

宏基因组二代测序技术在脊柱感染病原微生物诊断中的应用

殷楚强¹,王海龙²,任宪锋¹,王月磊¹,沈峰¹,王亭¹

(1 青岛大学附属医院脊柱外科 266000 青岛市;2 山东大学微生物技术国家重点实验室 266237 青岛市)

【摘要】目的:探讨宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)技术在脊柱感染疾病中诊断病原微生物的能力和值。**方法:**纳入 2019 年 1 月~2020 年 12 月收治的 46 例疑似脊柱感染患者,其中男性 26 例,女性 20 例;年龄 26~77 岁(50.4±15.7 岁)。获取患者的血液和病灶组织或脓液标本(CT 引导下穿刺活检 21 例,开放手术 25 例),行微生物培养、血清学检测、病理检查和 mNGS 检测后进行结果的比较分析。**结果:**46 例标本均在 48h 内获得了 mNGS 结果,微生物培养、血清学检测、病理检查等传统实验室检测时间 1~12d 不等。经临床最终诊断共 35 例为脊柱感染,11 例为非脊柱感染。35 例脊柱感染患者中,化脓性细菌感染 14 例,结核感染 5 例,布鲁菌属感染 4 例,未明确病原微生物感染 12 例;11 例非脊柱感染患者中,脊柱肿瘤 3 例,终板 Modic 改变 4 例,终板骨折 1 例,DISH 病合并假关节 1 例,强直性脊柱炎合并假关节 2 例。通过 mNGS 检测发现了脆弱拟杆菌、微小微单胞菌、齿垢密螺旋体、贝纳柯克斯体等少见病原微生物。mNGS 在种水平与临床最终诊断的一致性为 82.61%(19/23),在属水平的一致性为 95.65%(22/23)。微生物培养阳性率为 42.86%(15/35),mNGS 检测阳性率为 94.29%(33/35),二者存在统计学差异($P<0.01$)。mNGS 检测的敏感度为 91.43%,特异度为 90.91%,阳性预测值 96.97%,阴性预测值 76.92%。**结论:**宏基因组二代测序技术检测病原微生物快速、高效、准确,在脊柱感染疾病的诊疗中有较高的诊断价值。

【关键词】脊柱感染;宏基因组二代测序;病原微生物

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2022.02.07

中图分类号:R681.2,R446 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2022)-02-0141-08

Pathogenic detection by metagenomic next-generation sequencing in spinal infections/YIN Chuqiang, WANG Hailong, REN Xianfeng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2022, 32(2): 141-148

【Abstract】 Objectives: To evaluate the application and value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in detecting pathogens from spinal infections. **Methods:** 46 samples were prospectively collected from patients who were suspected spinal infections and treated from January 2019 to December 2020. There were 26 males and 20 females, with an average age of 50.4±15.7 years (26-77 years). Blood and focal tissue or pus samples were obtained (21 samples were from CT guided biopsy while 25 samples from open surgery). Microbial culture, serological testing, pathological examination and mNGS were performed and compared pairwise in all cases. **Results:** All results of mNGS were obtained within 48 hours, and the traditional laboratory tests ranged from 1 to 12 days. Of all 46 cases, 35 were diagnosed as spinal infection and 11 cases as non-infection. 23 cases were found with microbiology evidence, including pyogenic infection(14 cases), tuberculosis(5 cases) and brucella(4 cases) infection. Still, 12 cases were clinically diagnosed as spinal infection without clear microbiology evidence. 11 cases were non-infection, including spine tumor (3 cases), endplate Modic change(4 cases), endplate fracture(1 case), Dish disease with pseudoarthrosis(1 case) and ankylosing spondylitis with pseudoarthrosis (2 cases). Rare microorganisms such as Bacteroides fragilis, Parvimonas micra, Treponema denticola and Coxiella burnetii were detected by mNGS. At the species level, the consistency between mNGS and the final clinical diagnosis was 82.61%(19/23), while that of mNGS

基金项目:青岛市惠民科技计划项目(21-1-4-rkjk-2-nsh)

第一作者简介:男(1989-),主治医师,研究方向:脊柱感染与骨质疏松

电话:(0532)82918608 E-mail:yincq@qduhospital.cn

通讯作者:王亭 E-mail:wangting@qduhospital.cn

reached 95.65%(22/23) at the genus level. The positive rate of mNGS was 94.29%(33/35), significantly higher than that of microbiological culture, which had a positive rate of 42.86%(15/35), $P<0.01$. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of mNGS were 91.43%, 90.91%, 96.97% and 76.92%, respectively. **Conclusions:** mNGS is a fast, efficient and accurate diagnostic tool for pathogenic detection. It has high diagnostic and application value in the diagnosis and treatment of spinal infection diseases.

