节 6 例, 膝关节 10 例, 踝关节 8 例, 肩关节 7 例, 肘关节 8 例, 腕关节 6 例。发热 98 例, 多汗 95 例, 骨关节疼痛 76 例。

2.2 3 种检测方法的检出阳性结果情况 108 例疑似骨关节布氏菌病患者, tNGS 检出阳性 60 例 (60/108, 55.55%), SAT 检测阳性 57 例 (57/108, 52.77%), 培养法阳性 25 例 (25/108, 23.15%)。其中, 单一 tNGS 检测阳性 31 例, 单一 SAT 检测阳性 24 例, 单一培养法阳性 12 例。tNGS 检测骨关节布氏菌病的阳性率明显高于 SAT 检测和培养法, 差异有统计学意义 ($\chi^2=24.982, 37.934, P<0.001$)。

2.3 3 种检测方法对骨关节布氏菌病的检测效能以最终临床诊断为标准, tNGS、SAT 和培养法检

测骨关节布氏菌病的敏感度分别为 76.92%、64.10% 和 32.05%, 特异度分别为 100.00%、76.67% 和 100.00%, 诊断符合率分别为 83.35%、67.59% 和 50.92%, Kappa 值分别为 0.799、0.590 和 0.504, NGS 与临床诊断结果的一致性程度较强, SAT 和培养与临床诊断结果的一致性中等。30 例非骨关节布氏菌病组患者中, 7 例患者 SAT 检测阳性, 考虑为假阳性, 追问患者未有畜牧接触史, 可能为患者的血清发生非特异性的凝集所导致的, 而 tNGS 和培养法均未在非布氏菌病组患者中检测出阳性, 特异度均为 100.00%。见表 1。绘制 tNGS、SAT 和培养法诊断骨关节布氏菌病的 ROC 曲线, tNGS 检测、SAT 检测和培养法的 AUC 值分别为 0.978 (95% CI: 0.942~1.000)、0.687 (95% CI: 0.504~0.870) 和 0.609 (95% CI: 0.438~0.780), 三者对临床诊断结果的诊断价值均较高, 以 tNGS 检测为最高 (图 1)。

表 1 108 例疑似布氏菌骨关节感染患者经 tNGS、SAT 试验及培养法检测情况

Table 1 Detection of 108 patients with suspected osteoarticular brucellosis using tNGS, SAT test, and culture method

(n=108, 例数)

NGS	临床诊断		SAT	临床诊断		培养法	临床诊断	
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性
阳性	60	0	阳性	50	7	阳性	25	0
阴性	18	30	阴性	28	23	阴性	53	30
敏感度	76.92%		敏感度	64.10%		敏感度	32.05%	
特异度	100.00%		特异度	76.67%		特异度	100.00%	
阳性预测值	100.00%		阳性预测值	87.72%		阳性预测值	100.00%	
阴性预测值	62.50%		阴性预测值	45.09%		阴性预测值	36.14%	
符合率	83.35%		符合率	67.59%		符合率	50.92%	
约登指数	0.769		约登指数	0.407		约登指数	0.320	
Kappa 值	0.799		Kappa 值	0.590		Kappa 值	0.504	

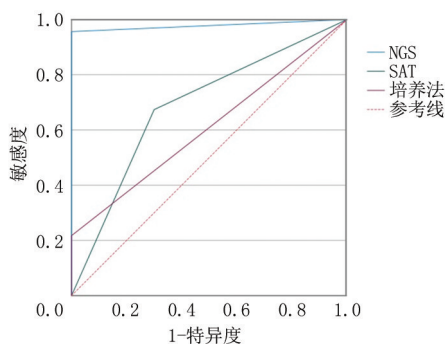


图 1 tNGS、SAT 和培养法诊断骨关节布氏菌病的受试者操作特征曲线

Figure 1 Receiver operating characteristic curves of tNGS, SAT, and culture methods in the diagnosis of osteoarticular brucellosis

