DOI:10.12138/j.issn.1671－9638.20264734

·论著·

基于纳米孔靶向测序的培养阴性骨科感染病原谱分析

陈 韵[1],郎志刚[2],李可烨[2],张 旭[2],梁玉祥[2],郭 强[2],严 敏[1],刘 磊[1]
(四川省骨科医院 1.医院感染管理办公室;2. 骨病科,四川 成都 610041)

[摘 要] **目的** 探讨纳米孔靶向测序(NTS)技术在培养阴性骨科感染病原学诊断中的应用价值,分析其病原谱构成及耐药基因分布特征,为建立培养阴性骨科感染病原体的分子诊断路径提供依据。**方法** 收集某院骨病科2023 年 12 月—2026 年 3 月收治的 20 例培养阴性骨科感染患者的分泌物及手术清创标本,采用覆盖细菌、真菌及病毒的多重靶向纳米孔测序技术进行病原体检测,通过生物信息学分析病原物种及丰度,同步检测耐药基因,并结合临床炎症指标进行综合分析。**结果** NTS 检测病原核酸阳性率为 100%(20/20),共检出 35 种病原体,平均 3.6 种/例,所有病例均检出多种病原核酸。病原谱以革兰阳性球菌为主(40.28%),涉及 16 例(80.00%),其中停乳链球菌为优势菌种(5 例)。共检出特殊病原体 10 例次:结核分枝杆菌 1 例(丰度 99.98%),塞内加尔分枝杆菌 1 例(丰度 31.11%),肠道沙门菌 2 例(丰度分别为 2.05%、97.83%),EB 病毒(EBV)合并感染 6 例(30%),其中 1 例呈高载量(丰度 40.61%)。9 例(45.0%)检出耐药基因:*erm*(B)基因(5 例)、*erm*(B) + *mec*A 基因(3 例)、氨基糖苷磷酸转移酶(APH)基因(1 例),且耐药基因阳性组与阴性组炎症指标比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。**结论** 培养阴性骨科感染病原体呈高度多样化,以革兰阳性球菌为主。NTS 技术可提高病原体检出率,弥补传统培养方法的漏检缺陷,其病原谱信息及耐药基因数据可为精准抗感染治疗方案的制定提供依据。

[关 键 词] 纳米孔靶向测序;NTS;骨科感染;病原谱;耐药基因;EB 病毒
[中图分类号] R681.2

Pathogen spectrum analysis of culture-negative orthopedic infections based on nanopore targeted sequencing

Chen Yun[1], *Lang Zhigang*[2], *Li Keye*[2], *Zhang Xu*[2], *Liang Yuxiang*[2], *Guo Qiang*[2], *Yan Min*[1], *Liu Lei*[1](1. *Hospital-Acquired Infection Management Office*; 2. *Department of Bone Diseases*, *Sichuan Provincial Orthopedic Hospital*, *Chengdu* 610041, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the application value of nanopore targeted sequencing (NTS) in the etiological diagnosis of culture-negative orthopedic infections, and to analyze the composition of pathogen spectrum and distribution characteristics of antimicrobial resistance genes, thereby providing evidence for establishing a molecular diagnostic pathway for pathogens causing culture-negative orthopedic infections. **Methods** Secretion and surgical debridement samples were collected from 20 patients with culture-negative orthopedic infections admitted to the Department of Bone Diseases of a hospital between December 2023 and March 2026. Multiplex targeted nanopore sequencing covering bacteria, fungi, and viruses was employed for pathogen detection. Bioinformatic analysis was performed to identify pathogen species and their abundance. Antimicrobial resistance genes were simultaneously detected, and comprehensive analysis was conducted in conjunction with clinical inflammatory markers. **Results** The positive detection rate of pathogen nucleic acids by NTS was 100% (20/20). A total of 35 pathogen species

[收稿日期] 2026－07－07
[基金项目] 2022 年成都市医学科研课题(2022223)
[作者简介] 陈韵(1989－),女(汉族),四川省遂宁市人,助理研究员,主要从事医院感染管理相关研究。
[通信作者] 刘磊 E-mail: sheva_liulei@126.com

were identified, with a mean of 3.6 species per case. Multiple pathogen nucleic acids were detected in all cases. Gram-positive cocci predominated in the pathogen spectrum (40.28%) and were detected in 16 cases (80.00%), with *Streptococcus dysgalactiae* identified as the predominant species (5 cases). A total of 10 detections of special pathogens were detected: *Mycobacterium tuberculosis* in 1 case (abundance 99.98%), *Mycobacterium senegalense* in 1 case (abundance 31.11%), *Salmonella enterica* in 2 cases (abundance 2.05% and 97.83%, respectively), and Epstein-Barr virus (EBV) co-infection in 6 cases (30%), including 1 case with high viral load (abundance 40.61%). Antimicrobial resistance genes were detected in 9 patients (45.0%): the *erm*(B) gene in 5 cases, the *erm*(B) plus *mec*A genes in 3 cases, and the aminoglycoside phosphotransferase (APH) gene in 1 case. No statistically significant differences in inflammatory markers were observed between the resistance gene-positive and resistance gene-negative groups (all $P>0.05$). **Conclusion** The pathogens associated with culture-negative orthopedic infections are highly diverse, with Gram-positive cocci predominating. NTS technology can improve pathogen detection rates and help address the limitations of conventional culture methods that can lead to missed pathogen detection. The pathogen spectrum information and resistance gene data provided by NTS can provide a basis for developing precise anti-infection therapeutic strategies.

