

## · 病例报告 ·

第 2 代测序技术诊断芬戈尔德菌假体周围感染  
1 例报告

董伊隆, 钱约男, 张侠, 蔡春元

(温州医科大学附属第三医院, 浙江 温州 325200)

关键词 序列分析, DNA; 假体相关感染; 关节成形术, 置换, 膝

中图分类号: R37

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.02.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Diagnosis of periprosthetic infection by the second generation sequencing: a case report** DONG Yi-long, Qian Yue-nan, Zhang-xia, and CAI Chun-yuan. The Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325200, Zhejiang, China

**KEYWORDS** Sequence analysis, DNA; Prosthesis-related infections; Arthroplasty, replacement, knee

患者,女,68岁,2017年5月因右膝骨性关节炎行右全膝关节置换术(total knee arthroplasty,TKA)(图1a,1b)。术后3个月门诊随访时右膝关节功能恢复良好。术后12个月(2018年5月12日),患者出现右膝持续肿胀,并伴有持续疼痛,无发热,自行在当地卫生所输注克林霉素7d,肿胀消退,疼痛好转。2018年5月28日,再次出现右膝肿胀、疼痛,遂来我院就诊。专科检查:右膝前可见TKA术后瘢痕,愈合良好,右膝关节肿胀(图1c),浮髌试验阳性,右膝关节皮温高,膝关节内外侧间隙及髌骨周围压痛阳性,右膝关节活动度正常,屈伸活动 $0^{\circ}\sim 120^{\circ}$ ,右膝关节内外侧应力试验阴性,前后向稳定性好。X线检查显示:右膝关节软组织肿胀,假体位置良好,无骨折或松动迹象。实验室检查:白细胞 $6.32\times 10^9/L$ ,中性粒细胞62.7%。血沉27mm/h,C-反应蛋白32mg/L。根据肌肉骨骼感染协会(musculoskeletal infection society,MSIS)感染诊断指南<sup>[1]</sup>,患者还无法确诊为假体周围感染(periprosthetic joint infection,PJI)。故在2018年5月30日,行膝关节腔穿刺抽液。抽取关节液10ml,进行细菌培养及鉴定。将关节液分别进行需氧和厌氧培养,均培养5d,未见细菌生长。

2018年6月4日,再次行膝关节腔穿刺抽液,抽取关节液5ml,即刻冷冻(液氮冷冻), $-20^{\circ}C$ 保存。用TIANamp微DNA试剂(DP316,天根生物技

术)直接从临床样品中提取DNA。通过DNA片段化、末端修复、连接和PCR扩增构建DNA文库。Agilent 2100用于DNA文库的质量控制。通过BGISEQ-50平台对质量合格的DNA文库进行排序<sup>[2]</sup>。通过去除低质量、低复杂度、 $<35$ bp的读数来产生高质量测序数据。利用Burrows-Wheeler-Read数据处理和分析消除人类序列的影响<sup>[3]</sup>。然后将剩余的数据对准微生物基因组数据库,微生物基因组数据库包括细菌、病毒和真菌。删除重复读取获得映射数据,最后分析高级数据。其中微生物基因组数据是从美国国家生物技术信息中心下载的(FTP://FTP.NCBI.NLM.NIH.gov/基因组)。本研究所用的数据库包含2473个细菌属、4061个与人类疾病相关的病毒种类、199个与人类感染相关的真菌种类和135个与人类疾病相关的寄生虫。其资料来自SOAP网站(<http://SOAP.GnEngor.org.cn>)。该标本产生179292原始序列(raw reads),这些量满足分析标准。过滤掉低复杂度和较短的读取后,读取被映射到人类基因组,分别产生166822条高质量序列,将高质量序列进行进一步操作分类单元分析(operational taxonomic unit,OTU)分析,生成129个OTU。在细菌门水平,该标本检出大芬戈尔德菌(96.54%),为了便于统计分析,在单个标本中将细菌种类所占比例 $<1\%$ 归为“其他”(图1d,1e)。

2018年6月10日,根据第2代测序技术(next-generation sequencing,NGS)结果,再次膝关节腔穿刺抽液,抽取关节液3ml,并将0.1ml关节液接种于厌氧血平板,置于 $35^{\circ}C$ ,厌氧培养96h后形成白色扁平半透明菌落,直径约1mm。革兰氏染色为革兰氏

基金项目:温州科技局科技项目(编号:Y20180308)

Fund program: Science and Technology Project of Wenzhou Science and Technology Bureau (No. Y20180308)