2.4 tNGS 的检测情况 78 例骨关节布氏菌病患者中, tNGS 累计检出病原菌 64 例次。其中检出单

一布氏杆菌 56 例次, 包括羊型布氏杆菌 17 例次, 牛型布氏杆菌 39 例次; 有 4 例患者分别检测出布氏杆菌和另一种病原体 (金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌 1 例); tNGS 对布氏杆菌的检出率 76.92% (60/78), 明显高于 SAT 检测 [64.10% (50/78)] 和培养法 [32.05% (25/78)], 差异有统计学意义 ($\chi^2=8.473, 24.575, P<0.001$)。另外, tNGS 检出布氏杆菌属序列范围为 $10\sim 8\times 10^6$ 序列数; 其中序列数 $\leq 1\times 10^2$ 有 13 例, $1\times 10^2<$ 序列数 $\leq 2\times 10^4$ 有 24 例, $2\times 10^4<$ 序列数 $\leq 4\times 10^6$ 有 23 例, $4\times 10^6<$ 序列数 $\leq 8\times 10^6$ 有 18 例。

30 例非布氏杆菌感染患者, tNGS 累计检出病原菌 32 例次 (包括 10 个菌属, 分别是葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌、链球菌、结核分支

杆菌、沙门菌、嗜麦芽窄食单胞菌、非结核分支杆菌、曲霉菌);检出频次最高的为金黄色葡萄球菌(7例次),其次为结核分支杆菌(5例次),再次为大肠埃希菌(4例次)。28例患者为单一病原体感染,2例患者同时检测出2种病原体。观察到的病原体序列范围为 $1 \times 10^2 \sim 8 \times 10^4$ 序列数,其中 $1 \times 10^2 < \text{序列数} \leq 2 \times 10^4$ 有14例, $2 \times 10^4 < \text{序列数} \leq 8 \times 10^4$ 有16例。tNGS对病原体检出率[100.0%(30/30)]明显高于培养法[20.0%(6/30)],差异有统计学意义($\chi^2 = 28.800, P < 0.001$)。

3 讨 论

布氏杆菌引起骨关节感染,虽有较为明显的影像学特征^[6-7],如骨质破坏、病灶骨质增生硬化、脓肿,但是缺乏特异性,早期诊断困难。目前,临床诊断主要依赖于血清学、培养、PCR和一代测序等检查^[8-9],其中,血培养的阳性率为28%,组织培养的阳性率为20.2%。另外,经验性广谱抗生素使用也会导致血培养的阳性率降低。以往文献^[10]报道显示,在不同培养时间获得阳性结果的概率是11%~56%。血清学检测缺乏特异性,不能区分现症感染还是既往感染;血清学检测为变态免疫反应,结果易受患者自身免疫状态影响,故本研究入组患者排除了合并艾滋病、恶性肿瘤等疾病影响检测结果的疾病^[10]。PCR及一代测序虽能辅助诊断布氏菌,但是每次反应的检测核酸序列有限,难以在临床普及^[11-12]。故而需要新的诊断方法,能帮助临床医师早期、敏感、特异地诊断布氏菌感染。相比实验室细菌培养和血清学检测。tNGS是通过高通量测序和自动化生物信息分析进行检测可在短时间内将临床样本核酸序列与所有已知微生物基因组进行比对,从而精准诊断病原菌感染,作为应用于感染性疾病病原学诊断领域的新型检测技术tNGS应用于骨关节布氏杆菌病诊断的相关报道则较为少见。与传统的分子检测相比,tNGS以其病原诊断高通量、快速精准的优势,不仅克服了一代测序中引物设计靶向诊断的局限性,还能获得其耐药突变信息及毒力基因,从而协助临床诊疗。理论上,样本中所有以DNA为遗传物质的微生物都可通过tNGS检测出来,而布氏杆菌的遗传物质为DNA,所以均能检出^[13]。其是一种非培养、无偏差的检测方法,敏感度较高,检测范围更广,受抗菌药物暴露影响较小^[14-15]。可快速诊断布氏菌病,并避免实验室人员感染的风险。