[**Key words**] nanopore targeted sequencing; NTS; orthopedic infections; pathogen spectrum; antimicrobial resistance gene; Epstein-Barr virus

骨科感染涵盖软组织感染、急性与慢性骨髓炎、化脓性关节炎及植入物相关感染等多种类型，其中慢性骨髓炎因病情顽固、并发症严重而最为棘手。慢性骨髓炎是骨组织的慢性感染性化脓性疾病，严重者可致截肢、致残甚至危及生命[1]。国内多中心流行病学研究[2]显示，慢性骨髓炎以中老年、男性患者多见，创伤后感染及多重耐药菌感染占比呈上升趋势，是常见的骨科疑难病症之一。骨科感染的传统诊断常依赖于临床表现、影像学检查及微生物培养，但微生物培养阳性率低[3-4]。培养阴性导致临床无法明确病原体，此时只能依赖经验性广谱抗菌药物治疗，加剧了抗菌药物耐药问题[5]。此外，慢性骨髓炎患者通常局部骨和软组织血供不良，导致病灶骨组织缺血性硬化，难以通过全身抗菌药物达到局部有效杀菌浓度[6]；同时，治疗过程中因病原消耗、长期服用抗菌药物等导致患者免疫力低下，伤口愈合较慢[7]，为临床感染的预防与治疗带来新的难题。

近年来，分子诊断技术如宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)、靶向二代测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)、纳米孔靶向测序(nanopore targeted sequencing, NTS)等被广泛应用于呼吸道感染、血流感染及中枢神经系统感染的病原识别，但在骨科感染中的应用报道较少。NTS 技术的出现为骨科感染病例，尤其是培养阴性、疑难复杂及混合感染病例的病原学诊断提供了更为精准、快速的分子检测路径。本研究采用 NTS 技术对 20 例培养阴性骨科感染患者进行病原检测，旨在系统分析其病原谱特征及耐药基因分布，为培养阴性骨科感染病原体的分子诊断提供初步依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究按时间顺序连续收集 2023 年 12 月—2026 年 3 月四川省骨科医院骨病科收治的骨科感染住院患者的分泌物及术中清创标本，共收集 20 例临床确诊为骨科感染且标本连续 2 次微生物培养阴性病例的标本，并进行 NTS 检测。纳入标准：(1)患者体温>37.3 ℃和(或)血液指标[如中性粒细胞、淋巴细胞、降钙素原(PCT)、C 反应蛋白(CRP)等]异常。(2)连续 2 次微生物培养均为阴性(所有标本接种后，采用血琼脂平板和麦康凯琼脂平板进行需氧菌培养，置 35～37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 18～24 h；采用厌氧血琼脂平板进行厌氧菌培养，置厌氧培养箱中孵育 48～72 h；真菌培养采用沙堡氏培养基，置 28 ℃培养箱孵育 3～5 d。所有培养标本均同时进行革兰染色及抗酸染色。需氧培养 48 h、厌氧培养 72 h 仍未见细菌生长，报告为“微生物培养阴性”)。排除标准：语言障碍不能进行流畅沟通及不能配合调查者；合并其他可能影响研究结果的疾病(恶性肿瘤、重大外伤等)者；近 2 周使用过抗菌药物等可能影响实验结果者。本研究通过四川省骨科医院伦理委员会审查(审查意见号：KY2023-021-01)。

1.2 仪器与试剂 全自动核酸提取仪(NP96 型，

西安天隆科技有限公司);多重病原体检测试剂盒(纳米孔测序法,英维普生物科技有限公司);GridION 纳米孔测序仪(Oxford Nanopore Technologies,英国)。

1.3 核酸提取与多重靶向纳米孔测序方法 组织标本于生物安全柜中切割至约 2～3 mm 大小,转移至 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL PBS 缓冲液(pH 7.4),使用无菌研磨棒充分研磨至匀浆状。使用多重病原体检测试剂盒及全自动核酸提取仪对初步制备的样本进行处理,按试剂盒说明书提取总核酸(DNA 和 RNA),逆转录后进行多重靶向扩增,扩增区域为细菌 16S rRNA 基因区域、真菌 ITS 区域以及病毒和寄生虫的特异性基因片段。按试剂盒说明书将纯化的扩增产物用于文库构建,随后使用 GridION 纳米孔测序仪进行测序及生物信息学分析(MinKNOW 碱基识别、质控过滤、物种注释及阳性判读)。