[Key words] Spinal infection; Metagenomic; Next-generation sequencing; Pathogens

[Author's address] 1. Department of Spinal Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China; 2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao, 266237, China

脊柱感染可造成严重的后果,其预后很大程度上依赖于精准的诊断和抗感染治疗。文献报道脊柱感染的微生物培养阳性率仅为 30%~60%^[1-5]。致病微生物证据的缺失,使得患者只能依赖于经验性用药和诊断性治疗。同时广谱抗生素的大量使用,增加了并发症和耐药性发生的风险,加重了医疗负担。因此快速、准确的致病微生物检测是治疗成功的关键。宏基因组二代测序(metagenomic nextgeneration sequencing, mNGS)技术是近年来出现的诊断技术^[6,7],其可以利用二代测序技术获取样本中所有核酸片段的序列信息,经过生物信息分析与比对,检测出送检标本中所有微生物的种类及序列数量。mNGS 能检出无法培养或难培养的病原体;无偏向性地检测所有核酸,可以同时鉴定数千种细菌、真菌、病毒甚至寄生虫,适用于新的、罕见的和不典型的复杂传染病病因诊断^[8]。目前 mNGS 已应用于多种感染性疾病的病原诊断,包括中枢神经系统感染^[9,10]、循环系统感染^[11]、肺部感染^[12]、假体周围感染^[13-15]、骨与关节感染^[16]等,并表现出良好的诊断性能,已经成为应对新发传染病和暴发传染病的首选实验室方法。由于其敏感性和检测效率的优势及成本控制的进步, mNGS 有可能成为常规的诊断检查,取代部分传统的系列检测。目前有关评估 mNGS 技术用于识别脊柱感染性微生物的研究报道较少。我们对疑似脊柱感染的患者进行了 mNGS 与传统实验室检测方案的对比,旨在评估 mNGS 的诊断能力,明确其在诊断脊柱感染的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2019 年 1 月~2020 年 12 月就诊于我院疑似脊柱感染患者的资料。纳入标准:①结合临床

症状、实验室检查和影像学检查初步诊断为脊柱感染;②CT 引导下穿刺或手术获取病灶标本;③进行 mNGS 检测和“一揽子”实验室检查。排除标准:①未完成所有常规检查以及 mNGS 测试;②标本在取样、转运和处理过程中受到明显污染,或冷链转运失效;③病史不完整或不明确。根据以上纳入和排除标准,共有 46 例患者纳入本研究。本研究获得了青岛大学附属医院伦理委员会的审批,所有患者均签署了知情同意书。

1.2 检测指标

所有患者均取得血液和病灶处组织或脓液标本。血液标本于入院时采集,组织或脓液标本为 CT 引导下穿刺或开放手术直接于病灶中心处获取。所有患者的标本均以配对的方式接受传统的实验室“一揽子”检测和 mNGS 检测(图 1)。“一揽子”检测方案参考美国感染病协会成人脊柱感染诊疗指南的推荐意见^[17]。同时定期监测血常规、血沉、超敏 C 反应蛋白、降钙素原等指标。

1.3 临床诊断及致病微生物诊断标准

1.3.1 临床诊断标准^[17] ①疼痛,伴或不伴发热。②脊柱 MRI 检查提示椎间盘或椎体信号改变,伴或不伴有脓肿形成。③经实验室“一揽子”方案明确致病微生物,或未明确致病微生物但抗感染治疗有效。

1.3.2 病原微生物诊断标准 ①化脓性细菌:病灶组织或脓液标本细菌培养或血培养阳性。②布鲁杆菌:虎红平板凝集试验初筛阳性且血清凝集试验滴度 $>1:160$;或布氏杆菌培养阳性^[18]。③结核:细菌培养、抗酸染色涂片、病理检查或 PCR 任一阳性。④真菌:涂片、培养或病理任一阳性。

1.4 mNGS 检测方法

标本采集到无菌管中,立即于 -80°C 液氮冻存,然后冷链运输至华大医学检验有限公司天津



图 1 脊柱感染患者实验室检查检验和时效图: 血液进行血培养、T-spot 试验、1,3- β -D 葡聚糖检测(G 试验)、半乳糖甘露醇聚糖抗原检测(GM 试验)、虎红平板凝集试验(初筛,若为阳性则行布氏血清凝集试验);病灶组织或脓液进行涂片镜检、涂片抗酸染色、细菌培养、真菌培养、病理检查(当高度怀疑结核时加做结核定量 PCR)、宏基因组检测。黄色、绿色、棕色、灰色框体分别表示 24h、48h、3~7d、7d 及以上时间内报告结果

