

# 病原宏基因组高通量测序临床本地化检测规范专家共识

中国药师协会 中华医学会细菌感染与耐药防治分会 国家卫生健康委临床抗微生物药物敏感性折点研究和标准制定专家委员会

通信作者: 杨启文, 中国医学科学院北京协和医院, 北京 100730, Email: yangqiwen81@vip.163.com; 王明贵, 复旦大学华山医院抗生素研究所, 上海 200040, Email: mgwang@fudan.edu.cn

**【摘要】** 感染性疾病严重危害人类生命健康, 快速准确检测病原体是有效治疗和精准防控感染性疾病的关键环节。传统的病原学检验技术覆盖的微生物种类少, 难以满足临床需求。宏基因组高通量测序(mNGS)理论上可同时检测所有已知基因序列的病原体, 在很大程度上提高了临床疑难危重感染、罕见和新发病原体感染的诊断水平和救治能力。在个体化医疗需求的大背景下, 新技术的实验室自建检测能够持续提高临床诊治水平。由于mNGS技术平台研发起点高、操作流程复杂, 为了保证该技术合理应用, 保障患者医疗安全, 本文在临床检验、感染、危重症及体外诊断等领域的专家就mNGS-LDT的流程搭建、性能确认、质量控制、报告审核等方面形成共识并提出规范要求和建议。

**【关键词】** 病原宏基因组测序; 实验室自建检测; 性能确认; 质量控制

## Expert consensus on clinical localization detection standards for metagenomic next generation sequencing of pathogens

Chinese Pharmacists Association Branch of Bacterial Infection and Resistant Prevention of Chinese Medical Association Expert Committee of the National Health Commission on Antimicrobial Susceptibility Testing and Standard Research

Corresponding authors: Yang Qiwen, Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China, Email: yangqiwen81@vip.163.com; Wang Minggui, Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China, Email: mgwang@fudan.edu.cn

**【Abstract】** Infectious diseases seriously endanger human health. Rapid and accurate detection of pathogens is the key to effective treatment and precise prevention and control of infectious diseases. Traditional pathogen testing techniques cover a limited variety of microorganisms, making it difficult to meet clinical needs. Metagenomic Next Generation Sequencing (mNGS) theoretically can simultaneously detect all known gene sequences of pathogens, greatly improving the clinical capacity of diagnosing and treating patients with severe, complicated, rare, and emerging pathogen infections. In the context of individualized health needs, the self-built testing of new technologies in laboratories can continuously improve the level of clinical diagnosis and treatment. Due to the high starting point of research and development and the complex operation process of the mNGS technology platform, this study reaches a consensus on the experimental procedure, assay validation, quality control, and report review of the mNGS-LDT in the fields of

DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20230720-00019

收稿日期 2023-07-20 本文编辑 徐巍

引用本文: 中国药师协会, 中华医学会细菌感染与耐药防治分会, 国家卫生健康委临床抗微生物药物敏感性折点研究和标准制定专家委员会. 病原宏基因组高通量测序临床本地化检测规范专家共识[J]. 中华预防医学杂志, XXXX, XX(XX): 1-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20230720-00019.



clinical testing, infection, critical care, and in vitro diagnosis to ensure the appropriate application of the technology and guarantee patient safety and proposes standardized requirements and suggestions.

**【Key words】** Metagenomic next generation sequencing; Laboratory developed test; Assay validation; Quality control

实验室自建检测 (laboratory developed test, LDT) 是指实验室自行研发、确认, 仅限于本实验室使用的检测技术<sup>[1]</sup>。近年来, 随着检测技术的创新和发展, 一些前沿技术如基因测序、质谱分析和流式细胞术等快速从基础研究向临床转化, 并展现出良好的应用前景。美国已将体外诊断 (in vitro diagnostics, IVD) 新技术纳入 LDT 模式管理<sup>[2]</sup>。我国 2016 年《国家卫生计生委办公厅关于临床检验项目管理有关问题的通知》提出, 对于未列入《医疗机构临床检验项目目录》, 但临床意义明确、特异性和敏感性较好、价格效益合理的临床检验项目, 应当及时论证, 满足临床需求<sup>[3]</sup>。2021 年国家药品监督管理局发布的《医疗器械监督管理条例》中指出, 对国内尚无同品种产品上市的体外诊断试剂, 符合条件的医疗机构根据本单位的临床需要, 可以自行研制, 在执业医师指导下在本单位内使用<sup>[4]</sup>。宏基因组高通量测序技术 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 可以不基于假设、无偏倚地检测疑似感染患者标本中的病原微生物, 扩大病原体检测种类, 缩短检测时间, 提供可用于患者诊断、制定治疗方案的关键信息, 有效提升感染性疾病的诊疗水平, 助力抗菌药物合理应用<sup>[5]</sup>。mNGS 还有助于解决新发、罕见、疑难病原体的漏检问题<sup>[6-9]</sup>。但 mNGS 覆盖病原体种类多、临床验证难度大、验证周期长, 使得常规 IVD 产品注册较为困难。为满足临床需要, 本共识将在实验室符合国家政策法规以及保证检测方法性能可靠的前提下如何在本地开展 mNGS 检测提出具体指导意见。

### 一、mNGS 实验室建设基本要求

#### (一) 实验室结构布局和环境条件

mNGS 在实验环节中根据是否使用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 构建文库, 可分为 PCR 建库与 PCR-free 建库两大类型, 两者在实验室空间要求上有所差异。PCR 建库中采用通用引物对文库核酸分子进行扩增, 核酸产物浓度较高, 对产物的后续操作 (加热、震荡、离心、混匀、移液) 可能产生气溶胶, 易造成实验室环境和其他文库的污染, 从而产生假阳性结果。因此, 基于 PCR

建库的 mNGS 实验室宜参照《医疗机构临床基因扩增管理办法》<sup>[10]</sup> 相关要求, 在符合 PCR 要求的实验室中开展, 防止核酸扩增产物造成的实验室污染。

基于 PCR-free 建库的 mNGS 实验可在同一个空间内设置试剂准备区、标本处理区 (配备生物安全柜) 和建库测序区 (PCR-free 建库、文库纯化、等量混合、上机测序)。PCR-free 文库浓度可能低于 Qubit 荧光定量仪的检测限, 建议使用荧光定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 方法进行文库浓度测定。虽然基于 PCR-free 建库的 mNGS 实验在文库定量前实验操作不存在 PCR 扩增建库所带来的气溶胶风险, 但仍然需要警惕人员操作等带来的气溶胶污染可能性, 并在一个相对独立的空间进行 qPCR 法文库浓度测定。

#### (二) 生物安全防护

mNGS 所检测的微生物涉及范围广泛, 实验操作应该在具备至少生物安全二级 (biosafety level 2, BSL-2) 资质的实验室中进行, 并按照生物安全相关要求进行操作。如果处理可疑高致病性病原体的标本, 须满足更高要求的行业标准和规范的要求<sup>[11]</sup>。