1.4 质量控制与阳性判断标准 (1)原始数据碱基识别和质控(去除 Q<7 的序列)。(2)Barcode 拆分和去重。(3)物种阳性判断阈值基于迪安诊断大规模临床数据(>12 000 例),采用受试者工作特征(ROC)曲线和约登指数评估,覆盖 354 种常见病原体,包括细菌(236 种)、真菌(33 种)、支原体/衣原体/螺旋体(9 种)、立克次体(9 种)、病毒(58 种)、寄生虫(9 种),以及 10 种耐药基因。靶向扩增区域为细菌 16S rRNA 基因、真菌 ITS 区域及病毒和寄生虫的特异性保守序列,每批次设置阴性对照,标本检测需满足配套分析软件内置的有效 reads 数阈值(对应阳性判断值>100 Copies/mL),阴性对照校正采用 5 倍序列数规则。(4)根据试剂盒说明书及迪安诊断大规模临床数据,假设耐药菌种至少携带 1 个耐药基因,耐药基因检出序列数占疑似对应物种检出序列数的 5%以上时判为阳性。

1.5 统计分析 应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。非正态分布计量资料以中位数(四分位数)表示,计数资料以频数(百分比)表示,计量资料的组间比较采用两独立样本的 *Mann-Whitney U* 检验,计数资料仅作描述性分析,未进行组间比较。以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料 20 例培养阴性骨科感染患者中,男性 17 例,女性 3 例;年龄中位数为 53.5 岁。炎症指标方面,白细胞计数(WBC)中位数为 7.2×10^9/L,CRP 中位数为 28.3 mg/L,红细胞沉降率(ESR)中位数为 24.5 mm/h,PCT 中位数为 0.031 ng/mL。PCT 在早期入组阶段未作为常规检测项目,7 例(35.0%)患者病历中无该项检测记录,有效样本量不足,故未纳入组间比较。见表 1。

表 1 20 例培养阴性骨科感染患者一般资料

Table 1 General characteristics of the 20 patients with culture-negative orthopedic infections

项目	结果
性别(男/女,例)	17/3
年龄[$M(P_{25},P_{75})$,岁]	53.50(45.25,59.00)
WBC[$M(P_{25},P_{75})$,$\times10^9$/L]	7.2(6.2,9.3)
CRP[$M(P_{25},P_{75})$,mg/L]	28.3(8.2,76.9)
ESR[$M(P_{25},P_{75})$,mm/h]	24.5(11.0,61.3)
PCT[$M(P_{25},P_{75})$,ng/mL]*	0.031(0.028,0.170)

注:* 表示 7 例患者病历中无检测记录,有效样本 13 例。

2.2 NTS 病原体检出情况 20 例患者培养阴性标本中,NTS 检出阳性率为 100%,共检出 35 种病原体,平均 3.6 种/例。革兰阳性球菌检出频次最高(29 次,占 40.28%),涉及 16 例患者(80.00%),共 9 个菌种。见表 2、3。

2.3 特殊病原体检出情况 本研究检出 10 例次特殊病原感染:(1)结核分枝杆菌 1 例(病例 16,丰度 99.98%),该患者同时检出人细小病毒 B19(丰度 0.02%);(2)非结核分枝杆菌(塞内加尔分枝杆菌)1 例(病例 14,丰度 31.11%),合并金黄色葡萄球菌及白念珠菌感染;(3)肠道沙门菌 2 例(病例 2,丰度 2.05%;病例 19,丰度 97.83%),其中病例 19 合并 EBV 感染(丰度 2.17%);(4)EBV 及合并感染共 6 例(30.00%),其中 1 例为高载量(病例 4,丰度 40.61%)。见表 3。12 例病例检出链球菌属,占比高达 60.00%,其中停乳链球菌 5 例(病例 1～4、15 均检出)。还检出普雷沃菌属 7 例(35.00%),卟啉单胞菌属 3 例(15.00%)。

表 2　20 例培养阴性骨科感染患者 NTS 病原体检出情况

Table 2　Detection of pathogens by NTS in 20 patients with culture-negative orthopedic infections

病原体	检出频次(次)	构成比(%)	检出例数	病例检出率(%)	涉及菌种数(种)
革兰阳性球菌	29	40.28	16	80.00	9
厌氧菌	17	23.61	8	40.00	10
革兰阴性杆菌	11	15.28	7	35.00	8
病毒	7	9.72	7	35.00	2
真菌	3	4.17	3	15.00	1
棒状杆菌属	3	4.17	2	10.00	3
分枝杆菌属	2	2.77	2	10.00	2
合计	72	100	/	/	35

注:/表示无数值。

表 3　20 例培养阴性骨科感染患者各病例 NTS 主要病原体检出情况

Table 3　Major pathogens detected by NTS in each of the 20 patients with culture-negative orthopedic infections