Figure 1 Laboratory test plan and time effect chart of patients with spinal infection. Blood culture, T-spot test, 1, 3- β -D glucan test(G test), galactose mannan antigen test(GM test) and rose bengal plate agglutination test(primary screening, and serum agglutination test if positive) were performed on blood; Smear, acid fast staining smear, bacterial culture, fungal culture and pathological examination (tuberculosis quantitative PCR when tuberculosis was highly suspected) and metagenomic detection were performed on sample tissue. The yellow, green, brown and grey boxes respectively indicate the regression report within 24 hours, 48 hours, 3-7 days, 7 days and above

实验室进行检测。核酸提取及二代测序过程如下: 在破壁管中加入 1g 直径 0.5mm 的玻璃珠, 再加入标本混合, 2800~3200 转/min 高速振荡 30min。使用超声将 DNA 随机打碎为 200~300bp 长度的核酸片段。经环化、滚环生成 DNA 纳米球。将提取好的 DNA 纳米球在 BGISEQ-500 平台(武汉华大智造科技有限公司)上行二代测序。测序产生的数据去掉低质量以及长度太短(<35bp)的序列, 获得高质量的序列, 再与人参考基因组(H19)进行比对, 去除人源序列后的序列, 与微生物参考数据库进行比对, 鉴定样本中存在的可疑致病微生物。

1.5 mNGS 报告中阳性结果定义

Liu 等^[19]的研究提示不同的实验室、测序平台和组织样本对于测序数据和结果解读的影响巨

大, 我们参考了基于同一测序平台和相似组织样本的既往文献报道提及的判读标准, 结合本组实验结果, 做出了适当的修改, 制定了以下的标准: ①化脓性细菌、布鲁杆菌: 属相对丰度>15%, 同时序列数>30 作为细菌诊断的阈值; ②真菌: 属相对丰度>15%, 同时序列数>50 作为其诊断阈值; ③结核分枝杆菌: 结核分枝杆菌测得的序列数 ≥ 1 时, 即认为阳性; ④临床上少见的病原体: 属相对丰度>10%, 同时序列数>10 作为诊断标准。因实验试剂和器材的背景微生物会影响结果, 一般来源于试剂盒、工业用超纯水、自微生物中提纯的各种酶^[20-22], 如伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、慢生根瘤菌属(Bradyrhizobium)、鞘氨醇单细胞菌属(Sphingomonas)、罗尔斯顿菌属(Ralstonia)、不动

杆菌属 (*Acinetobacter*) 和痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*) 等细菌, 以及细环病毒、人类疱疹病毒等, 判读时通常不会将背景微生物纳入致病微生物考虑范围之内。最终综合病史、各项实验室检验检查和 mNGS 结果做出诊断。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 26 (SPSS 公司, 美国) 统计软件包进行统计分析, 使用 McNemar 检验比较微生物培养和 mNGS 的阳性率。使用 Kappa 值比较 mNGS 检测结果与临床微生物证据的一致性。检验水准 α 取双侧 0.05。

2 结果

2.1 纳入病例情况

46 例患者中男性 26 例, 女性 20 例; 年龄 26~77 岁 (50.4 ± 15.7 岁)。21 例通过 CT 引导穿刺方式获得检测标本, 25 例通过开放手术获取检测标本。结合病史、临床表现、查体、实验室检验、影像学检查、术中所见等, 35 例被临床诊断为脊柱感染, 11 例为非脊柱感染 (表 1)。35 例脊柱感染病例中 22 例在获取病灶标本前使用了抗生素 (14 例疗程 $>3d$, 8 例 $<3d$), 13 例未使用过抗生素。颈椎感染 5 例, 胸椎感染 10 例, 腰椎感染 20 例。mNGS 检测全部于 48h 内完成, 传统实验室检测耗时 1~12d 不等。病例 3 最终死亡, 其余患者均治愈。