#### (三) 设备设施

mNGS 实验设备和器材应能满足湿实验、干实验和质量控制需求。由于 mNGS 相较传统 PCR 有更高的病原体覆盖范围和防污染要求, 在保证实验质量的前提下优先采用经性能确认的封闭式自动化设备代替部分人工操作, 有利于避免实验过程中来自操作人员和实验室环境中的微生物或其核酸造成的污染。

#### (四) 人员配置

根据每天处理的标本数量, 实验室应配备具有相应专业背景并能满足需要的工作人员, 包括: (1) 湿实验应由具备分子生物学检验专业技能的人员, 如分子生物学检验专业检验技师操作; (2) 干实验需要配备生物信息研发及管理人员, 以保证分析流程、持续更新、性能确认、维护及管理<sup>[12]</sup>; (3) 结果审核应配备具有临床感染病学相关知识的微生物检验医师。针对疑难报告, 建议成立 mNGS 报告解

读团队,由具备临床感染病学、临床微生物检验学、临床分子生物学、生物信息学等相关专业知识的人员组成。所有人员均须通过岗位相关的培训和考核,并进行定期能力评估方能上岗。

#### (五)方法学选择

实验室在正式开展实验前应对 mNGS 的全流程检测方法进行选择 and 性能确认,特别对影响检测结果的核心要素,包括但不限于标本核酸提取方法、是否去宿主核酸以及去宿主核酸方法、是否富集微生物核酸以及富集方法、建库方法、测序方法、最小测序数据量确认、生物信息分析算法、数据库选择、背景核酸识别方法、新发病原体识别方法等,以满足方法符合率、交叉反应、精密度、准确度、检出限、抗干扰能力(如针对高入源标本)、稳定性等性能参数的要求。实验室要进行严格的筛选和充分的数据验证,以求得到最佳的临床检测效能。经确认的检测方法和实验参数需要进行标准文件化管理,并由实验室的技术质量负责人和项目负责人共同确认后实施。项目负责人负责 mNGS 项目的立项、研究、验证、制备等运行管理工作,技术质量负责人负责 mNGS 项目的研究、质量管理体系的建立和运行、产品放行等工作。方法学参数如有变更需进行验证后再应用于临床标本检测。

#### 二、湿实验流程搭建

湿实验流程是指对待测标本进行前处理、核酸提取、文库构建、高通量测序,以获得核酸测序数据的实验室操作环节。湿实验流程按操作方式分为手工操作和自动化操作。在引进自动化设备时需要使用与之配套兼容的湿实验试剂和流程,经性能确认合格后使用。根据检测病原体的类型,实验室可分别建立脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)湿实验流程。

#### (一)标本前处理

为提高 mNGS 检测的敏感性,可考虑在标本前处理过程中对病原体或其核酸进行富集,可选择正向富集法与反向富集法两类。正向富集法以 PCR 富集和探针捕获为代表,属于核酸提取后的富集方式。反向富集法即去宿主技术,包括差速离心、差异化裂解、甲基化抗体处理等流程<sup>[13]</sup>。病原核酸富集需要结合标本类型、项目预期用途综合考虑检测性能、成本、操作时效性以及目标病原体可能造成的损失和偏好性,在开展性能确认后再次予以使用。

#### (二)核酸提取

核酸提取分为核酸释放与纯化两个主要步骤。核酸释放方法包括物理法(机械研磨、超声破碎等)、化学法(十六烷基三乙基溴化铵法或十二烷基磺酸钠法等)、酶裂解法等,不同方法的核酸释放效果有差异。实验室需要综合考虑不同方法对不同病原体核酸的释放效果,寻找最佳平衡点保障核酸提取的效率。以物理释放法为例,破壁强度的提升能提高胞内菌和真菌等病原体的裂解效率和核酸得率,但可能会破坏病毒核酸和游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA)<sup>[14]</sup>。在使用物理方法时,破壁时长(循环次数)、破壁强度以及微珠材质和粒径都是应考虑的因素。为提升释放效果,可采取物理、化学、酶解等多方法联合使用。在物理破壁完成后,增加十二烷基硫酸钠和蛋白酶 K 的孵育,可达到充分裂解、释放核酸的目的<sup>[15]</sup>。核酸纯化一般采用磁珠法或柱法两种<sup>[16]</sup>,建议对纯化后的核酸浓度、纯度进行测试以满足后续建库的要求。

核酸提取和纯化若使用手工操作,应考虑不同标本类型的差异、不同核酸提取试剂盒的提取效率、纯度以及片段大小等因素;若使用自动化核酸提取仪系统,需要综合考虑检测通量、自动化程度、成本、核酸质量等因素。

#### (三)文库构建

DNA 文库构建主要分为 TA 连接法建库与转座酶建库。RNA 文库构建与 DNA 相比,最主要的差异在于逆转录步骤,在保证建库稳定性的前提下可考虑去除人核糖体 RNA(占总 RNA 比例约 85%~90%)以提高 RNA 病毒的检测敏感性。建库方法可分为手工法建库和仪器自动化建库,实验室在选择方法前需对核心技术环节(如标签、接头的连接)质量进行评估,主要质量指标包括单/双标签测序,连接效率等。此外还应考察建库前核酸投入量的下限和上限,确保取得的文库在核酸插入片段的大小分布上满足所使用的高通量测序仪、测序模式和读长,以及后续生信分析对片段大小的要求(常见要求为插入片段 50~500 bp,主峰集中在 $\pm 100$  bp),以避免过度片段化或片段化不足的情况。

#### (四)高通量测序

测序仪与配套试剂、耗材通常为封闭一体化设计。实验室按照所选购设备的操作说明书进行相关操作。在选择测序仪时,要综合考虑兼容性、测序通量、测序时间、碱基判定的准确性、成本等因素。为降低标签跳跃带来的假阳性,宜使用双标签

测序模式。

### 三、干实验流程搭建

干实验流程是指对测序数据进行生物信息学分析及结果审核和报告的过程。

#### (一)搭建模式、数据存储与传输

mNGS 生物信息分析涉及算法、软件和数据数据库,需要基于临床预期用途及可能的日常检测标本量计算所需要的服务器性能,保证下机数据能够在预期时间内完成分析。如有条件,建议实验室优先使用本地服务器进行数据的存储和管理,数据存储、访问、下载、分析等均应符合国家对医学数据管理的要求。若选择云端分析系统<sup>[17]</sup>,由于测序数据中含有患者的遗传信息,需要与服务提供商针对数据访问、使用、披露、中止、修改的权限与机密性达成书面协议<sup>[18]</sup>。实验室必须确定数据存储的数量、媒介、位置和储存时限,数据的传输过程中应设置只读访问,防止被篡改。

#### (二)干实验流程搭建步骤与建议

1. 原始数据的存储与传输:实验室应确定原始测序数据及 FASTQ 文件在服务器上存储的位置,并明确具备唯一标识的统一命名,便于数据调用与快速分类查找。文件命名建议包含数据检测/分析日期、检测实验室名称、标本类型、测序批次、唯一的标本编码等。命名规则一旦确定不得随意改动。

