doi:10.11659/jjssx.01E025123

·临床研究·

宏基因组二代测序技术在脊柱感染诊断中的应用

涂 兵,陈 虎,陈钧麟,马向阳,易红蕾,蔡学究 (中国人民解放军南部战区总医院脊柱外科,广东 广州 510010)

[摘 要] **目的** 探讨宏基因组二代测序(mNGS)技术在脊柱感染诊断中的应用价值。**方法** 回顾性分析2021年1月至2024年10月我院脊柱外科收治的30例疑似脊柱感染患者的临床资料。经手术或CT引导下穿刺获取样本,分别进行mNGS检测、细菌培养及组织病理学检查。以组织病理学结果为金标准,将患者分为感染组和未感染组,比较2组患者的一般资料及感染指标,分析mNGS和细菌培养诊断脊柱感染的特异性、敏感性及检测时间。**结果** 组织病理学结果显示,4例为无菌性炎症,26例确诊为脊柱感染。2组患者在年龄、性别及红细胞沉降率(ESR)、C反应蛋白(CRP)、白细胞计数(WBC)等指标方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。在26例脊柱感染患者中,mNGS检测阳性23例,细菌培养阳性9例。mNGS可检出多种病原微生物,包括金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、结核分枝杆菌及厌氧菌等,且部分病例在细菌培养阴性时仍能通过mNGS明确病原学诊断。mNGS检测时间明显短于细菌培养($P<0.05$)。mNGS诊断脊柱感染的敏感性明显高于细菌培养($P<0.05$),但两种方法诊断的特异性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** mNGS在脊柱感染的病原学诊断中具有更快的检测速度和更高的敏感性,可有效弥补传统细菌培养的局限,有望在疑似脊柱感染患者的病原学诊断中广泛应用。

[关键词] 脊柱感染;宏基因组二代测序;细菌培养;病原学诊断;敏感性
[中图分类号] R681.5;R446.5 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-01-23

Application value of metagenomic next-generation sequencing technology in the diagnosis of spinal infections

TU Bing, CHEN Hu, CHEN Jun-lin, MA Xiang-yang, YI Hong-lei, CAI Xue-jiu (Department of Spine Surgery, General Hospital of the Southern Theater Command of the People's Liberation Army, Guangzhou Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective To explore the application value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) technology in the diagnosis of spinal infections. **Methods** A retrospective analysis was conducted on 30 patients with suspected spinal infections who were treated in the department of spine surgery of our hospital from January 2021 to October 2024. Samples obtained by surgery or CT-guided puncture were subjected to mNGS detection, bacterial culture and histopathological examination respectively. Taking histopathological results as the gold standard, the patients were divided into the infected group and the uninfected group. The general data and infection indicators of patients in the two groups were compared, and the specificity, sensitivity and turnaround time of mNGS and bacterial culture in diagnosing spinal infection were analyzed. **Results** Histopathological results showed that 4 cases were aseptic inflammation and 26 cases were diagnosed as spinal infection. There were no statistically significant differences in the age, gender, erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), or white blood cell count (WBC) of patients between the two groups ($P>0.05$). Among the 26 patients with spinal infections, 23 cases were positive for mNGS detection and 9 cases were positive for bacterial culture. mNGS could detect a variety of pathogenic microorganisms, including Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis and anaerobic bacteria, etc. Furthermore, mNGS established an etiological diagnosis in some cases where bacterial culture was negative. The turnaround time of mNGS was significantly shorter than that of bacterial culture ($P<0.05$). The sensitivity of mNGS in diagnosing spinal infections was significantly higher than that of bacterial culture ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference in the specificity of the two diagnostic methods ($P>0.05$). **Conclusion** mNGS has a faster turnaround time and higher sensitivity in the etiological diagnosis of spinal infections, which can effectively make up for the limitations of traditional bacterial culture and is expected to be widely used in the etiological diagnosis of patients suspected of spinal infections.