2.2 mNGS 检测结果及部分结果解读

35 例脊柱感染中, 化脓性细菌感染 14 例, 结核感染 5 例, 布鲁菌属感染 4 例, 未明确病原微生物的脊柱感染 12 例; 11 例非脊柱感染, 包括脊柱肿瘤 3 例, 终板 Modic 改变 4 例, 终板骨折 1 例, DISH 病合并假关节 1 例, 强直性脊柱炎合并假关节 2 例。在明确了病原微生物证据的 23 例患者中, 种水平上 19 例与最终结果相同, 4 例 (例 7、12、13、23) 与最终诊断不同, mNGS 与实验室检测结果的一致性为 82.61% (19/23); 在属水平 22 例与最终诊断相同, 仅 1 例 (例 23) 与最终诊断不同, mNGS 与实验室检测结果的一致性为 95.65% (22/23)。在 mNGS 的检测结果显示, 常见化脓性脊柱炎的病原微生物为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、链球菌; 其他常见感染类型为脊柱结核、布鲁杆菌脊柱炎。5 例结核感染患者均通过病理和定量 PCR 检出, 涂片、培养均为阴性, mNGS 检出序

列数分别为 542、92、24、15、3。4 例布鲁杆菌脊柱炎患者均通过血清凝集试验检出, 其中 2 例 (例 21、22) 细菌培养分别延长至第 10 天和第 12 天呈现阳性。临床确诊和 mNGS 检测均未发现真菌感染病例。

2.3 特殊病例

发现混合感染 1 例 (例 7), 该患者行牙髓根管治疗术后出现颈痛伴发热, 病程 4 月余, 临床诊断颈椎感染。术中取得了病灶中心标本, mNGS 检测结果中的细菌均为口腔内常见的牙髓炎、牙周炎致病菌。mNGS 结果回报后我们对 -80°C 保存的标本进行 16s-rRNA 检测进行了验证。该病例的抗感染方案为青霉素+甲硝唑治疗 3 个月, 最终治愈。我们分析牙髓卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体两种微生物使用常规细菌培养方法难以发育, 故细菌培养仅培育出星座链球菌。结合患者的病史及各项检测结果, 我们认为该例患者为血行播散的原发混合感染。

发现厌氧菌感染 1 例 (例 14)。该患者胸椎 (T11) 经皮椎体成形术后 1 月余出现脊柱感染。多次行血培养后提示脆弱拟杆菌阳性。使用万古霉素、泰能和甲硝唑抗感染治疗 20d 后失败, 遂行开放手术治疗。术中取得病灶处标本送检微生物培养、涂片、病理学检查及 mNGS 检测。mNGS 提示脆弱拟杆菌感染, 其余送检结果均为阴性。术后予甲硝唑联合泰能抗感染治疗 3 个月后治愈。

发现特殊感染 1 例 (例 4), 该患者间断腰痛 10 月余, 临床诊断腰椎间盘突出感染。穿刺活检结果阴性, 经验性抗感染治疗 1 周效果不佳, 行手术治疗。mNGS 检出贝纳柯克斯体阳性, 对存留标本进行了定量 PCR 验证。采用多西环素、羟氯喹、利福平抗感染治疗后治愈, 最终诊断为 Q 热。

2.4 mNGS 对致病微生物的诊断能力

在临床诊断为脊柱感染的 35 例病例中, 传统实验室“一揽子”检测方案的总阳性率为 66.67% (23/35), 而微生物培养阳性率仅为 42.86% (15/35)。mNGS 阳性率为 94.29% (33/35), 与培养阳性率相比, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。微生物培养与临床诊断的一致性较差, Kappa=0.264; mNGS 与临床诊断的一致性较好, Kappa=0.826 ($P<0.01$)。mNGS 的敏感度为 91.43%, 特异度为 90.91%, 阳性预测值 96.97%, 阴性预测值 76.92%。

表 1 临床确诊病原微生物结果与宏基因组测序结果比较及抗生素治疗方案

Table 1 Comparison of microbiological results between clinical diagnosis and mNGS, and antibiotics programmes