2. 数据预处理:实验室可通过 FASTQC<sup>[19]</sup> 和 MultiQC<sup>[20]</sup> 等软件查看测序数据质量、总数据量、碱基质量值(Q20 和 Q30)等,结合测序芯片泳道上生成的簇密度设置质控点(如簇密度是否偏离有效范围,碱基识别质量值 $\geq$ Q30 的数据比例是否偏低)判断本批次数据能否用于后续分析。数据过滤规则可根据实验室对 mNGS 检测的敏感性和特异性需求进行调整,建议设置 Q30 碱基数量占比 $>$ 75%、有效序列长度不小于 50 bp、含 N 碱基比例小于 10% 等参数阈值。

3. 过滤宿主序列:为了提高微生物数据的分析时效性,需要去除测序数据中的宿主序列,通常方法是把比对到人类基因组的序列进行过滤。真菌和寄生虫与人类的基因组序列有一定的同源性,在过滤宿主序列的过程中需要评估运行时间、去除效率与非特异性去除(非人源序列而被错误过滤)的序列比例。

4. 物种注释:物种注释是病原宏基因组检测最核心的内容之一,主要是将通过质量控制的非宿主序列与微生物参考数据库比对,或者经过从头组装

成 contigs/scaffolds 后再比对到微生物参考数据库,确定在特定序列相似性阈值(如 $\geq$ 97%)下的物种分类级别。物种注释的准确性取决于所选注释工具的敏感性和特异性、算法阈值的合理性、参考数据库的完整性及其纳入微生物基因组的准确性<sup>[12]</sup>。目前可用的注释工具分为三类:(1) DNA-to-DNA 比对工具;(2) DNA-to-Protein 比对工具;(3) 基于特征标记基因的比对工具。有研究表明,利用相同的模拟数据集测试不同的宏基因组学分类工具,发现不同的分类工具识别的物种数量可能相差 3 个数量级以上<sup>[21]</sup>。在 mNGS 中,DNA-to-DNA 工具往往比 DNA-to-Protein 工具能够更好地进行物种分类<sup>[22]</sup>,但 DNA-to-Protein 工具在识别新发和高度可变的基因序列时敏感性更高<sup>[23]</sup>。而在以注重物种丰度的微生物组学分析中,则推荐使用基于特征标记基因的比对工具<sup>[24]</sup>。总之,实验室在选择物种注释工具时,应基于检测的预期用途,从运行速度、准确率、精确率、召回率等维度评估性能<sup>[17]</sup>。实验室可使用近缘物种的基因序列对分析软件的物种注释功能进行评估,另外在数据库或分析算法有变更时,以及定期对本实验室的 mNGS 物种/基因注释功能进行评估。

5. 参考数据库:微生物参考数据库的选择显著影响物种注释分类的结果<sup>[25-26]</sup>。《宏基因组测序病原微生物检测生物信息学分析规范化管理专家共识》<sup>[17]</sup>中对 mNGS 常用微生物数据库的特征有较为详细的描述。目前没有任何一个公共数据库能够包含所有的潜在人类病原体的基因组信息(假阴性风险),且数据库中不可避免地存在一些注释错误或污染的序列(假阳性风险)<sup>[27]</sup>。因此在构建、使用和管理这类数据库时需要重点关注以下问题:(1)充分评估数据库的全面性以及纳入物种在分类学上的代表性。同一微生物,往往具有遗传差异的不同亚型或株,在选择基因组时,应该考虑到微生物的遗传多样性,尽可能多地纳入不同亚型或株的高质量基因组;(2)无论所选参考基因组的来源如何,实验室都需要通过重测序或其他技术手段确认其注释的准确性,序列的完整性,避免纳入错误注释、命名错误或代表性不足的微生物序列;(3)病原体(尤其是 RNA 病毒)在自然状态下是不断发生变异的,所以需要及时(或定期)对参考数据库中的基因组信息进行更新及验证<sup>[28-29]</sup>,更新的频率取决于实验室或临床的需求,以及序列在公共数据库中的上传或更新时间<sup>[28]</sup>;发生可能影响结果的数据库修

改、替换及更新等活动均需要重新进行评估;建议实验室每年对微生物数据库进行审核,必要时随时进行更新。但是对于使用本地化服务器的实验室,构建的数据库大小需要权衡服务器的计算能力以及报告的时效性要求。

6. 读长归一化:mNGS检测到的微生物常以读长数作为结果,但它受测序量、标本质量等因素的影响,并且同张芯片不同文库分配的下机数据量会有波动,所以有必要对读长进行归一化处理<sup>[30]</sup>。建议将每百万测序读长中匹配到某一微生物基因组的特异读长(reads per million, RPM)作为归一化指标<sup>[30]</sup>。如果希望比较不同微生物在同一文库中的读长,则还需考虑微生物基因组大小不同带来的差异(理论上,在相同条件下,基因组越长,测得的读长越多),建议通过计算每百万测序量下每一个碱基的基因组长度的归一化读长来消除这种影响<sup>[28]</sup>。需要注意,由于mNGS检测原理不同于qPCR, RPM不能作为微生物核酸的定量指标。

7. 版本控制:由于缺乏标准的mNGS生物学分析方案,各实验室自建分析流程内部使用的分析软件与数据库处在不断更新、确认及完善的动态过程中。为了保证每批次临床标本结果的可溯源性及可重复性,实验室需要明确每一次测试所使用的软件及数据库的版本,建议在报告单中体现,至少应包括分析日期、软件名称和版本号、对每个组成工具及算法的用户自定义参数和系统默认值等<sup>[28]</sup>,可使用版本管理工具如Conda完成<sup>[31]</sup>。此外,可使用流程管理工具如Snakemak和Nextflow等对整个工具集进行版本控制。

#### 四、mNGS的性能确认

##### (一)干实验的性能确认

当生物学分析流程建立后,需对其进行性能确认<sup>[16]</sup>,可以通过三类数据集进行:(1)临床标本测序数据集:注释充分、特征明确的临床标本测序数据(FASTQ或其他格式)<sup>[32]</sup>;(2)计算机模拟测序数据:利用序列模拟软件模拟生成测序数据集<sup>[16, 33]</sup>,要求既要具有与真实测序数据质量相同/相似的技术参数(文库片段长度分布、测序模式、测序错误类型及频率、测序质量值、测序深度等)<sup>[16, 34]</sup>,也要尽可能对临床标本的背景成分信息如宿主核酸、微生物和试剂背景核酸等进行模拟;(3)组合数据集:利用序列模拟软件定量模拟一种或多种目标病原体的测序数据,然后将模拟序列添加到目标病原体阴性标本的真实测序数据中,形成