病例序号	病原种数(种)	主要病原体[丰度(%)]	特殊病原体[丰度(%)]	耐药基因
1	3	停乳链球菌(90.00)	EBV	/
2	9	屎肠球菌(64.13)	肠道沙门菌 + EBV	*erm*(B) + *mec*A
3	5	停乳链球菌(97.77)	EBV	*erm*(B) + *mec*A
4	5	EBV(40.61)	EBV(40.61)	*erm*(B) + *mec*A
5	5	大肠埃希菌(34.29)	/	/
6	3	结核硬脂酸棒状杆菌(93.55)	/	/
7	5	假中间葡萄球菌(58.98)	/	/
8	8	星座链球菌(28.27)	/	*erm*(B)
9	2	文森特梭杆菌(58.82)	/	*erm*(B)
10	2	假中间葡萄球菌(74.65)	/	/
11	3	假中间葡萄球菌(51.06)	/	/
12	2	口腔内普雷沃氏菌(50.00)	/	*erm*(B)
13	2	厌氧球菌(71.29)	/	/
14	3	白念珠菌(48.89)	塞内加尔分枝杆菌(31.11)	/
15	2	停乳链球菌(99.96)	/	/
16	2	结核分枝杆菌(99.98)	结核分枝杆菌(99.98)、人细小病毒 B19(0.02)	/
17	3	缓症链球菌(52.78)	/	*erm*(B)
18	3	缓症链球菌(52.25)	/	*erm*(B)
19	2	肠道沙门菌(97.83)	EBV	/
20	3	金黄色葡萄球菌(91.40)	EBV	APH

注:EBV 为 EB 病毒;/表示未检出;APH 为氨基糖苷磷酸转移酶。

2.4　病原谱特征　20 例患者均检出多种病原核酸,按检出种类数分类:检出 2 种 7 例(35.00%),3 种 7 例(35.00%),≥4 种 6 例(30.00%);病毒 + 革兰阳性球菌组合累计出现 5 例(25.00%),真菌 + 革兰阳性球菌组合出现 3 例(15.00%),分枝杆菌属 + 真菌 + 革兰阳性球菌组合出现 1 例(5.00%)。见表 4。

表 4 20 例培养阴性骨科感染患者多种病原核酸检出情况

Table 4 Detection of multiple pathogen nucleic acids in 20 patients with culture-negative orthopedic infections

检出种类及病原组合类型	病例数	构成比(%)
2 种(n = 7)	7	35.00
厌氧菌 + 革兰阳性球菌	2	10.00
厌氧菌 + 厌氧菌*	2	10.00
革兰阳性球菌 + 革兰阴性杆菌	1	5.00
分枝杆菌属 + 病毒	1	5.00
病毒 + 革兰阴性杆菌	1	5.00
3 种(n = 7)	7	35.00
革兰阳性球菌 + 革兰阴性杆菌	2	10.00
病毒 + 革兰阳性球菌	1	5.00
棒状杆菌属 + 革兰阳性球菌	1	5.00
厌氧菌 + 革兰阳性球菌	1	5.00
分枝杆菌属 + 真菌 + 革兰阳性球菌	1	5.00
病毒 + 革兰阳性球菌 + 革兰阴性杆菌	1	5.00
≥4 种(n = 6)	6	30.00
病毒 + 真菌 + 革兰阳性球菌	2	10.00
其他病原体 + 厌氧菌 + 革兰阳性球菌	2	10.00
棒状杆菌属 + 病毒 + 革兰阳性球菌 + 革兰阴性杆菌	1	5.00
其他病原体 + 厌氧菌 + 革兰阳性球菌 + 革兰阴性杆菌	1	5.00

注：* 表示 2 例病例检出 2 种厌氧菌，即病例 12 检出口腔内普雷沃氏菌、普雷沃氏菌，病例 13 检出厌氧球菌、普雷沃氏厌氧球菌。

2.5 耐药基因检出情况 20 例患者中 9 例(45.00%)检出耐药基因，其中 *erm*(B)基因 5 例，*erm*(B) + *mec*A 联合 3 例，APH 基因 1 例。耐药基因阳性组与阴性组炎症指标比较显示，两组 CRP 中位数(28.1 mg/L VS 28.4 mg/L)、ESR 中位数(35.0 mm/h VS 23.0 mm/h)及 WBC 中位数(7.3×10^9/L VS 6.5×10^9/L)比较，差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表 5、6。

表 5 20 例培养阴性骨科感染患者耐药基因检出情况

Table 5 Detection of antimicrobial resistance genes in 20 patients with culture-negative orthopedic infections

耐药基因	检出例数	检出率(%)	相关病原体
erm(B)	5	25.00	链球菌属、肠球菌属
erm(B) + *mec*A	3	15.00	葡萄球菌属 + 链球菌属
APH	1	5.00	金黄色葡萄球菌

表 6 20 例培养阴性骨科感染患者耐药基因阳性组与阴性组炎症指标比较

Table 6 Comparison of inflammatory markers between the antimicrobial resistance gene-positive and gene-negative groups among 20 patients with culture-negative orthopedic infections