通讯作者:董伊隆 E-mail: dongyilongdel@sina.com

Corresponding author: DONG Yi-long E-mail: dongyilongdel@sina.com

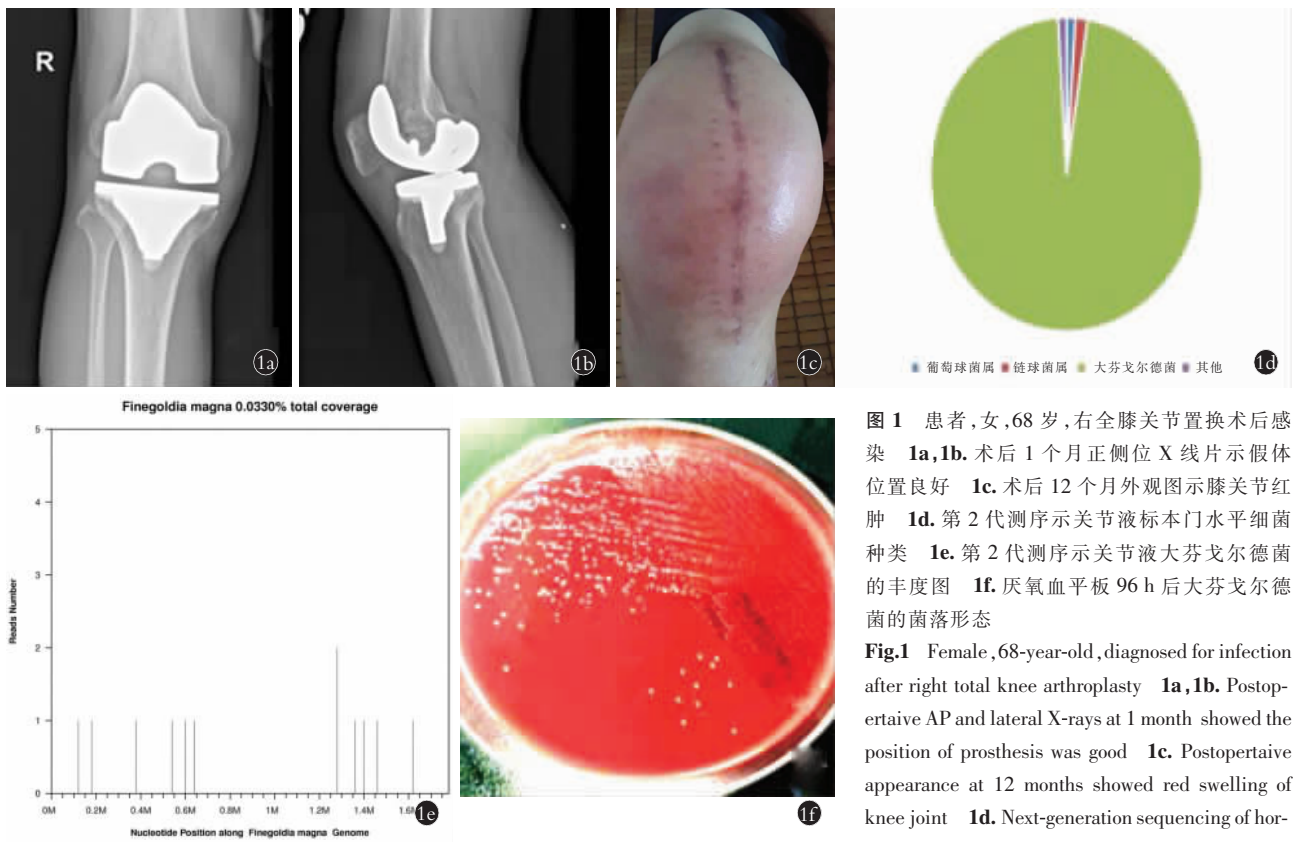


图 1 患者,女,68 岁,右全膝关节置换术后感染 1a,1b. 术后 1 个月正侧位 X 线片示假体位置良好 1c. 术后 12 个月外观图示膝关节红肿 1d. 第 2 代测序示关节液标本门水平细菌种类 1e. 第 2 代测序示关节液大芬戈尔德菌的丰度图 1f. 厌氧血平板 96 h 后大芬戈尔德菌的菌落形态

Fig.1 Female, 68-year-old, diagnosed for infection after right total knee arthroplasty 1a,1b. Postoperative AP and lateral X-rays at 1 month showed the position of prosthesis was good 1c. Postoperative appearance at 12 months showed red swelling of knee joint 1d. Next-generation sequencing of horizontal bacteria in synovial fluid 1e. Next-generation sequencing showed abundance of daifingold bacteria in joint fluid 1f. Colony morphology of daifingold bacteria by anaerobic blood plate for 96 hours

tion sequencing showed abundance of daifingold bacteria in joint fluid 1f. Colony morphology of daifingold bacteria by anaerobic blood plate for 96 hours