接近临床标本的模拟数据集<sup>[16]</sup>。利用上述数据开展性能确认,确定干实验流程的主要性能指标,包括准确率、精确率、召回率和F1-Score(即精确度和召回率的调和平均值)等<sup>[28, 35]</sup>。如果在比对过程中出现寄生虫的假阳性结果(寄生虫为真核生物,与宿主序列相似度较高,且部分寄生虫基因组数据中存在人源序列的污染),需要考虑设置更高的阳性汇报阈值或者对相应寄生虫的基因组数据进行清洗。常见的寄生虫汇报阈值为与阴性对照相比RPM达到10倍以上,基因组数据清洗常采用把目标寄生虫基因组单独与人基因组比对并去除高度同源的序列<sup>[36]</sup>。

##### (二)全流程的性能确认

确认mNGS湿实验和干实验全流程对病原体的检测能力是否能够达到临床预期用途。在全流程性能确认中至少应包括革兰阳性菌、革兰阴性菌、分枝杆菌、丝状真菌、酵母菌、DNA病毒、RNA病毒、寄生虫,同时应关注胞内菌和难破壁的原微生物。

##### (三)性能确认参数

可参考《分子诊断检验程序性能验证指南》<sup>[37]</sup>、《临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性能验证》<sup>[38]</sup>、《病原宏基因组高通量测序性能确认方案》<sup>[35]</sup>等,建议实验室mNGS检测系统应对方法符合率、交叉反应、精密度、准确度、检出限、抗干扰能力(如针对高入源标本)、稳定性等性能参数进行确认。

##### (四)样品盘的制备

样品盘要包含模拟参考品和已知病原检测结果的真实临床标本。样品盘的设置应严格遵循临床预期用途所涉及的标本类型,所含微生物应有代表性,尽可能覆盖预期用途中的病原体。标准微生物菌株可以选用ATCC或CMCC菌株等。应根据不同标本类型来合理地设置模拟参考品中的人源细胞浓度(如支气管肺泡灌洗液的人源细胞浓度中位数为 $10^5$  cells/ml)。模拟参考品中应至少包含革兰阳性菌、革兰阴性菌、丝状真菌、酵母、DNA病毒、RNA病毒、寄生虫共7类病原微生物。在制备模拟参考品前,针对所有待投入微生物进行最低检出限(limit of detection, LoD)研究并确认是否能满足预期用途中对检测性能的要求,模拟参考品示例见表1, D1-1的微生物投入浓度为LoD的5倍,可作为弱阳性参考品进行准确度、精密度、稳定性等参数的确认, D1-2的微生物投入浓度为LoD浓度,可作

为准确度、精密度、抗干扰能力等参数的确认。

#### (五)方法符合率

使用已在国家药品监督管理局备案并批准上市的商品化实时荧光定量 PCR 试剂盒、数字 PCR 试剂盒或临床金标准(微生物培养鉴定、病理染色等)作为参比方法,必要时可使用一代测序作为参比。选取阴性标本 5 例,阳性标本 5 例。按照标本检测程序与参比方法平行检测,计算方法符合率。

#### (六)交叉反应

选取同属内近源物种,例如屎肠球菌和粪肠球菌、白念珠菌和热带念珠菌、纹带棒杆菌和白喉棒杆菌等,将其分别按照一定浓度比例进行混合测序,统计近源物种的检出情况、读长比例、相对丰度比例与预期是否一致(示例见表 1, D2 参考品)。

#### (七)精密度

1. 批内精密度:将上述参考品在同一时间内用相同批次试剂完成 3 个全流程重复,分析批次内结果重复性。

2. 批间精密度:用不同批次的试剂分别将上述参考品在 3 个工作日内完成各 3 个全流程重复,分析批次间重复性。

3. 可接受标准:对阳性标本,分析结果是指通过生信流程得到的检出病原中包括该参考品中的病原体,则记为正确结果,否则为错误结果。结果一致的实验数占全部实验数比例高于 95%,判断为可接受。

#### (八)准确度

采用参考品(模拟参考品)和真实临床标本进行比对。在真实临床标本选择上,应综合病原体分离培养、患者的影像学检查结果、基于宿主反应的检测结果以及靶向治疗后患者的临床表现等综合评价。

1. 样本选择:全流程检测不少于 20 例标本,包括 6 例阳性参考品(每例模拟混合参考品包含不少于 4 种微生物),14 例临床标本(不少于 10 例培养阳性)。分析检测结果与已知参考品的内含微生物以及临床综合判断结果是否一致,对于结果不一致

的使用 qPCR 或者送至另一稳定运行的 mNGS 实验室进行差异检验。

2. 可接受标准:20 例标本中物种准确性 $\geq 90\%$ ,则验证通过。对于临床标本,金标准方法和结合临床信息综合判定的病原体在 mNGS 检测结果列表之中可判定为符合。

#### (九)检出限

mNGS 的检出限受宿主细胞浓度、核酸提取效率、病原体种类等多种因素影响,建议以待测标本类型中宿主细胞的中位数浓度对病原体检出限进行评估,以 95% 的重复均能检测到某一病原体的最低浓度为检出限。

1. 浓度选择:使用阳性参考品梯度稀释至拟定的检出限浓度,可重复测定 5 次或在不同批内对该浓度标本进行 20 次重复测定(如测定 5 d,每天测定 4 份标本)。可根据情况选用稀释液或阴性标本,该稀释液不得含有被验证的目标病原体。

2. 判断标准:如果是 5 次重复检测,必须全部检出靶核酸;如果是 20 次检测,必须检出至少 19 次(95% 检出率)靶核酸。

#### (十)稳定性

1. 实验过程:将投入 5~10 倍 LoD 病原体的临床模拟标本,在 4 °C、-20 °C 冰箱分别保存 1、4、7 d,在 -80 °C 冰箱分别冻融 1 和 2 次,评估对检测结果的影响。

2. 可接受标准:所有重复均检出目标病原体。

#### (十一)抗干扰性

在投入 3~5 倍 LoD 病原体的临床模拟标本中分别额外加入更高浓度(比如  $10^6$  cell/ml、 $10^7$  cell/ml)的宿主细胞,每份标本重复 2~3 次,以弱阳性参考品无法检出时的内参 RPM 值作为阈值。当进行临床报告解读时,若内参 RPM 低于阈值,需警惕假阴性。

#### 五、临床诊断性能评价

在完成 mNGS 的分析性能确认后,需要使用真实标本进行临床检测效能评估<sup>[39]</sup>。临床有效性包含敏感性和特异性。敏感性是指参考方法检测结

表 1 模拟参考品示例

参考品编号	投入微生物	病原体浓度(copies/ml 或 CFU/ml)	
D1	金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、烟曲霉、白念珠菌、腺病毒、呼吸道合胞病毒、刚地弓形虫	D1-1: $5 \times \text{LoD}$	D1-2: $1 \times \text{LoD}$
D2	屎肠球菌、粪肠球菌	D2-1: 屎肠球菌 $10^4$ copies/ml; 粪肠球菌 $10^3$ copies/ml	D2-2: 屎肠球菌 $10^3$ copies/ml; 粪肠球菌 $10^4$ copies/ml