组别	检出例数	检出率(%)	CRP(mg/L)	ESR(mm/h)	WBC($\times10^9$/L)
耐药基因阳性组	9	45.00	28.1(5.5,82.6)	35.0(11.0,74.0)	7.3(7.1,17.3)
耐药基因阴性组	11	55.00	28.4(13.7,45.7)	23.0(16.0,46.0)	6.5(5.7,8.4)
Z	/	/	−0.228	<0.001	1.179
P	/	/	0.820	1.000	0.238

注：/表示未进行统计分析。

3 讨论

3.1 NTS 在培养阴性骨科感染诊断中的技术优势 骨科感染培养阳性率低是临床长期面临的难题。研究[3]表明，慢性骨髓炎患者体内绝大多数病原体嵌入生物膜中，仅少量以浮游状态存在，可培养比例极低。此外，多种病原微生物属于难培养或苛养菌，如在骨髓炎患者中发现的金氏金氏菌(*Kingella kingae*)、大芬戈尔德菌(*Finegoldia magna*)及各类厌氧

菌等，对营养要求苛刻，常规培养条件难以分离[8-9]。

近年来，高通量 mNGS 发展迅速，该方法无需特异性扩增病原体，也无需经过长时间的微生物培养[10-11]。非靶向的 mNGS 具备更强的广谱性和新病原识别能力，在复杂感染、多病原共存或常规检测阴性标本中展现出更高的临床价值，相较于传统培养检测方法具有明显优势[12]，还能发现新型病原体及多种病原体共感染情况，如病毒与细菌、细菌与真菌等[13]，但其对低菌量标本灵敏度有限，且检测成本较高、数据分析时间长[14]。tNGS 通过多重 PCR 富集提高了灵敏度，但基于 Illumina 等二代测序平台，其短读长（50～300 bp）限制了种水平鉴定的准确性，近缘菌种易混淆，且无法实时分析检测结果，周转时间较慢（约 10 h）[15-16]。NTS 结合了三代测序长读长优势（可覆盖 16S rRNA 全长约 1 500 bp）和靶向富集的高灵敏度，解决了目前二代测序平台无法实时测序及短读长、分析困难等问题[11]。本研究中 NTS 对培养阴性标本的病原体检出率达 100%，高于传统培养方法，证实了其在骨科感染诊断中的应用价值。通过 NTS 技术，不仅能提高微生物检出率，准确对微生物进行分类鉴定，还能同步监测细菌中耐药基因的进化轨迹，有利于预防多重耐药细菌的产生和传播[17-18]，为骨科感染精准诊疗提供重要依据。

3.2　病原谱特征分析　本研究病原谱分析显示，以革兰阳性球菌为主，与既往慢性骨髓炎病原学研究[19]结果一致。本研究培养阴性病例中链球菌属占比高达 60.0%，可能是因为链球菌属（尤其停乳链球菌）营养要求相对苛刻，在慢性骨髓炎病灶的低营养、低氧环境中易被传统培养漏检。停乳链球菌可分为两个亚种：停乳链球菌似马亚种（*Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*，SDSE）主要分离自人，而停乳链球菌停乳亚种（*Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae*，SDSD）主要分离自动物，与动物乳腺炎相关[20]。近年来越来越多的研究[21]表明，其引起人类严重感染的病例呈上升趋势，已成为一种重要的人类病原体。临床上，该菌可导致多种感染，主要包括皮肤及软组织感染（如蜂窝织炎）、败血症及骨关节感染（如骨髓炎、关节炎）。本研究检出停乳链球菌 5 例，其中 3 例呈高丰度优势生长（分别为 90.00%、97.77%、99.96%），提示该菌可能在部分骨科感染病例中作为主要致病菌。但这几例高丰度 SDSE 感染患者均居住于城区，其与动物接触史的关联性尚不明确，有待系统性的流行病学调查进一步验证。

此外，本研究检出的结核分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌等特殊病原体在常规培养中呈阴性，推测其原因如下：结核分枝杆菌培养周期较长，通常需要 4～8 周；非结核分枝杆菌（NTM）对培养条件要求更为苛刻，常规方法易导致漏检[22]。沙门菌骨髓炎是一种罕见的肠外并发症，在免疫功能正常的成人中尤为少见[19, 23]，其影像学表现常为非特异性溶骨性病变，易与原发性骨肿瘤混淆，导致诊断延误[24]。本研究中 2 例检出肠道沙门菌（丰度分别为 2.05%、97.83%）而培养阴性，推测可能部分菌体已失去活性，仅残留可检测的核酸片段。相关研究[25]也证实，NTS 技术基于核酸扩增原理，不受细菌存活状态限制，可有效弥补传统培养法对少见病原体及低活性菌的漏检缺陷。