例 No.	临床确诊病原微生物 Pathogenic microorganisms	诊断依据 Diagnostic basis	mNGS检测结果及病原微生物序列数 Results of mNGs and sequence number	抗感染药物 Antibiotic
1-2	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	细菌培养 Bacterial culture	金黄色葡萄球菌(244,1012) Staphylococcus aureus	青霉素 Penicillin
3	MRSA	细菌培养 Bacterial culture	金黄色葡萄球菌(14379) Staphylococcus aureus	万古霉素 Vancomycin
4	贝纳柯克斯体 Coxiella burnetii	PCR	贝纳柯克斯体(20) Coxiella burnetii	多西环素 Doxycycline
5-6	肺炎克雷伯菌 Klebsiella pneumoniae	细菌培养 Bacterial culture	肺炎克雷伯菌(9164,194) Klebsiella pneumoniae	碳青霉烯类 Carbapenems
7	血红链球菌 Streptococcus sanguis	细菌培养、PCR Bacterial culture, PCR	牙髓卟啉单胞菌(7937)、齿垢密螺旋体(513)、星座链球菌(140) Porphyromonas endodontalis, Treponema denticola, Streptococcus constellatus	青霉素、甲硝唑 Penicillin, Metronidazole
8	星座链球菌 Streptococcus constellatus	细菌培养 Bacterial culture	星座链球菌(41) Streptococcus constellatus	利奈唑胺、米诺环素 Linezolid, Minocycline
9	大肠埃希菌 Escherichia coli	细菌培养 Bacterial culture	大肠埃希菌(233) Escherichia coli	头孢菌素、左氧氟沙星 Cephalosporin, Levofloxacin
10	铜绿假单胞菌 Pseudomonas aeruginosa	血培养 Blood culture	铜绿假单胞菌(100) Pseudomonas aeruginosa	头孢菌素、左氧氟沙星 Cephalosporin, Levofloxacin
11	鼠伤寒沙门菌 Salmonella typhimurium	细菌培养 Bacterial culture	肠沙门菌(182) Salmonella enterica	头孢菌素、左氧氟沙星 Cephalosporin, Levofloxacin
12-13	阴沟肠杆菌 Enterobacter cloacae	细菌培养 Bacterial culture	霍氏肠杆菌(657,2967) Enterobacter hormaechei	头孢菌素、左氧氟沙星 Cephalosporin, Levofloxacin
14	脆弱拟杆菌 Bacteroides fragilis	血培养 Blood culture	脆弱拟杆菌(37) Bacteroides fragilis	碳青霉烯类、甲硝唑 Carbapenems, Metronidazole
15-19	结核分枝杆菌 Mycobacterium tuberculosis	病理、PCR Pathology, PCR	结核分枝杆菌复合群(15,542,92,24,3) Mycobacterium tuberculosis complex	利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺 Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, Pyrazinamide
20-22	布鲁菌属 Brucella	凝集试验 SAT	布鲁菌属 (1636,332,1700)Brucella	利福平、多西环素、头孢曲松、左氧氟沙星 Rifampicin, Doxycycline, Ceftriaxone, Levofloxacin
23	布鲁菌属 Brucella	凝集试验 SAT	假肺炎链球菌(31) Streptococcus pseudopneumoniae	利福平、多西环素、头孢曲松、左氧氟沙星 Rifampicin, Doxycycline, Ceftriaxone, Levofloxacin
24	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	微小微单胞菌(2087) Parvimonas micra	碳青霉烯类、甲硝唑 Carbapenems, Metronidazole
25-28	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	大肠埃希菌(220,89,652,78) Escherichia coli	例 25 万古霉素、碳青霉烯类, 例 26-28 头孢菌素 No.25 Vancomycin, Carbapenems, No.26-28 Carbapenems
29	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	中华链球菌(79) Streptococcus sinensis	头孢菌素、左氧氟沙星 Cephalosporin, Levofloxacin
30	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	格氏沙雷菌(35) Serratia grimesii	碳青霉烯类、莫西沙星 Carbapenems, Moxifloxacin
31	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	无乳链球菌(56) Streptococcus agalactiae	青霉素、左氧氟沙星 Penicillin, Levofloxacin
32	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	表皮葡萄球菌(482) Staphylococcus epidermidis	利奈唑胺、左氧氟沙星 Linezolid, Levofloxacin
33	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	金黄色葡萄球菌(259) Staphylococcus aureus	青霉素 Penicillin
34	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	阴性 Negative	碳青霉烯类、万古霉素 Carbapenems, Vancomycin
35	病原体不明 Unknown pathogen	病理 Pathology	阴性 Negative	头孢菌素、左氧氟沙星 Cephalosporin, Levofloxacin
36-38	脊柱肿瘤 Spinal metastasis	病理 Pathology	阴性 Negative	N/A
39-41	Modic 变性 Modic changes	病理 Pathology	阴性 Negative	N/A
42	Modic 变性 Modic changes	病理 Pathology	嗜麦芽窄食单胞菌(39) Stenotrophomonas maltophilia	N/A
43	终板骨折 Endplate fracture	病理 Pathology	阴性 Negative	N/A
44	DISH 病合并假关节 Pseudarthrosis in DISH	病理 Pathology	阴性 Negative	N/A
45-46	AS 合并假关节 Pseudarthrosis in AS	病理 Pathology	阴性 Negative	N/A