注:人源细胞浓度  $1 \times 10^5$  cell/ml



果为阳性的标本中, mNGS 得到相同阳性结果的比例<sup>[40]</sup>。敏感性低则意味着会出现较多漏检(假阴性)。特异性指参考方法检测结果为阴性的标本中, mNGS 得到相同阴性结果的比例, 特异性低则意味着会出现较多假阳性结果。参考方法包含微生物培养、病理检测、免疫学检测、PCR、一代测序等。

临床检测性能评价主要采用观察性研究。观察性研究中通过评价 mNGS 检测结果与临床其他参考方法结果的一致性, 确认敏感性和特异性。研究应遵循《世界医学大会赫尔辛基宣言》的伦理准则和国家涉及人的生物医学研究伦理的相关要求, 应当经伦理委员会审查并同意。标本量与预期用途、评价指标等多种因素相关。标本量估算通常是基于统计学要求的最低标本量估计<sup>[41]</sup>。值得注意的是, 在评价某些罕见的病原体, 阳性病例的数量有限, 可以引用文献报道的临床敏感性和特异性作为理论支撑<sup>[42]</sup>。实验室可采用“代表性病原体”进行临床诊断性能评价<sup>[43-45]</sup>, 比如根据临床预期用途选择不同类型的常见的病原体<sup>[43]</sup>, 以为同类病原体提供参考和借鉴。近年来已发表数篇基于脑脊液、呼吸道标本、血浆等标本类型的 mNGS 检测流程和临床性能确认的研究可供实验方案参考<sup>[16, 25, 36, 46-47]</sup>。

## 六、mNGS 的质量管理

mNGS 质量管理的目的是规范分析前、分析中和分析后三个阶段质量控制, 确保 mNGS 检测报告的质量。

### (一) 分析前质量控制

分析前质量控制涉及标本采集和送检流程, 标本前处理流程, 试剂耗材的批次、分装、储存时间以及设备的维护等环节, 需对上述环节设置质控点进行监控。基于此, 应建立标本采集与送检流程以明确标本选择、采集时机和方式、容器/耗材、标本量、送检单填写规则、运送保存条件、拒收标准等, 以减少环境和人体定植微生物或其核酸污染, 同时考虑标本保存运输的稳定性<sup>[6]</sup>; 应建立临床标本的标准化前处理程序, 对标本性状(比如澄清、黏稠、带血、漏液等)和运输容器/时长/温度等建立明确的接收和拒收标准; 应建立试剂、耗材的批次、分装、储存时间以及设备的维护等流程质控标准, 以保障关键试剂(比如片段化酶、连接酶、聚合酶等)和关键设备(比如核酸提取仪、PCR 仪、建库仪、测序仪等)的稳定性和有效性。

### (二) 分析中质量控制

分析中质量控制涉及核酸提取、文库建立、测序生信分析等众多环节。涉及的质控点包括: 核酸浓度、纯度、完整性等; 建库前核酸投入量下限与上限、文库核酸浓度、纯度、片段大小分布; 文库有效数据量、Q30 值、接头比例、内参序列(人工合成双链 DNA 序列或使用噬菌体, 与待测病原体基因组没有同源性)的检出等。需要建立: 核酸提取的质控标准; 文库质控标准; 测序数据建立标准<sup>[48]</sup>; 明确室内质控(阴性、阳性质控品)的在控和失控标准, 每次测序需要包括阴性和阳性质控品。质控品作为患者标本的类似物或替代品, 完全按照真实标本的检测流程进行操作。不建议用纯水或磷酸盐缓冲液等不含人源细胞/核酸的标本作为阴性对照, 因为此类低核酸浓度标本会造成建库失败或背景微生物序列的过度放大而影响其作为背景监测和阳性判断阈值参考的作用。可以根据待测标本类型的人源细胞/核酸浓度的分布和中位数设置阴性对照标本的人源含量。阳性质控品可以根据分析性能确认的数据, 在人源细胞基质(可与阴性对照标本浓度保持一致)中投入 3~5 倍 LoD(弱阳性)的不同类型的灭活微生物来制备<sup>[16]</sup>, 不建议使用质粒作为阳性质控品。

### (三) 分析后质量控制

分析后质控涉及报告周转时间、阳性率/阴性率、室内质控失败率、报告修改率、与临床诊断的一致率、复测率、取消测试数等数据的记录、统计和分析, 对异常记录提供纠正措施以不断改进和优化流程, 并审查所有与检测相关的文档<sup>[49]</sup>。此外, 各实验室应定期进行室间质评或能力验证, 在检测流程有重大调整, 或更换核心试剂耗材时需要再次进行性能确认。国家卫生健康委临床检验中心已开展多次 mNGS 室间质评预研, 建议实验室积极参加此类质量评价活动, 发现结果不符应立即查找原因, 及时整改。

## 七、mNGS 推荐使用的人群、时机和疾病

### (一) mNGS 推荐使用的人群

重症感染患者尤其是重要脏器衰竭, 甚至多器官功能衰竭患者。常规检测的同时, 或在常规检测未得到病原学证据时获取符合检测要求的合格标本进行 mNGS 检测<sup>[14, 36, 50-55]</sup>; 高度疑似复杂感染, 病原学诊断未明确且常规抗感染治疗无效患者, 建议进一步完善常规病原学检测的同时开展 mNGS 检测<sup>[43, 56]</sup>; 慢性感染, 慢性疾病难以除外感染, 抗感染疗效不

佳需要明确病因患者,在完善常规检测的基础上开展 mNGS 检测<sup>[57]</sup>;免疫缺陷患者感染,因为易发生机会致病菌感染和混合感染,而且感染病原体复杂多样<sup>[58]</sup>,考虑应用常规技术检测的同时,或在其基础上开展 mNGS 检测;不明原因发热患者,考虑感染或不除外感染,规范性经验抗感染治疗无效,考虑应用常规技术检测的同时,或在其基础上开展 mNGS 检测。

## (二)mNGS 推荐使用的时机

1. 尽早使用:危急重症感染或局部感染不及时处理则后果严重,恐危及生命时,应在常规病原检测基础上,尽早使用 mNGS 检测辅助明确病原体<sup>[43, 59]</sup>;特殊病原体感染,存在群体性感染事件风险,应在开展常规快速检测的同时,尽早使用 mNGS 检测辅助明确病原体。

2. 在治疗过程中使用:高度疑似感染性疾病,但传统微生物检测反复阴性且治疗效果不佳时,考虑在完善常规病原学检测的同时或在其基础上开展 mNGS 检测;传统病原学检测的结果不能解释临床表现的全貌或/和抗感染治疗的反应,怀疑同时存在其他病原感染时,考虑在进一步完善更多病原学检测的同时或在其基础上开展 mNGS 检测;特殊患者如免疫抑制、器官移植术后、反复住院、合并基础疾病,疑似继发感染、新发感染时,考虑常规病原学检测的同时或在其基础上开展 mNGS 检测<sup>[60-61]</sup>。