3.3　病原谱的临床意义　本研究中所有标本均检出多种病原核酸，平均 3.6 种/例，高检出率反映了 NTS 技术对低丰度病原体的检测优势，同时也揭示了骨科感染病灶内微生物生态的复杂性[26]。其中革兰阳性球菌与厌氧菌的组合最为常见，推测是感染病灶的缺血坏死环境为厌氧菌生长提供了有利条件；同时，生物膜内的厌氧菌可通过代谢互养促进需氧菌的定植，并通过细胞间紧密接触加速耐药基因的水平转移[27]。此外，本研究还检出普雷沃菌属 7 例（35%），卟啉单胞菌属检出 3 例（15%），这些菌属常与口腔源性或肠道源性感染相关，提示骨科感染病原来源可能具有多源性特征。

尽管治疗手段不断进步，骨科感染复发率仍然不低，特别是慢性骨髓炎的复发率高达 20%～30%[28]，其中一个重要原因是传统经验性抗菌药物方案往往难以全面覆盖混合感染中的所有病原，尤其是厌氧菌和苛养菌[29]。临床医生在诊疗中可借助 NTS 技术了解患者病原谱及耐药基因分布，为制定覆盖混合感染的抗感染方案提供参考，有望降低治疗失败和复发的风险。

3.4　EBV 合并感染的临床价值　本研究还发现 6 例（30.00%）EBV 合并感染，其中 1 例呈高载量状态（丰度 40.61%）。EBV 为全球感染发病率最高的疱疹病毒之一，约 95%的成人为血清学阳性[30]，当免疫监视功能削弱时，潜伏的 EBV 可被重新激活进入裂解复制周期[31]。既往 EBV 再激活研究主要集中于器官移植、肿瘤放射及化学治疗、自身免疫病等免疫抑制人群，骨科感染患者作为 EBV 再激活的高风险人群关注较少。患者长期处于细菌感染和免疫消耗状态，持续存在的病原刺激、生物膜形成、坏死骨组织和局部低血供环境，使机体处于炎症激活与

免疫抑制并存的状态，可能为 EBV 再激活创造条件[30]；但其与感染病灶迁延不愈的关系尚需进一步研究。NTS 技术对 EBV 等病毒的同步检测能力，为早期识别患者的病毒合并感染提供了有效工具。对于 NTS 检出 EBV 阳性的患者，建议增加 EBV-DNA 载量动态监测，以辅助区分低水平病毒复制与活动性感染[32]，必要时进行抗病毒干预。

3.5 耐药基因检出特征与临床预警价值 本研究 9 例(45.00%)检出耐药基因，以 *erm*(B)基因最为常见(8 例次)，*erm*(B)基因与链球菌属和肠球菌属检出高度关联，提示大环内酯类耐药在骨髓炎病原中的流行情况值得关注；3 例检出 *mec*A 基因提示耐甲氧西林葡萄球菌[耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)或耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)]的存在。此外，还检出 1 例 APH 基因，该病例中金黄色葡萄球菌丰度最高(91.40%)，合并 EBV(8.59%)和鲍曼不动杆菌(0.01%)。鉴于金黄色葡萄球菌占绝对优势丰度，APH 基因最可能来源于该菌，提示氨基糖苷类耐药风险，其培养阴性的原因有待进一步研究。

研究[33]表明，耐药基因的存在并不必然意味着其表达为表型耐药。NTS 检出的耐药基因信息可为等待培养结果期间的临床决策提供参考，但仍需结合药敏试验进行综合判断[34]。

3.6 NTS 检测结果的临床运用价值 本研究结果表明，NTS 对培养阴性骨科感染的病原学诊断与后续精准抗感染治疗具有重要的辅助价值。在诊断层面，NTS 可弥补传统培养对苛养菌、厌氧菌、分枝杆菌及病毒等病原体的漏检，为培养阴性骨科感染病例提供明确的病原学线索；在治疗层面，NTS 提供的病原谱信息可指导抗感染方案的覆盖范围，耐药基因检测可提供分子层面的预警。值得注意的是，NTS 等核酸检测技术检出多种病原核酸仅代表标本中存在相应微生物的遗传物质，该技术无法区分活菌、死菌及游离核酸片段，临床解读 NTS 阳性结果时应结合涂片、培养、组织病理及临床表现综合判断，避免因核酸残留或潜伏感染导致对感染状态的误判。

综上所述，本研究通过对 20 例培养阴性骨科感染患者进行 NTS 检测，发现此类感染存在高度多样化的病原体构成。同时，NTS 技术可提高病原体检出率，在降低传统培养漏检率的基础上，可为精准抗感染治疗方案的制定提供重要依据，有望推动骨科感染从经验性治疗向精准治疗转变。本研究存在一定局限性：样本量较小，可能存在选择偏倚，结果的普遍适用性有待多中心大样本研究验证；NTS 基于核酸检测原理，单从检测结果无法判断当前活跃感染的具体病原体；未进行独立分子验证(如 Sanger 测序)，无法完全排除极低丰度检出的假阳性可能；未进行动态随访，无法评估检测结果与治疗反应及预后的关联。未来研究将进一步扩大样本量，开展前瞻性连续入组研究；补充独立分子验证及临床随访数据；探索病原体活性检测方法；开展 NTS 指导下的精准抗感染治疗随机对照试验，验证其对临床结局的改善作用。