Keywords: spinal infection; metagenomic next-generation sequencing; bacterial culture; etiological diagnosis; sensitivity

脊柱感染是临床上一类复杂且棘手的疾病,其发病率虽较低,但一旦发病,往往进展迅速,若未能及时准确诊断并施以有效治疗,可能导致严重的神经功能障碍,甚至危及患者生命[1]。脊柱感染的诊断难点在于其临床表现多样,且早期症状易与脊柱退行性疾病相混淆。此外,脊柱特殊的解剖结构和复杂的生物力学环境也为病原微生物的准确识别带来了挑战[2-3]。

[基金项目] 国家自然科学基金(82272582);广州市科技计划项目(201803010046)
[通信作者] 蔡学究,E-mail:2677157234@qq.com

脊柱感染的传统诊断依赖于病史询问、体格检查、影像学检查和细菌培养等手段。然而,这些方法在敏感性、特异性和时效性方面都存在一定的局限。细菌培养虽然是脊柱感染诊断的重要依据,但在实际操作中常因采样困难、病原微生物数量少或生长条件特殊等导致培养失败,从而延误了诊断和治疗[4]。因此,在临床实践中往往只能根据经验行抗菌治疗,这可能导致耐药菌株出现,增加后续治疗的难度。

宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)作为一种新兴的高通量基因组学技术,近年来在感染性疾病的诊断中展现出巨大的潜力[5]。mNGS通过对临床样本中的DNA或RNA进行高通量测序,能够全面、快速地识别样本中细菌、病毒、真菌、寄生虫等病原微生物,且不受病原微生物数量、生长条件及耐药性等限制[6]。与传统的培养技术相比,mNGS具有显著优势,尤其能够识别难以培养的病原微生物,从而提供更加精准的诊断。随着技术的发展和测序成本的逐渐下降,mNGS逐步应用于脊柱感染的诊断,并显示出良好的前景[7-8]。然而,目前针对脊柱感染领域,仍缺乏对mNGS的系统性研究。

本研究通过回顾性分析的方法,对比mNGS与传统方法在诊断脊柱感染中的敏感性、特异性和时效性等,进一步验证mNGS技术在脊柱感染诊断中的优势,从而推动脊柱感染诊断技术的革新,也为临床提供更为精准、高效的诊断方法,以期提高患者的治疗效果和改善预后。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性分析2021年1月至2024年10月在我院脊柱外科诊治的30例疑似脊柱感染患者的临床资料,其中男16例,女14例。根据组织病理学结果,将患者分为感染组和未感染组。纳入标准:处于感染早期(出现腰背痛、活动受限、发热等脊柱感染相关症状时间≤4周);年龄>18岁;于CT引导下穿刺或者手术获取感染组织样本;组织样本同时进行mNGS检测和细菌培养。排除标准:穿刺或手术获取组织样本较少,仅进行细菌培养,未进行mNGS检测;组织病理学诊断为肿瘤。本研究已获得我院伦理委员会审核批准(批准号:NZLLKZ2025036),且患者均签署知情同意书。

1.2 方法

采集患者入院后静脉血样,检测红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞计数(white blood cell count, WBC)等感染相关指标,同时进行结核分枝杆菌特异性T细胞检测(T-cell spot test for tuberculosis, T-SPOT)及常规血液学检查。所有患者均在手术或CT引导下穿刺获取病灶组织样本,样本置于无菌容器中并分装处理:一部分经干冰保存后送至第三方检测机构(杭州杰毅生物技术有限公司)进行mNGS检测;一部分送至院内微生物实验室进行常规细菌培养;其余样本经福尔马林固定后送至我院病理实验室进行组织病理学检查。mNGS检测通过提取组织样本中的核酸进行高通量测序,所得序列与微生物数据库比对以识别潜在病原微生物。结合临床表现、样本类型及背景微生物情况,对mNGS结果进行综合判读。细菌培养采用常规培养方法,根据菌落生长情况及生化鉴定结果确定病原微生物类型。

1.3 观察指标

比较2组患者的临床资料。分析mNGS检测和细菌培养对病原微生物的检测情况。以组织病理学检查结果作为脊柱感染诊断的金标准,计算mNGS检测和细菌培养在诊断脊柱感染中的敏感性、特异性。比较mNGS和细菌培养的检测时间,检测时间定义为自样本送检至获得最终检测报告的时间。