3. 择期使用:表现为慢性或局部感染,或慢性感染不除外感染,在尝试常规病原学检查未能明确致病源或/和规范性经验抗感染治疗无效时,建议在进一步完善常规病原学检测的基础上,与患者充分沟通后择期使用 mNGS 检测辅助明确病原体<sup>[51]</sup>。

## 八、mNGS 标本的选择及采集

mNGS 检测可对标本中所有核酸进行检测,不同标本中的人源核酸含量不尽相同,人源核酸含量越多,对结果的干扰越大<sup>[62]</sup>。目前临床对 mNGS 检测

的要求认识不充分,标本的选择、采集和运送缺乏统一的规范和要求。

mNGS 检测技术几乎适用于所有类型的临床标本,标本的选择须结合患者情况、流行病学、病原体特性、受累器官及感染部位等状况综合考虑。怀疑高致病性、新发或突发病原微生物时,标本运送须经相关部门批准,严格按照《人间传播的病原微生物名录》<sup>[63]</sup>的危害程度分类及国际民用航空组织《危险品航空安全运输技术细则》<sup>[64]</sup>的分类包装及转运要求运输标本,如通过其他交通工具运输也应参照以上标准<sup>[65]</sup>。临床常见标本的选择见表 2。

从无菌部位采集标本,应严格执行无菌操作,避免污染。从有菌部位采集标本,应采取相应防污染措施,避免定植或污染菌对结果的干扰。标本采集后应使用无菌、无核酸污染、带盖的专用容器,采集后封口膜密封,识别码标记,及时(建议 2 h 内)送检。临床在送检时尽可能提供详细的临床信息(如患者流行病学史、感染症状体征、疑似感染灶、疑似病原体、影像学/病理学证据等)供实验室人员综合参考以便于测序数据的正确解读。标本运输过程中须防污染、防震荡,使用冷链系统转运。

## 九、报告解读

(一)mNGS 检出法定传染病及烈性传染病病原的处置

1. 传染病病原名单建议:法定传染病病原体:包括《传染病防治法》规定的各类传染病病原体。病原体种类应根据国家相关法律法规的修正进行及时调整。其他烈性传染病病原体:建议参考《人间传播的病原微生物目录》中对高致病性病原体的相关定义。

2. 复核验证流程:建议根据国家规定和验证需求将标本在有资质的实验室内进行分离培养、特异基因片段检测、特异性抗原抗体检测等方法复核。如没有剩余标本,应在做好生物安全防护的情况下

表 2 mNGS 检测的临床标本类型

感染部位	可用于 mNGS 检测的标本	不适合 mNGS 检测的标本
静脉	外周抗凝静脉血	血液凝固或输液侧采样
正常无菌部位	脑脊液、胸腔积液、腹腔积液、关节液、眼内液等无菌部位标本	标本凝固、被污染的标本
呼吸道	下呼吸道:肺泡灌洗液、支气管毛刷、支气管抽吸液、合格下呼吸道痰; 上呼吸道:鼻咽拭子	唾液、口咽分泌物、鼻咽部室内引流物
伤口	开放性伤口:清创后深部伤口、溃疡基底分泌物或组织;封闭性伤口: 彻底消毒后抽取内部脓液	表面拭子或被污染的标本
实体组织	各种严格无菌取材的组织标本	被污染的标本



进行临床重新采样,应用传染病诊断标准中规定的实验室诊断技术进行病原检测,基于病原检测结果,结合临床症状、流行病学史,依据现行传染病诊断标准进行诊断。

3. 传染病病原体处置建议:如患者被诊断为传染病的,按照《传染病防治法》等法律法规规定的流程上报疾控部门,并且对患者、标本等进行规范的处置。应按要求将剩余标本或重新采集标本送上级部门进行确认,并上报患者情况,同时做好必要的患者隔离措施和相关治疗工作。

4. 疑似新发病原体处置建议:若检出疑似新发病原体,应立即组织专家开展研判,尤其当疑似新病原体的序列与已知的烈性或者高传染性病原体序列相似,或者短时间内从 $\geq 2$ 例流行病学相关患者中检出疑似新病原体时,应立即上报有关部门。

## (二) 报告解读的逻辑

1. 病原体物种解读:检出法定传染病及烈性传染病病原,尤其是当检出甲类传染病(鼠疫、霍乱)以及部分传染性较强、危害较大的乙类传染病(如传染性非典型肺炎、脊髓灰质炎、人类高致病性禽流感、炭疽等)病原体,应立即对下机数据的质量,特别是比对到烈性传染病的特异性序列的准确性、读长数、基因组覆盖度等数据进行严格核实,确认可排除背景核酸污染以及特异性序列比对无误的前提下,同时启动标本复核程序。当从标本中检明确可致感染且能排除污染、定植微生物和背景核酸时,应报告高度怀疑该病原菌为引起感染的病原菌。患者无菌部位标本如血液和脑脊液标本中检出可疑病原菌,在无其他感染病原证据且能排除污染、定植微生物和背景核酸时,应报告为可疑致病微生物。从开放性腔道如呼吸道或可能存在皮肤定植菌污染部位的标本中检出条件致病微生物时应结合序列数、文库浓度、患者临床病史信息、感染相关指标,会同多学科专家进行讨论明确是否为责任病原体。报告中应至少包含检出的病原微生物种属名称、唯一比对的读长数、相对丰度和室内质控数据,以及对术语、技术参数和病原微生物的注释。mNGS报告中的病原体物种名称应标注标准的中英文名称,部分可参考的网站包括细菌网站 <https://lpsn.dsmz.de/>和真菌网站 <https://www.mycobank.org>等。

2. 耐药/毒力基因解读:通过耐药/毒力基因预测病原菌对抗菌药物的敏感性以及病原体的致病力,可为临床的抗感染治疗提供参考依据。但需要

注意的是,不是所有的耐药/毒力基因存在即表达,可能存在基因型和表型不一致的情况;部分导致耐药/致病的机制尚无法通过检测基因来明确;目前对于耐药/毒力基因的物种归属分析技术尚未完善。因此,应谨慎开展以耐药/毒力基因来预测病原微生物耐药性和致病力。对于实验室可开展常规药敏试验检测病原菌对抗菌药物敏感性结果的药物,不宜以耐药基因结果进行预测,应以表型法药敏试验结果为准。

## 十、LDT项目备案与管理

目前,mNGS的国内LDT模式还未形成系统性的管理规范,在具体的检测技术层面上存在标准化程度低、检测结果差异大、质量控制体系不完善等问题。2021年6月发布的《医疗器械监督管理条例》第五十三条为LDT模式的合规化开展提供了法律依据,在实操层面,国家重点支持推进LDT,2023年1月国家药监管理部门及卫生主管部门联合印发关于LDT试点工作的通知,对于自行研制使用体外诊断试剂的试点医院资质、试剂制备要求、质量管理等重点方面作出了相应的监管要求,建议符合条件开展LDT项目的医疗机构,密切关注立法及监管最新动态,按相关法规进行申报、备案和管理。