注:MRSA, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;DISH, 弥漫性特发性骨肥厚症;AS, 强直性脊柱炎;SAT, 血清凝集试验;PCR, 聚合酶链反应
Note: MRSA, methicillin resistant staphylococcus aureus; DISH, diffuse idiopathic skeletal hyperostosis; AS, ankylosing spondylitis.
SAT, serum agglutination test; PCR, polymerase chain reaction

3 讨论

脊柱感染的诊断在临床上较为棘手,首先是脊柱感染与部分脊柱肿瘤、血清阴性脊柱炎合并骨折、终板损伤的临床特征和影像学表现在病变早期较为相似,不易区分。其次,脊柱感染的致病微生物主要包括化脓性细菌、布鲁杆菌、结核分枝杆菌和真菌四大类,其临床特点、体征、影像学表现常缺乏特异性,极易混淆。因此高质量、高效率的诊断技术一直是脊柱感染乃至其他感染类疾病诊疗的关键。微生物培养是诊断脊柱感染的金标准,但细菌培养对布鲁杆菌、结核分枝杆菌、真菌、苛养菌、厌氧菌的培养阳性率极低。血清学检测是针对某种或多种具有特定性质的微生物的靶向检测,针对性强但受交叉反应、病程变化、背景效价影响可出现假阳性或假阴性^[18]。基于 16S rRNA 的宽范围 PCR 或多重 PCR 检测方法是临床上较为常用的一种分子诊断技术。该方法不依赖于培养,可提高样本中病原菌的检出率,但 PCR 检测也存在缺陷,16S rRNA/rDNA 宽范围 PCR 不能鉴定真菌和多重感染病原,无法区别污染菌;而多重 PCR 仅局限于病毒及部分特定细菌的检测。鉴于多种检查方法的不足和局限性,本研究采用了一揽子的实验室检查方案以提高致病微生物的检出率,但总体阳性率仅达到了 66.67%,难以满足临床需求。

金文婷等^[23]报道 24 例脊柱感染的 mNGS 总体阳性率为 62.5%,明显高于常规培养的 35.0%。刘富兵等^[24]的研究发现使用一代和二代高通量测序技术在脊柱感染病原体检测中的敏感度为 80.0%,特异度为 55.6%。Ma 等^[25]报道在对 31 例脊柱感染患者的研究中 mNGS 的敏感度为 70.3%,特异度为 75.0%。本研究中的 mNGS 检测敏感度和特异度分别达到了 91.43%和 90.91%,与其他研究结果^[8,9,11-13]类似,显著优于综合培养、血清学检验、病理和 PCR 检测的“一揽子”方案。我们认为不同研究中 mNGS 诊断能力的差异主要是由于测序平台、检测中心和样本组织的差异导致的^[19,26,27]。mNGS 不依赖于培养,其检测结果只取决于 DNA 文库建立时的致病微生物 DNA 含量。对于难以分离 DNA 的微生物如结核杆菌、布鲁杆菌等胞内菌或真菌,可通过提取流程和判读规则的优化以提高检出率。此外,即使病原微生物经抗感染治疗死亡,但短期内其 DNA 可保留活

性,通过 mNGS 检测仍可获取结果^[28,29]。本研究中第 14 例患者抗感染治疗 20d 后 mNGS 检测仍发现脆弱拟杆菌,表明与其他检测方法相比 mNGS 短期内受抗感染治疗影响较小^[8]。本研究中所有患者致病微生物的 DNA 提取、建库、测序和分析过程均在 48h 内全部完成,耗时与血清学检测相当,短于常规培养时间(3~7d,部分培养甚至需要延长至 14d)。mNGS 高效快速的特点意味着对疾病的早期干预,从而降低病情加重的风险。

mNGS 的另一优点是全面、低偏倚。mNGS 检测结果范围涵盖了目前基因组序列已知的 6350 种细菌、1798 种 DNA 病毒、1064 种真菌和 234 种寄生虫,基本纳入了所有脊柱感染病原微生物。尽管由于不同物种 DNA 提取时存在难易程度差别,但与常规检测相比其偏倚性较低。理论上可直接获取标本中所有的遗传生物信息,排除了检测者的主观目的性和干预,弥补了各种单一实验室检查的倾向性和局限性。同时,区别于肺泡灌洗液、脓液等其他感染疾病的标本存在病灶不明确和定植污染菌多影响 mNGS 结果的判读,脊柱是天然无菌环境,发生感染后病灶相对明确和局限,因此当 mNGS 检测出少见、罕见的病原微生物时通常有着较高的准确性和可信度。本研究通过 mNGS 检测发现了多重感染、厌氧菌感染,特殊类型感染(齿垢密螺旋体感染、贝纳柯克斯体感染),及其他少见的微生物感染等,结合病史、影像学表现、特殊实验室检测和诊断性治疗,最终临床确诊,让我们对脊柱感染和其病原谱有了全新的认识。