阳性球菌,成对、成簇排列,耐氧试验未生长,手工生化反应不活泼。经 Vitek MS 质谱仪鉴定结果为大芬戈尔德菌(置信度为 98%)(图 1f)。同时药敏发现大芬戈尔德菌对万古霉素敏感。

2018 年 6 月 16 日,根据 NGS 结果、细菌培养和药敏结果,患者行膝关节旷置术,术后 4 周静脉注射万古霉素,随后暂停抗生素 2 周,监测血沉和 C-反应蛋白无异常。2018 年 8 月 1 日行膝关节翻修术。术后 6 个月随访,患者局部肿胀和疼痛等症状消失,未见感染复发。

讨论

(1)PJI 病原微生物的寻找。PJI 被认为是人工关节置换术后灾难性的并发症,给患者带来了巨大的经济、心理负担,还会增加患者术后死亡率。PJI 的发病率在全髋关节置换术 (total hip arthroplasty, THA) 后约为 1%,而 TKA 后为 1%~2%<sup>[3]</sup>。流行病学调查研究显示,PJI 是膝关节置换术后翻修的首要原因<sup>[4]</sup>。然而,PJI 的正确诊断是关节翻修手术的关键。一般关节置换术后患者出现体温升高、静息痛的症状,或出现关节局部发红,皮温升高,肿胀等体征往往提示可能存在 PJI<sup>[1]</sup>。但许多患者并无上述症状和体征,单纯依靠临床表现诊断 PJI 并不可靠。为此,2011 年,MSIS 发布了 PJI 诊断指南<sup>[1]</sup>,主要包括 2 项

标准:(1)存在与假体相通的窦道。(2)两次关节液或组织培养为同一细菌。而在临床中,往往出现细菌培养阴性。一些研究表明细菌培养阴性 PJI (culture-negative PJI, CN-PJI) 的发病率达 50%<sup>[5]</sup>。临床医生由于不知道感染的有机体,就无法有效地监测患者对治疗的反应,并确定感染是否得到控制。感染是关节置换术后罕见但令人恐惧的并发症。治疗是艰巨的,往往导致较差的临床结果。为了最大限度地发挥治疗效果,必须准确识别病原微生物,正确的病原体鉴定对于获得抗生素敏感性和减少抗生素的应用范围是必要的<sup>[6]</sup>。传统的关节液抽取培养已经成熟,但仍存在一些缺陷,最大问题的是,传统的培养方法无法检测到已经形成生物膜的微生物,或者已经在成骨细胞中被内化的微生物。另外,试验样品中病原体的数量少,将阻碍培养的结果。此外,许多存在感染迹象的患者常在获得液体样品之前进行了经验性抗感染治疗,而关节抽吸前的抗生素治疗可能产生假阴性培养物<sup>[7]</sup>。鉴于这些缺点,医生们不得不探索越来越灵敏的方法来检测滑液中的 PJI 证据。因此,许多学者正致力于探索并评估一些新的诊断指标,以解决目前所面临的问题。本例突出了 CN-PJI 的诊断困难,并肯定了 NGS 在识别 PJI 中病原微生物的能力。它进一步证实了一种信念,即栖息于皮肤、胃

肠道和泌尿生殖道黏膜的正常共生体可导致 PJI。

(2) NGS 的原理和优势。NGS 是目前临床上一种新的 DNA/RNA 测序方法<sup>[8]</sup>。在每个操作中产生数百万至十亿个 DNA/RNA 序列的能力使得宏基因组分析比传统的 Sanger 测序具有显著的优势。它是一个无偏的分析,因为它可以放大和测序样品的整体 DNA 含量,而不使用任何引物或探针。理论上,无偏 NGS 有助于在一次测定中识别所有潜在的病原体。利用 NGS 技术对病原菌进行综合检测有助于传染病的早期诊断。在过去的几年中,NGS 由于其低成本和快速周转时间被应用于医学微生物学。这是一种崭新的和强大的技术,可以有效提高识别病原体的能力<sup>[8]</sup>。然而,NGS 在对关节液 PJI 检测中的应用鲜有报道,本例基于 NGS 的快速、准确、全面的 PJI 关节液病原体检测方法,并比较其与传统诊断方法关节液培养在病原学诊断上的效能差异。