1.4 统计学处理

采用SPSS 27.0统计学软件进行数据处理。对连续型变量进行正态性检验,呈偏态分布的数据以中位数(四分位间距)[$M(P_{25},P_{75})$]表示,组间比较采用*Mann-Whitney U*检验;符合正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用t检验。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用χ^2检验或*Fisher*精确检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学结果及患者临床资料

组织病理学结果显示,30例患者中4例为无菌性炎症,26例出现感染,其中腰椎感染7例、胸椎感染4例、胸腰椎感染2例、寰枢椎感染1例、颈椎感染4例、胸椎结核6例、腰椎结核2例。基于上述病理学诊断结果,将患者分为感染组(n=26)和未感染组(n=4),2组患者的年龄、性别及ESR、CRP、WBC等血液学检查结果比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 病原微生物检测结果

mNGS检测结果显示,阳性患者23例(88.46%),涵盖多种病原微生物,包括金黄色葡萄球菌(6例)、大肠埃希菌(3例)、脆弱拟杆菌(1例)、铜绿假单胞菌(1例)、长奈瑟菌(2例)、结核分枝杆菌(8例)、大芬戈

尔德菌(1例)、毗邻颗粒链球菌(1例)。细菌培养阳性9例(34.61%),最常见的病原微生物是葡萄球菌属细菌(4例)及结核分枝杆菌(3例);在17例细菌培养阴性的感染患者中,mNGS检出了14例(82.35%)阳性。在26例感染患者中,有12例检测出葡萄球菌属或结核分枝杆菌。8例T-SPOT.TB检测结果呈阳性的患者mNGS也识别到结核分枝杆菌,而细菌培养仅在其中3例患者的组织样品中检测出结核分枝杆菌。在4例未感染患者中,mNGS检测结果均为阴性。

表1 患者一般资料和感染指标分析

指标		未感染组(n=4)	感染组(n=26)	$t/\chi^2/Z$	P
年龄(岁)		62.50±15.85	63.04±13.52	−1.59	0.12
性别[例(%)]	男	3(10.00)	13(43.33)	0.99	0.32
	女	1(3.33)	13(43.33)		
ESR(mm/h)		15.75±9.18	58.68±33.55	1.17	0.25
CRP(mg/L)		6.24(3.13,9.77)	38.52(15.58,72.36)	41.62	0.54
WBC($\times10^9$/L)		5.87(5.21,6.58)	11.79(8.42,14.61)	39.49	0.33

2.3 mNGS在脊柱感染诊断中的优势

mNGS诊断脊柱感染的检测时间明显短于细菌培养(P<0.05),敏感性明显高于细菌培养(P<0.05),但两种方法诊断脊柱感染的特异性比较差异无统计学意义(P>0.05),见表2。

表2 mNGS和细菌培养诊断脊柱感染的效能对比

诊断方法		未感染(例)	脊柱感染(例)	检测时间(d)	特异性(95%*CI*)	敏感性(95%*CI*)
mNGS	阳性	0	23	1.33±0.52*	100%(93.60%~100%)	88.46%(71.20%~96.00%)*
	阴性	4	3			
细菌培养	阳性	1	9	19.29±2.71	75%(30.10%~95.30%)	34.61%(58.00%~76.30%)
	阴性	3	17			

*:与细菌培养比较,P<0.05

3 讨论

脊柱感染是临床常见病,但其病因复杂且诊断难度大,一直是临床关注的重点。传统的病原学诊断方法(如细菌培养)在脊柱感染的诊断中存在一定的局限性[9]。尤其是对于已接受抗生素治疗的患者,细菌培养的敏感性会大幅下降,从而增加了早期诊断的难度[10]。因此,研究新的检测技术,对于提高脊柱感染的诊断效率和准确性具有重要的临床意义[11]。