作者贡献声明：陈韵负责研究设计、数据整理与论文撰写；郎志刚、李可烨、张旭、梁玉祥、郭强负责病例收集与临床资料整理；严敏负责数据分析；刘磊负责研究设计、论文审校与最终定稿。所有作者均阅读并同意最终稿件内容。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] 许文，郭珈宜，陈睿，等. 慢性骨髓炎患者基于 Swanson 关怀理论的护理方案的构建及实施[J]. 护理学杂志，2025，40(4)：66－71.
Xu Wen，Guo Jiayi，Chen Rui，et al. Construction and implementation of a nursing care plan for patients with chronic osteomyelitis based on Swanson's theory of caring[J]. Journal of Nursing Science，2025，40(4)：66－71.

[2] 张乐，张茹琦，邬惟为，等. 多中心慢性骨髓炎多重耐药菌感染的耐药特点及危险因素分析[J]. 中华创伤骨科杂志，2023，25(12)：1056－1063.
Zhang Le，Zhang Ruqi，Wu Weiwei，et al. Drug resistance and risk factors of multidrug-resistant organism in chronic osteomyelitis：a multi-center retrospective study[J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma，2023，25(12)：1056－1063.

[3] 熊瑗琳，覃承诃. Cierny-Mader Ⅳ型慢性骨髓炎的诊疗新进展[J]. 中国医药指南，2023，21(13)：65－68.
Xiong Ailin，Qin Chenghe. New progress in diagnosis and treatment of Cierny-Mader type Ⅳ chronic osteomyelitis[J]. Guide of China Medicine，2023，21(13)：65－68.

[4] 陈善斌，封硕林，王穗源，等. 多重 PCR 检测与传统培养在骨关节感染诊断中的比较研究[J]. 中国病原生物学杂志，2025，20(6)：724－728.
Chen Shanbin，Feng Shuolin，Wang Suiyuan，et al. Comparison of multiplex PCR detection and conventional culture in the diagnosis of bone and joint infections[J]. Journal of Pathogen Biology，2025，20(6)：724－728.

[5] 王燕萍，陈娅，武新安，等. 慢性骨髓炎的病原学特点及抗菌药物治疗进展[J]. 中国药房，2015，26(20)：2867－2870.
Wang Yanping，Chen Ya，Wu Xinan，et al. Etiological characteristics of chronic osteomyelitis and advances in antimicrobial therapy[J]. China Pharmacy，2015，26(20)：2867－2870.

[6] Wang Xukai，Zhang Mingran，Zhu Tongtong，et al. Flourishing antibacterial strategies for osteomyelitis therapy[J]. Adv Sci (Weinh)，2023，10(11)：e2206154.