大多数脊柱感染的患者早期无明显神经压迫、脊柱失稳,可通过保守治疗治愈。我们的经验是 CT 引导下穿刺结合 mNGS 检测可取得大部分患者的致病微生物证据,继而选择适宜抗生素进行治疗。与关节腔液、肺泡灌洗液、脑脊液、脓液、血液相比,脊柱穿刺活检可取得的标本量较少,难以满足涂片、多种培养基的微生物培养、病理检查的需要,导致临床检验项目不全面进而出现漏诊误诊。而 mNGS 检测只需椎旁或椎间盘病灶处“绿豆”大小的组织或 1~2ml 脓液即可满足检测要求。但这也对 CT 引导下穿刺提出了更高的要求。本研究中第 23 例患者通过虎红平板凝集试验初筛阳性,血清凝集试验滴度 1:200,规范抗布氏杆菌治疗 3 个月后治愈,临床确诊布鲁杆菌脊柱感染,但 mNGS 结果为假肺炎链球菌。回顾该病

例发现标本获取方式为 CT 引导下穿刺,且穿刺图像显示穿刺远离病灶,考虑标本质量过低进而出现假阳性结果。因此要求穿刺过程中尽可能靠近病灶中心,并保持无菌操作^[4]。

目前,mNGS 的应用尚存在以下困难:第一,由于测序平台和测序流程的多样性及各种标本的不同背景菌谱,鲜见针对二代测序结果解读的规范,包括序列阈值,以及灵敏性、特异性评估的统一标准等。在解读数据方面仍有很大的困难与挑战,如能进一步规范 mNGS 技术的质量控制和验证策略,即可给予临床实践非常重要的线索和信息,协助临床诊断^[30]。第二,在耐药方面 mNGS 可提供的信息远不及传统的微生物培养。脊柱感染标本通常为病灶组织,人源序列达 99% 以上,微生物 DNA 序列数极少,难以获取足够的耐药信息,即使获取了耐药基因,也难以明确该基因是否表达并使细菌产生耐药性,因此反馈给医生的仅有微生物的种类信息并只能据此制定抗感染用药的方案。但随着去人源化测序技术、转录组测序的发展,耐药信息终将完整呈现并更好地指导临床用药^[6]。

本研究尚存在以下局限性:(1)本研究为单中心的系列病例研究,脊柱感染收集病例数较少,缺少大规模多中心的统计数据,无法完全满足诊断试验的样本量要求,结果存在偏倚的可能性大。(2)对于患者抗生素使用时间、标本获取方式等缺少合理分组和分析,可能影响最终结果。(3)对于 mNGS 检测阳性但无实验室证据的脊柱感染未能进一步行 PCR 试验验证。

mNGS 对脊柱感染的诊疗作用主要体现在以下四个方面:(1)对于微生物培养或血清学实验阳性的病例,mNGS 检测可进一步进行验证;(2)对于培养和血清学实验均为阴性的病例,mNGS 可以提供病原微生物的基本种属信息,进而指导临床医生选择对应抗生素进行治疗;(3)对于少见和罕见的病原微生物,如贝纳柯克斯体,mNGS 一旦检出即可对临床治疗起到积极的指导作用。(4)对于各项实验室检验,以及 mNGS 检测均为阴性的病例,提示非感染性疾病可能性大。总之,宏基因组二代测序是一种快速、高效、准确的病原微生物检测技术,尽管存在不足,但在脊柱感染的病原鉴定中有着较高的应用价值。