tNGS检测技术具有诸多优势:可明显提升布

氏杆菌的阳性检出率,对布氏杆菌具有更好的诊断效能,同时还可以有效诊断骨关节的非布氏菌感染性疾病。既往仅有少数个案例报道。张来波等^[15]报道,应用基因组检测法诊断人工全膝关节置换术后布氏菌感染1例。曾敬等^[16]报道,采用NGS法诊断布氏杆菌性脊柱炎1例。目前尚无关于tNGS检测对骨关节型布氏杆菌病病原微生物诊断效能的文献报道。本研究细菌培养和SAT检测的敏感度分别为32.05%和64.10%,阴性预测值分别为36.14%和45.09%,而tNGS的敏感度76.92%和阴性预测值62.50%均明显高于以上两种检测方法;此外SAT检测和培养与临床诊断一致性尚可(Kappa值分别为0.590、0.504),而tNGS与临床诊断一致性良好(Kappa值=0.799),表明tNGS较SAT检测和培养检测诊断效能更好。本检测技术与细菌学方法和血清学技术相比,在诊断布氏菌病方面具有更高的敏感度和特异度。tNGS检测还可检出合并感染的多种病原体。本研究有4例骨关节布氏菌病患者通过NGS检测出混合感染中的多种病原菌,对临床诊断、治疗、患者预后起到了关键作用。4例患者分别检测出布氏杆菌合并另一种病原体,分别为(金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌),因为其序列数较高且在报告检出的病原体排名居第2位,认为有临床意义,给予针对性治疗,随访预后良好。

本研究结果显示,与非布氏杆菌感染疾病相比,确诊为布氏杆菌感染患者经tNGS检测出布氏杆菌的序列数据差异较大,变化范围为($10 \sim 8 \times 10^4$)。其中13例患者的序列数小于100,说明仅获得了少量低于限值的布氏杆菌序列,分析原因可能为^[16-17]布氏杆菌属于胞内细菌且细胞壁较厚,在提取处理病变组织样本时因难以破壁,导致其胞外核酸释放量较少;非严格的低温运输条件,也可能加速核酸降解。当布氏杆菌为明确致病菌时,发生环境污染的可能性小,只要检测到1条杆菌复合群序列,在排除其他标本携带污染后即具有临床意义^[18-21]。因此在骨关节布氏菌病性疾病的tNGS检测报告中布氏杆菌的序列数常低于化脓菌,甚至低于常规阈值,但仍认为有诊断与治疗的临床意义^[18]。

本研究108例患者中,均出现tNGS、SAT、组织培养的假阳性、假阴性结果,笔者认为需根据检测的微生物种类一序列数目,参考感染部位的背景微生物库,结合患者的临床特征和感染相关的实验室结果来综合判读检测报告。①检出明确的致病菌,如MTB,曲霉菌等,因这类菌发生环境污染的概率

较小,即使序列数较低,也要考虑可能为致病性病原体;②检出易于引起局灶脓肿或软组织感染的化脓菌,如葡萄球菌、链球菌、铜绿假单胞菌等,当其序列数较高且在报告检出的病原体排名居第1~2位,可认为有临床意义;③检出非结核分枝杆菌,需要结合序列数、临床及影像学表现、组织病理检查,以及非结核分枝杆菌菌种培养鉴定和分子生物学诊断方法来进一步明确诊断。

目前 tNGS 检测临床应用中的尚存诸多困惑:

①1次检测可见多种微生物的序列,本研究结果中也有所体现,但应注意检测结果会受到人源性细胞、定植和污染背景微生物的干扰,推荐在层流手术室采集感染病灶标本,并在采集后立即放置在无菌容器内以尽量缩短与空气环境接触的时间^[19]。②测序数据量和生物信息分析缺乏标准化测序过程和结果仍缺乏质控标准。笔者认为需根据检测的微生物种类一序列数目,参考感染部位的背景微生物库,结合患者的临床特征、病史、流行病学史^[20],以及其他感染相关的实验室检测结果来综合判读 tNGS 检测报告。因此,在布氏菌病诊断中应用 tNGS 检测方法仍存在以上一些问题,需要加以注意,以保证诊断结果的准确性和精准性。

本研究仍存在一定的不足。本研究为单中心回顾性研究,样本量较少,缺乏多中心、大样本的统计数据,可能存在偏倚影响结果的精准度和可靠性;tNGS 可以识别病原体,但缺乏病原微生物药物敏感试验结果,难以监测耐药基因,只能根据临床经验性用药;tNGS 对污染微生物也高度敏感,tNGS 阳性结果的正确解读及抗感染方案治疗效力有待进一步验证。