研究表明,mNGS能够有效识别多数脊柱感染患者的病原微生物,即使在细菌培养结果为阴性的情况下,mNGS也能检测出潜在的病原微生物[12]。在临床中,快速获得病原学证据对于脊柱感染患者的治疗至关重要。与传统细菌培养方法相比,mNGS不仅能覆盖更广泛的病原微生物,还能显著缩短检测周期[13]。本研究亦显示,mNGS的检测时间明显短于细菌培养,mNGS诊断脊柱感染的敏感性显著高于细菌培养,但二者的特异性差异不显著。mNGS通过直接提取和分析样本中的遗传物质识别病原微生物,不依赖于活菌的生长,因此即使在抗生素治疗后的病例中,依然能高效识别出病原微生物[14]。而细菌培养依赖于活菌的生长,因此其敏感性较低,尤其在患者接受抗生素治疗后,病原微生物可能无法成功培养,这增加了诊断难度[15]。

脊柱感染具有临床表现隐匿、病程进展缓慢、病原微生物种类复杂等特点,传统细菌培养存在诊断周期长、阳性率低等局限,难以快速精准诊断。既往研究显示,mNGS凭借高通量、无偏性和广覆盖的检测特点,在脊柱感染病原微生物识别方面具有显著优势[16]。本研究共纳入30例疑似脊柱感染患者,其中26例被诊断为感染;mNGS的阳性检出率为88.46%(23/26),显著高于细菌培养的34.61%(9/26),且mNGS的检测时间明显短于细菌培养。这提示相比传统细菌培养,mNGS在敏感性及检测效率上具有显著的优势。本研究进一步分析显示,在17例细菌培养阴性的感染患者中,mNGS检出14例阳性(82.35%),说明mNGS可识别大多数难培养、低负荷或慢性病原微生物[17]。尤其在结核分枝杆菌、厌氧菌、条件致病菌中,mNGS的检出率明显高于传统细菌培养[18]。本研究组织病理学检出结核性脊柱炎8例,mNGS检出8例,细菌培养仅检出3例,再次证实了mNGS对结核病原微生物的检出优势。此外,在多例细菌培养阴性但mNGS检测阳性病例中发现了葡萄球菌属、奈瑟菌属等常见致病微生物,进一步证实了mNGS在常见病原微生物检测中的可靠性。值得注意的是,本研究中mNGS检测到的病原微生物种类与细菌培养结果基本一致,主要为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌等,这一结果提示mNGS的阳性结果具有较高的可信度,且可作为临床制订抗感染治疗方案的重要依据。尤其是在急性或重症脊柱感染患者中,mNGS的快速检测能力有助于临床医生在短时间内掌握关键病原菌,为后续治疗提供参考。

本研究中有3例感染患者的mNGS检测为阴性,

可能与以下因素有关:①患者在送检前已接受抗感染治疗,导致病原微生物负荷下降;②样本中病原微生物核酸含量极低或被大量宿主DNA稀释;③样本采集位置与实际感染灶不完全一致;④mNGS数据分析中可能出现背景微生物干扰。尽管mNGS具有诸多优势,但仍存在一定局限性。mNGS无法提供药物敏感性信息,在实际治疗中,对具体药物的选择仍需依赖细菌培养的药敏结果或根据经验选择抗生素。此外,本研究中部分病例存在T-SPOT.TB阳性但mNGS与细菌培养均为阴性的情况,提示应结合免疫学检测、影像学检查与病原学检测进行综合判读,不可依赖单一指标评估感染情况。因此,mNGS更适合作为病原微生物识别的早期精准筛查工具,而细菌培养在指导抗菌药物选择方面仍不可替代[19]。mNGS与传统细菌培养具有明显互补性,两者联合应用能显著提升诊断效率与治疗效果。尽管mNGS无法替代细菌培养在药敏分析中的作用,但作为临床诊断的重要补充手段,其能显著提升脊柱感染的早期诊断率,帮助临床制订更加精准的治疗策略。未来需要更大样本量的前瞻性研究,进一步明确mNGS在不同类型脊柱感染中的诊断效能及其对临床治疗结局的影响。

本研究的局限性:①样本量相对较小,尤其是未感染患者的样本量较小,可能导致分析结果存在偏倚;②为回顾性研究,仅对临床症状和辅助检查提示可能为脊柱感染的患者进行了分析,可能影响结果的普适性。因此,未来应进行前瞻性、大样本研究进一步验证mNGS在脊柱感染诊断中的应用价值。

综上,mNGS在脊柱感染的病原学诊断中具有更高的敏感性和更快的检测速度,尤其在传统细菌培养阴性的病例中具有重要价值,其可作为脊柱感染早期诊断工具,与传统方法结合有助于提高脊柱感染的诊断效能。

[参考文献]

[1] Li Z, Zhang Q, Lian X, et al. Value of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of native pyogenic spinal infections: a multicenter, retrospective observational study[J]. Spine J, 2025, 25(4):640-648. doi: 10.1016/j.spinee.2024.11.004.