[7] 姜琦，李京蔓，侯亚义. 巨噬细胞参与伤口愈合和组织再生的研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2020，36(6)：759－766.
Jiang Qi，Li Jingman，Hou Yayi. Participation of macrophages in wound healing and tissue regeneration[J]. Chinese Journal of Immunology，2020，36(6)：759－766.
[8] Yagupsky P. *Kingella kingae*：carriage，transmission，and disease[J]. Clin Microbiol Rev，2015，28(1)：54－79.
[9] Salavitabar K，Vyas A，Barry M，et al. Chronic osteomyelitis caused by finegoldia magna[J]. Consultant，2021，62(5)：e4－e5.
[10] Xiao Ke，Zhao Dongxia，Luo Yu，et al. *Streptococcus constellatus* causing brain abscess identified by metagenomics next-generation sequencing[J]. Surg Infect (Larchmt)，2022，23(2)：207－208.
[11] Sheka D，Alabi N，Gordon P M K. Oxford nanopore sequencing in clinical microbiology and infection diagnostics[J]. Brief Bioinform，2021，22(5)：bbaa403.
[12] Miller R R，Montoya V，Gardy J L，et al. Metagenomics for pathogen detection in public health[J]. Genome Med，2013，5(9)：81.
[13] Grützke J，Malorny B，Hammerl J A，et al. Fishing in the soup-pathogen detection in food safety using metabarcoding and metagenomic sequencing[J]. Front Microbiol，2019，10：1805.
[14] Han Dongsheng，Li Ziyang，Li Rui，et al. mNGS in clinical microbiology laboratories：on the road to maturity[J]. Crit Rev Microbiol，2019，45(5/6)：668－685.
[15] Han Dongsheng，Yu Fei，Zhang Dan，et al. The real-world clinical impact of plasma mNGS testing：an observational study[J]. Microbiol Spectr，2023，11(2)：e0398322.
[16] Ashton P M，Nair S，Dallman T，et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island[J]. Nat Biotechnol，2015，33(3)：296－300.
[17] 赵镘娜，赵卫峰. 纳米孔测序技术在感染性疾病快速诊断及治疗中的应用[J]. 国际流行病学传染病学杂志，2024，51(4)：273－277.
Zhao Manna，Zhao Weifeng. Nanopore sequencing technology in the rapid diagnosis and treatment of infectious diseases[J]. International Journal of Epidemiology and Infectious Disease，2024，51(4)：273－277.
[18] Li Ruichao，Du Pengcheng，Zhang Pei，et al. Comprehensive genomic investigation of coevolution of *mcr* genes in *Escherichia coli* strains via nanopore sequencing[J]. Glob Chall，2021，5(3)：2000014.
[19] Huang Zida，Wang Chaoxin，Shi Tengbin，et al. Salmonella osteomyelitis in adults：a systematic review[J]. Orthop Surg，2021，13(4)：1135－1140.
[20] Afacan M Y，Davulcu C D，Kaynak G，et al. A rare case of periprosthetic joint infection with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies dysgalactiae[J]. Indian J Orthop，2024，58(5)：606－612.
[21] 赵新国，张洪明. 39 例停乳链球菌似马亚种血流感染临床特点分析[J]. 实用临床医药杂志，2023，27(7)：124－128.
Zhao Xinguo，Zhang Hongming. Clinical characteristics of 39 cases of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies equisimilis bloodstream infection[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice，2023，27(7)：124－128.
[22] 蔡慧君，汤正好. 非结核分枝杆菌的感染现状与诊断方法研究进展[J]. 中国临床医学，2023，30(5)：900－907.
Cai Huijun，Tang Zhenghao. Infection status and diagnostic methods progress of nontuberculous *Mycobacteria*[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine，2023，30(5)：900－907.
[23] Salem K H. Salmonella osteomyelitis：a rare differential diagnosis in osteolytic lesions around the knee[J]. J Infect Public Health，2014，7(1)：66－69.
[24] Itoh N，Murakami H，Ishibana Y，et al. A case of Salmonella osteomyelitis mimicking a malignant tumor of the humerus in an immunocompetent adult patient identified using broad-range polymerase chain reaction with sequencing of a biopsied specimen[J]. J Infect Chemother，2021，27(12)：1769－1773.
[25] Chiu C Y，Miller S A. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet，2019，20(6)：341－355.
[26] Flemming H C，Wuertz S. Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms[J]. Nat Rev Microbiol，2019，17(4)：247－260.
[27] Bjarnsholt T，Ciofu O，Molin S，et al. Applying insights from biofilm biology to drug development：can a new approach be developed? [J]. Nat Rev Drug Discov，2013，12(10)：791－808.
[28] Su Yu，Li Dongchen，Du Bing，et al. Analysis of risk factors for the recurrence of osteomyelitis of the limb after treatment with antibiotic-loaded calcium sulfate and autologous bone graft[J]. Front Bioeng Biotechnol，2024，12：1368818.
[29] Qin Leilei，Yang Shuhao，Zhao Chen，et al. Prospects and challenges for the application of tissue engineering technologies in the treatment of bone infections[J]. Bone Res，2024，12(1)：28.
[30] Indari O，Ghosh S，Bal A S，et al. Awakening the sleeping giant：Epstein-Barr virus reactivation by biological agents[J]. Pathog Dis，2024，82：ftae002.
[31] Silva J D M，Alves C E D C，Pontes G S. Epstein-Barr virus：the mastermind of immune chaos[J]. Front Immunol，2024，15：1297994.
[32] Su Ze，Wang Ziran，Yi Jie，et al. Detection of EBV DNA in clinically ill patients from 2013 to 2023 in Beijing，China[J]. Front Microbiol，2025，16：1651320.
[33] Yang Bingbing，Xin Xiaoqi，Cao Xiaoqing，et al. Phenotypic and genotypic perspectives on detection methods for bacterial antimicrobial resistance in a one health context：research progress and prospects[J]. Arch Microbiol，2024，206(10)：409.
[34] Yang Chen，Dai Guangchuan，Guo Yicheng，et al. Nanopore-based targeted sequencing (NTS) for drug-resistant tuberculosis：an integrated tool for personalized treatment strategies and guidance for new drug development[J]. BMC Infect Dis，2025，25(1)：861.

（本文编辑：陈玉华）

本文引用格式：陈韵，郎志刚，李可烨，等. 基于纳米孔靶向测序的培养阴性骨科感染病原谱分析[J]. 中国感染控制杂志，2026，25(11)：1700－1707. DOI：10.12138/j.issn.1671－9638.20264734.
Cite this article as：Chen Yun，Lang Zhigang，Li Keye，et al. Pathogen spectrum analysis of culture-negative orthopedic infections based on nanopore targeted sequencing[J]. Chin J Infect Control，2026，25(11)：1700－1707. DOI：10.12138/j.issn.1671－9638.20264734.