NGS 是一种简单、复杂的快速、准确的分子诊断方法。已释放出 43 000 余株微生物基因组,包括 38 000 种细菌和 5 000 种病毒<sup>[9]</sup>,这些数据还含有人类病原体的重要代表,它们的可用性将对微生物病原体 NGS 的检测和应用产生重大影响,能够识别常见、罕见甚至新病原体的能力。理论上,几乎所有病原体都可以根据长读数的长度、微生物基因组的生命数、核酸的特定序列以及参考数据库的完整性来确定。

(3) 治疗体会。本例患者关节液培养阴性,由于细菌培养阴性,无法确诊 PJI,就不能进行下一步治疗如手术与否。同时缺乏药敏结果,无法进行针对性的抗生素使用。正是借助 NGS 优势,通过 NGS 发现了病原体大芬戈尔德菌,该菌主要栖息于皮肤和胃肠道和泌尿生殖道黏膜作为正常共生体,占有厌氧菌感染 5%~12%,占有革兰氏阳性厌氧球菌感染的 20%~40%<sup>[10]</sup>,它被认为是假体植入术后关节感染的常见病原体之一。然而,虽然大芬戈尔德菌被描述为骨感染的常见病原体,但由于其厌氧特征和厌氧培养的复杂,使得它的检出率较低<sup>[11]</sup>。但一旦感染,由于它的缓慢生长,倾向于发展耐药,往往导致感染经久不愈。本研究第 1 次厌氧培养失败的原因如下:(1)对慢生长菌及厌氧菌认识不足,导致培养时间不足。(2)患者之前使用抗生素,导致关节液中存在的致病菌数量少。

综上所述,CN-PJI 的诊断异常困难,笔者认为有必要进一步完善诊断技术来提高诊断率。NGS 是

一种快速、准确的诊断方法,其对关节置换术后关节液中鉴定的应用研究甚少。希望通过本例的报道,可以增加对 NGS 这项技术的认识,并提高对 CN-PJI 的诊断和治疗水平。

#### 参考文献

- [1] Della Valle C, Parvizi J, Bauer TW, et al. Diagnosis of periprosthetic joint infections of the hip and knee[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2010, 18(12):760-770.
- [2] Jeon YJ, Zhou Y, Li Y, et al. The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110240-e110246.
- [3] 王伟, 刘军, 周胜虎, 等. 人工关节置换术后假体周围感染与术前贫血的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(10):971-975. WANG W, LIU J, ZHOU SG, et al. Periprosthetic joint infection after artificial joint replacement and preoperative anemia[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2018, 31(10):971-975. Chinese with abstract in English.
- [4] 高志森, 周勇刚, 杜银桥, 等. II 期翻修治疗凝固酶阴性葡萄球菌假体周围感染的临床观察[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(2):135-140. GAO ZS, ZHOU YG, DU YQ, et al. Clinical observation on the treatment of periprosthetic infection of coagulase-negative staphylococci by two-stage revision[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2018, 31(2):135-140. Chinese with abstract in English.
- [5] Shanmugasundaram S, Ricciardi BF, Briggs TWR, et al. Evaluation and management of periprosthetic joint infection—an international, multicenter study[J]. *HSS J*, 2014, 10(1):36-44.
- [6] Voleti PB, Baldwin KD, Lee GC. Use of static or articulating spacers for infection following total knee arthroplasty: a systematic literature review[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(17):1594-1599.
- [7] 董伊隆, 杨国敬, 林瑞新. 人工髋关节置换术后感染的 II 期翻修手术治疗[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(3):194-196. DONG YL, YANG GJ, LIN RX. Clinical study on second-stage revision in the postoperative infection after total hip replacement[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2010, 23(3):194-196. Chinese with abstract in English.
- [8] Minogue TD, Koehler JW, Norwood DA. Targeted next-generation sequencing for diagnostics and forensics[J]. *Clin Chem*, 2017, 63(2):450-452.
- [9] Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era[J]. *Gen Med*, 2014, 6(11):114-118.
- [10] Rosenthal ME, Rojzman AD, Frank E. *Fingoldia magna* (formerly *Peptostreptococcus magnus*): An overlooked etiology for toxic shock syndrome[J]. *Med Hypotheses*, 2012, 79(2):138-140.
- [11] Sheikh SO, Jabeen K, Qaiser S, et al. High rate of non-susceptibility to metronidazole and clindamycin in anaerobic isolates: data from a clinical laboratory from Karachi, Pakistan[J]. *Anaerobe*, 2015, 33(2):132-136.

(收稿日期:2020-07-29 本文编辑:李宜)