综上所述,tNGS 可有效检出骨关节布氏菌病病原体,对骨关节布氏菌病具有较好的诊断效能,为临床经验性抗感染转为临床早期精准治疗提供重要的病原学依据,具有重要的临床应用价值。

[参考文献]

- [1] 叶红,高冉,张婧,等.脑脊液宏基因组学第二代测序在神经型布鲁菌病病原诊断试验中的比较研究[J].中华神经科杂志,2021,11(11):1128-1133.
- [2] Miller S,Chiu C. The role of metagenomics and next-generation sequencing in infectious disease diagnosis[J]. Clin Chem, 2022,68(1):115-124.
- [3] Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 33(1): e00073-19.
- [4] 地里下提·阿不力孜,范俊,马良,等.布鲁氏菌性脊柱炎诊断及治疗专家共识[J].中国防痨杂志,2022,44(6):531-538.
- [5] 白雪帆,曹武奎,陈智,等.布鲁菌病诊疗专家共识[J].中华传染病杂志,2017,35(12):705-710.
- [6] 高玉芬,李淑慧,杜晓.试管凝集试验与虎红平板凝集试验对布鲁氏杆菌病的诊断价值[J].临床医学研究与实践,2021,2(5):115-118.
- [7] 王志超,张伟,王月磊,等.宏基因组二代测序辅助诊断 Q 热脊柱感染 1 例报道[J].实用骨科杂志,2024,30(3):272-274.
- [8] 王杰,张强.布鲁氏菌性脊柱炎诊断和治疗研究进展[J].中国矫形外科杂志,2021,7(14):1304-1307.
- [9] 黄智,辛大奇,肖宇龙,等.后路短节段内固定治疗腰椎布鲁氏菌性脊柱炎[J].中华骨科杂志,2021,41(20):1467-1475.
- [10] Esmailnejad-Ganji SM, Esmailnejad-Ganji SMR. Osteonrtic lar manifestations of human brucellosis: A review[J]. World J Orthop, 2019,10(2):54-62.
- [11] 刘佩云,宋兴月,刘瑞,等.病原体靶向高通量测序技术对肺结核的诊断价值[J].热带医学杂志,2024,24(5):647-661.
- [12] 金珂,王晓娟,关涛志,等.二代测序在中枢神经系统布鲁菌感染中的应用[J].中华临床感染病杂志,2020,6(3):195-198.
- [13] 张文升,齐立明,张耀,等.宏基因组二代测序技术在布鲁菌脊柱炎诊治中的应用价值[J].临床骨科杂志,2024,27(2):284-288.
- [14] Elbehiry A, Aldubaib M, Marzouk E, et al. The development of diagnostic and vaccine strategies for early detection and control of human brucellosis, particularly in endemic areas[J]. Vaccines (Basel), 2023,11(3):654.
- [15] 张来波,孙水,李伟,等.宏基因组检测法诊断人工全膝关节置换术后布氏杆菌感染一例[J].中华老年医学杂志,2022,39(11):1340-1344.
- [16] 曾敬,赵洪普,尹德龙,等.采用 mNGS 法诊断布氏杆菌性脊柱炎 1 例[J].中国骨与关节损伤杂志,2019,1(1):103-104.
- [17] Dadar M, Alamian S, Brangsch H, et al. Determination of virulence-associated genes and antimicrobial resistance profiles in brucella isolates recovered from humans and animals in iran using NGS technology[J]. Pathogens, 2023,12(1):82.
- [18] 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.
- [19] Zhao M, Tang K, Liu F, et al. Metagenomic next-generation sequencing improves diagnosis of osteoarticular infections from abscess specimens: a multicenter retrospective study[J]. Front Microbiol, 2020,11:2034.
- [20] 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.
- [21] Geng SK, Mei Q, Zhu CY, et al. Metagenomic next-generation sequencing technology for detection of pathogens in blood of critically ill patients[J]. Int J Infect Dis, 2021, 103: 81-87.