[2] 张惠叶,王 枭,史惠卿,等. 宏基因组二代测序技术在感染性疾病诊治中的应用现状[J]. 临床医药实践,2025,34(3):206-210. doi: 10.16047/j.cnki.cn14-1300/r.2025.03.005.

[3] Zhang Q, Li J, Zhang Q, et al. Influence factors of metagenomic next-generation sequencing negative results in diagnosed patients with spinal infection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2024, 109(3): 116278. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116278.

[4] 刘 建,王立楠,马宏宝,等. 脊柱结核诊断及鉴别诊断的研究进展[J]. 中国当代医药,2022,29(19):23-27. doi: 10.3969/j.issn.1674-4721.2022.19.007.

[5] Qi M, Du Y, Guan J, et al. The clinical management and efficacy of metagenomic next-generation sequencing in patients with pyogenic spinal infection: a single-center cohort study[J]. J Orthop Surg Res, 2024,19(1):716. doi: 10.1186/s13018-024-05188-8.

[6] Zhang X, Zhang L, Li Y, et al. Clinical performance of metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of invasive fungal disease after hematopoietic cell transplant[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024,14:1210857. doi:10.3389/fcimb.2024.1210857.

[7] 宋燕华,周子博,闫亚芳,等. 宏基因组二代测序在全膝关节置换术后假体周围感染诊断中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2023,33(16):1931-1933.

[8] Lv H, Liao S, Shi Z, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing for rapid molecular identification in spinal infection diagnosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1382635. doi: 10.3389/fcimb.2024.1382635.

[9] 李开华,陈 刚,夏建龙,等. 原发性化脓性脊柱感染的诊治策略[J]. 山东医药,2011,51(48):79-81. doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2011.48.036.

[10] Chen S, Wen L, Ou J, et al. Exploring the application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of unexplained pulmonary infection[J]. Int J Gen Med, 2024, 17: 2465-2474. doi: 10.2147/IJGM.S459373.

[11] 郭路明,于 龙,李力韬,等. 宏基因组二代测序技术对结核性与非结核性脊柱感染疾病的诊断价值研究[J]. 解放军医学院学报,2024,45(5):457-462. doi:10.12435/j.issn.2095-5227.2024.033.

[12] 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. doi: 10.1038/s41591-020-1105-z.

[13] 刘 春,陈照镇,袁绪浩,等. mNGS在疑似脊柱感染病原菌检测中的诊断性能研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2024,39(5):523-525. doi:10.7531/j.issn.1672-9935.2024.05.017.

[14] 艾进伟,廖文胜,陈书连,等. 宏基因组二代测序技术联合椎间孔镜下扩创治疗腰椎原发性感染[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2024,39(3):235-240. doi:10.7531/j.issn.1672-9935.2024.03.003.

[15] Kong M, Li W, Kong Q, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in cutaneous tuberculosis[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:942073. doi:10.3389/fcimb.2022.942073.

[16] Wang G, Long J, Zhuang Y, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in the detection of pathogens in spinal infections[J]. Spine J, 2023, 23(6): 859-867. doi: 10.1016/j.spinee.2023.02.001.

[17] Su LD, Chiu CY, Gaston D, et al. Clinical metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of central nervous system infections: advances and challenges[J]. Mol Diagn Ther, 2024, 28(5): 513-523. doi: 10.1007/s40291-024-00727-9.

[18] Zhang Y, Chen J, Yi X, et al. Evaluation of the metagenomic next-generation sequencing performance in pathogenic detection in patients with spinal infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:967584. doi: 10.3389/fcimb.2022.967584.

[19] Zheng Y, Qiu X, Wang T, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in lower respiratory tract infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 694756. doi: 10.3389/fcimb.2021.694756.

(编辑:杨 颖)