### 执笔人:

杨启文(中国医学科学院北京协和医院检验科);马筱玲(中国科学技术大学附属第一医院检验科);张建中(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所);李轶(河南省人民医院检验科);吴文娟(上海市东方医院检验科);杨继勇(解放军总医院检验科);韩东升(浙江大学医学院附属第一医院检验科);李家斌(安徽医科大第一附属医院感染科);罗燕萍(解放军总医院检验科);周华(浙江大学医学院附属第一医院呼吸科);谷丽(首都医科大学附属北京朝阳医院感染科);张西京(空军军医大学西京医院重症医学科);李敏(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科);单斌(昆明医科大学附属第一医院检验科);胡付品(复旦大学附属华山医院抗生素研究所);刘正印(中国医学科学院北京协和医院感染科);周海健(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所)

### 编委会审稿专家(按姓氏首字母顺序排列):

陈德昌(上海交通大学医学院附属瑞金医院重症医学科);冯四洲(中国医学科学院血液病医院血液科);顾兵(广东省人民医院检验科);胡继红(国家卫生健康委员会临床检验中心);刘晓琳(国家卫生健康委员会合理用药专家委员会);孙自镛(华中科技大学同济医学院检验科);施毅(南京大学医学院附属金陵医院呼吸科);王明贵(复旦大学附

属华山医院抗生素研究所);王佳伟(首都医科大学附属北京同仁医院神经内科);徐英春(中国医学科学院北京协和医院检验科);肖永红(浙江大学医学院附属第一医院感染科);俞云松(浙江省人民医院感染科);张耀华(中国药师协会);郑磊(南方医科大学南方医院检验科);郑波(北京大学第一医院感染科);卓超(广州医科大学附属第一医院感染科);周铁丽(温州医科大学附属第一医院检验科)

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] 潘柏申. 我国医学检验实验室自建检测方法发展与管理的期望 [J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39 (1): 1-3. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.01.001.
- [2] Graden KC, Bennett SA, Delaney SR, et al. A high-level overview of the regulations surrounding a clinical laboratory and upcoming regulatory challenges for laboratory developed tests [J]. Lab Med, 2021, 52(4): 315-328. DOI: 10.1093/labmed/lmaa086.
- [3] 国家卫生和计划生育委员会公告 2016 年第 6 号 [J]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会公报, 2016, (5):1.
- [4] 国家药品监督管理局. 国务院令 739 号 医疗器械监督管理条例 [EB/OL]. (2021-03-19) [2023-10-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/flxzhfg/20210319202057136.html>.
- [5] 周海健, 阚颀. 细菌性传染病实验室病原学监测预警技术发展及其应用 [J]. 中华预防医学杂志, 2022, 56(4):525-532. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20220212-00129.
- [6] Han D, Li Z, Li R, et al. MNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity [J]. Crit Rev Microbiol, 2019, 45(5-6): 668-685. DOI: 10.1080/1040841X.2019.1681933.
- [7] 易胜杰, 李鹏, 邱少富, 等. 病原体基因组流行病学研究进展 [J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(3): 237-240. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.03.020.
- [8] 姜宁, 龙秋月, 郑雅莉, 等. 社区获得性肺炎流行病学与病原学及其治疗进展 [J]. 中华预防医学杂志, 2023, 57(1): 91-99. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20220308-00214.
- [9] 田月如, 陈兴英, 王佳欣, 等. 中枢神经系统真菌感染的病原谱和实验室指标 [J]. 中华预防医学杂志, 2022, 56(3): 250-255. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20211202-01111.
- [10] 国家卫生健康委员会. 医疗机构临床基因扩增管理办法 [EB/OL]. (2010-12-10). [2023-10-18]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=49981>.
- [11] 国家卫生健康委. 人间传染的病原微生物目录 [EB/OL]. (2023-08-28) [2023-10-18]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202308/b6b51d792d394fba175e4c8094dc87e.shtml>
- [12] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(6): 341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
- [13] Marotz CA, Sanders JG, Zuniga C, et al. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion [J]. Microbiome, 2018, 6(1): 42. DOI: 10.1186/s40168-018-0426-3.
- [14] Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(4): 663-674. DOI: 10.1038/s41564-018-0349-6.
- [15] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2): 255-273. DOI: 10.1128/CMR.00082-12.
- [16] Schlaberg R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection [J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6):776-786. DOI: 10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [17] 中华医学会检验医学分会. 宏基因组测序病原微生物检测生物信息学分析规范化管理专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(9): 799-807. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20210322-00178.
- [18] 国务院. 国务院令 717 号 中华人民共和国人类遗传资源管理条例 [EB/OL]. (2019-05-28) [2023-10-18]. [https://www.gov.cn/gongbao/content/2019/content\\_5404150.htm](https://www.gov.cn/gongbao/content/2019/content_5404150.htm).
- [19] Trivedi UH, Cézard T, Bridgett S, et al. Quality control of next-generation sequencing data without a reference [J]. Front Genet, 2014, 5: 111. DOI: 10.3389/fgene.2014.00111.
- [20] Ewels P, Magnusson M, Lundin S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report [J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2016, 32(19):3047-3048.
- [21] McIntyre A, Ounit R, Afshinnekoo E, et al. Comprehensive benchmarking and ensemble approaches for metagenomic classifiers [J]. Genome Biol, 2017, 18(1): 182. DOI: 10.1186/s13059-017-1299-7.
- [22] Ye SH, Siddle KJ, Park DJ, et al. Benchmarking metagenomics tools for taxonomic classification [J]. Cell, 2019, 178(4):779-794. DOI: 10.1016/j.cell.2019.07.010.
- [23] Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with kaiju [J]. Nat Commun, 2016, 7:11257. DOI: 10.1038/ncomms11257.
- [24] Sun Z, Huang S, Zhang M, et al. Challenges in benchmarking metagenomic profilers [J]. Nat Methods, 2021, 18(6): 618-626. DOI: 10.1038/s41592-021-01141-3.
- [25] van Boheemen S, van Rijn AL, Pappas N, et al. Retrospective validation of a metagenomic sequencing protocol for combined detection of RNA and DNA viruses using respiratory samples from pediatric patients [J]. J Mol Diagn, 2020, 22(2): 196-207. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.10.007.
- [26] Han D, Gao P, Li R, et al. Multicenter assessment of microbial community profiling using 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomic sequencing [J]. J Adv Res, 2020, 26: 111-121. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.010.
- [27] Breitwieser FP, Pertea M, Zimin AV, et al. Human contamination in bacterial genomes has created thousands of spurious proteins [J]. Genome Res, 2019, 29(6):954-960. DOI: 10.1101/gr.245373.118.
- [28] de Vries J, Brown JR, Couto N, et al. Recommendations for the introduction of metagenomic next-generation sequencing in clinical virology, part ii: bioinformatic analysis and reporting [J]. J Clin Virol, 2021, 138:104812. DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104812.
- [29] 韩东升, 马筱玲, 吴文娟. 病原体宏基因组高通量测序医院实验室本地化之路: 现状和挑战 [J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(2): 100-104. DOI: 10.3760/cma.j.