4 参考文献

1. Mylona E, Samarkos M, Kakalou E, et al. Pyogenic vertebral osteomyelitis: a systematic review of clinical characteristics[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2009, 39(1): 10-17.
2. Sehn JK, Gilula LA. Percutaneous needle biopsy in diagnosis and identification of causative organisms in cases of suspected vertebral osteomyelitis[J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81(5): 940-946.
3. Marco de Lucas E, González Mandly A, Gutiérrez A, et al. CT-guided fine-needle aspiration in vertebral osteomyelitis: true usefulness of a common practice [J]. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(3): 315-320.
4. Joo EJ, Yeom JS, Ha YE, et al. Diagnostic yield of computed tomography-guided bone biopsy and clinical outcomes of tuberculous and pyogenic spondylitis[J]. *Korean J Intern Med*, 2016, 31(4): 762-771.
5. Terreaux W, Geoffroy M, Ohl X, et al. Diagnostic contribution of a second percutaneous needle biopsy in patients with spontaneous diskitis and negative blood cultures and first biopsy[J]. *Joint Bone Spine*, 2016, 83(6): 715-719.
6. Simmer 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.
7. Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, et al. Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics[J]. *mBio*, 2015, 6(6): e01888-15.
8. 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.
9. Xing XW, Zhang JT, Ma YB, et al. Metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of infectious encephalitis and meningitis: a large, prospective case series of 213 patients[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 88.
10. Wang S, Chen Y, Wang D, et al. The feasibility of metagenomic next-generation sequencing to identify pathogens causing tuberculous meningitis in cerebrospinal fluid [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 10: 1993.
11. Hu H, Guo L, Wu H, et al. Evaluation of next-generation sequencing for the pathogenic diagnosis of children brain abscesses[J]. *J Infect*, 2019, 78(4): 323-337.
12. Li H, Gao H, Meng H, et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 205.
13. 黄子达, 张翀景, 李文波, 等. 宏基因组二代测序技术检测病原菌在诊断假体周围感染中的作用 [J]. *中华骨科杂志*, 2019, 39(15): 944-953.
14. 徐一宏, 徐卫东. 二代测序技术在诊断假体周围感染中的应用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27(13): 1171-1175.

15. 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.
 16. 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.
 17. Berbari EF, Kanj SS, Kowalski TJ, 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.
 18. 《中华传染病杂志》编辑委员会. 布鲁菌病诊疗专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(12): 705-710.
 19. Liu D, Zhou H, Xu T, et al. Multicenter assessment of shotgun metagenomics for pathogen detection [J]. e-BioMedicine, 2021, 74: 103649.
 20. Strong M J, Xu G, Morici L, et al. Microbial contamination in next generation sequencing: implications for sequence-based analysis of clinical samples [J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(11): e1004437.
 21. Laurence M, Hatzis C, Brash DE. Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97876.
 22. Kulakov LA, McAlister MB, Ogden KL, et al. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(4): 1548-1555.
 23. 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.
 24. 刘富兵, 王孝宾, 李晶, 等. 高通量测序技术在脊柱感染病原体检测中的初步应用[J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(3): 149-156.
 25. Ma C, Wu H, Chen G, et al. The potential of metagenomic next-generation sequencing in diagnosis of spinal infection: a retrospective study[J]. Eur Spine J, 2021, Oct 22, Online ahead of print.
 26. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(11): 1069-1076.
 27. Sinha R, Abu-Ali G, Vogtmann E, et al. Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality Control(MBQC) project consortium[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(11): 1077-1086.
 28. 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.
 29. Vasoo S, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, et al. Evaluation of the filmarray blood culture id panel on biofilms dislodged from explanted arthroplasties for prosthetic joint infection diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(8): 2790-2792.
 30. 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681-689.
- (收稿日期:2021-09-23 末次修回日期:2021-12-20)
(英文编审 谭 啸)
(本文编辑 卢庆霞)

(上接第 140 页)

- lumbar endoscopic unilateral laminotomy for bilateral decompression: a detailed technical description, rationale and outcomes[J]. Neurospine, 2020, 17(Suppl 1): S88-S98.
 22. Kim HS, Choi SH, Shim DM, et al. Advantages of new endoscopic unilateral laminectomy for bilateral decompression (ULBD) over conventional microscopic ULBD[J]. Clin Orthop Surg, 2020, 12(3): 330-336.
 23. Yang F, Chen R, Gu D, et al. Clinical comparison of full-endoscopic and microscopic unilateral laminotomy for bilateral decompression in the treatment of elderly lumbar spinal stenosis: a retrospective study with 12-month follow-up[J]. J Pain Res, 2020, 13: 1377-1384.
 24. 赵凡, 刘正, 王炳强, 等. 有限元模拟单节段腰椎小关节分级切除对腰椎稳定性的影响[J]. 中华医学杂志, 2015, 95 (13): 973-977.
 25. 蒋强, 丁宇, 刘金玉, 等. 有限元模拟全内镜下精准椎板开窗减压术及生物力学分析[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24 (12): 1891-1896.
- (收稿日期:2021-08-19 修回日期:2021-10-11)
(英文编审 谭 啸)
(本文编辑 姜雅浩)