- cn114452-20211009-00619.
- [30] Pereira MB, Wallroth M, Jonsson V, et al. Comparison of normalization methods for the analysis of metagenomic gene abundance data [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 274. DOI: 10.1186/s12864-018-4637-6.
- [31] Grüning B, Dale R, Sjödin A, et al. Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(7): 475-476. DOI: 10.1038/s41592-018-0046-7.
- [32] Yan Q, Wi YM, Thoendel MJ, et al. Evaluation of the cosmosID bioinformatics platform for prosthetic joint-associated sonicate fluid shotgun metagenomic data analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(2): e01182-01118. DOI: 10.1128/JCM.01182-18.
- [33] Brinkmann A, Andrusch A, Belka A, et al. Proficiency testing of virus diagnostics based on bioinformatics analysis of simulated in silico high-throughput sequencing data sets [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(8): e00466-00419. DOI: 10.1128/JCM.00466-19.
- [34] Junier T, Huber M, Schmutz S, et al. Viral metagenomics in the clinical realm: lessons learned from a Swiss-wide ring trial[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(9): 655. DOI: 10.3390/genes10090655.
- [35] 张栋, 张京家, 杜娟, 等. 病原宏基因组高通量测序性能确认方案 [J]. *中华检验医学杂志*, 2022, 45(9): 899-905. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20220721-00426.
- [36] Miller S, Naccache SN, Samayoa E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid [J]. *Genome Res*, 2019, 29(5): 831-842. DOI: 10.1101/gr.238170.118.
- [37] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南 [EB/OL]. (2019-04-04) [2023-10-18]. <https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/2019/04/896311.shtml>.
- [38] 国家卫生健康委员会. 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性能验证 [EB/OL]. (2022-11-02) [2023-10-18]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/s9492/202211/06f11efd690041af9cbb0a89924bbae9.shtml>.
- [39] 北京市临床检验中心, 北京医学会检验医学分会, 首都医科大学临床检验诊断学系, 等. 高通量测序技术临床检测规范化应用北京专家共识(第一版通用部分)[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(43): 3393-3397. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.43.008.
- [40] Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(5): 743-755. DOI: 10.5858/133.5.743.
- [41] Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(3): 550-576. DOI: 10.1128/CMR.00074-09.
- [42] 中国医师协会检验医师分会分子诊断专家委员会. 实验室自建分子诊断项目基本要求专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(12): 897-900. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.12.007.
- [43] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(2): 107-120. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794.
- [44] 刘东来, 张春涛, 王佑春, 等. 病原宏基因组高通量测序技术质量控制与评价的挑战和思考 [J]. *生物工程学报*, 2020, 36(12): 2598-2609. DOI: 10.13345/j.cjb.200377.
- [45] Singer E, Andreopoulos B, Bowers RM, et al. Next generation sequencing data of a defined microbial mock community [J]. *Sci Data*, 2016, 3: 160081. DOI: 10.1038/sdata.2016.81.
- [46] Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(24): 2327-2340. DOI: 10.1056/NEJMoa1803396.
- [47] 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.
- [48] A T S I. *Clinical Microbiology Procedures Handbook 4th Edition* [M]. Washington, D. C.: Amer Society for Microbiology, 2022.
- [49] Santani A, Simen BB, Briggs M, et al. Designing and implementing NGS tests for inherited disorders: a practical framework with step-by-step guidance for clinical laboratories [J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(3): 369-374. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.11.004.
- [50] 宏基因组测序技术在中重症感染中的临床应用共识专家组, 中国研究型医院学会脓毒症与休克专业委员会, 中国微生物学会微生物毒素专业委员会, 等. 宏基因组测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版)[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(5): 531-536. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200228-00095.
- [51] Wang Q, Miao Q, Pan J, et al. The clinical value of metagenomic next-generation sequencing in the microbiological diagnosis of skin and soft tissue infections [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 100: 414-420. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.09.007.
- [52] Xie Y, Du J, Jin W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia: China, 2010—2018[J]. *J Infect*, 2019, 78 (2): 158-169. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.09.004.
- [53] Huang Z, Li W, Lee GC, et al. Metagenomic next-generation sequencing of synovial fluid demonstrates high accuracy in prosthetic joint infection diagnostics: mNGS for diagnosing PJI [J]. *Bone Joint Res*, 2020, 9(7): 440-449. DOI: 10.1302/2046-3758.97.BJR-2019-0325.R2.
- [54] Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, et al. Enhanced performance of next-generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(5): e394-e402. DOI: 10.1097/CCM.0000000000003658.
- [55] Huang Y, Ma Y, Miao Q, et al. Arthritis caused by legionella micdadei and staphylococcus aureus: metagenomic next-generation sequencing provides a rapid and accurate access to diagnosis and surveillance [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(20): 589. DOI: 10.21037/atm.2019.09.81.
- [56] Wilson MR, O'Donovan BD, Gelfand JM, et al. Chronic meningitis investigated via metagenomic next-generation sequencing [J]. *JAMA Neurol*, 2018, 75(8): 947-955. DOI: 10.1001/jamaneurol.2018.0463.
- [57] Ai JW, Li Y, Cheng Q, et al. Diagnosis of local hepatic tuberculosis through next-generation sequencing: smarter, faster and better [J]. *Clin Res Hepatol*



- Gastroenterol, 2018, 42(3): 178-181. DOI: 10.1016/j.clinre.2018.04.007.
- [58] Wang S, Ai J, Cui P, et al. Diagnostic value and clinical application of next-generation sequencing for infections in immunosuppressed patients with corticosteroid therapy [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(5): 227. DOI: 10.21037/atm.2020.01.30.
- [59] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(2): 151-155. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.02.005.
- [60] 中国医师协会器官移植医师分会, 中华医学会器官移植学分会. 中国实体器官移植手术部位感染管理专家共识(2022版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2022, 15(3): 164-175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2022.03.002.
- [61] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4): 255-280. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2018.04.006.
- [62] “病原微生物监测、检测、溯源与疫苗研发关键前沿问题学术交流会”专家组.“病原微生物监测、检测、溯源与疫苗研发关键前沿问题学术交流会”专家共识 [J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(1): 42-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2020.01.010
- [63] 卫生部. 人间传播的病原微生物名录 [EB/OL]. (2006-01-27) [2023-10-18]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s7914/200804/de764f35fd1b4fd4b4bfbac0e1f8333.shtml>.
- [64] 国际民用航空组织. 危险品航空安全运输技术细则 [EB/OL]. (2013) [2023-10-18] [https://www.icao.int/publications/Documents/9284\\_2013\\_2014\\_add\\_02\\_corr\\_01\\_en.pdf](https://www.icao.int/publications/Documents/9284_2013_2014_add_02_corr_01_en.pdf).
- [65] 国家卫生健康委员会. 临床微生物学检验样本的采集和转运 [EB/OL]. (2018-12-11)[2023-10-18]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/s9492/201812/f1c15b1b58bc45729f8f9afc164b7805.shtml>.

