

· 指南与共识 ·

靶向二代测序在感染性疾病诊疗中的规范化应用专家共识 2025

中国医学装备协会检验医学分会

通信作者:徐英春,中国医学科学院北京协和医院临床检验诊断系,北京 100730, Email: xycpumch@139.com;顾兵,南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科,广州 510080, Email: gubing@gdph.org.cn

【摘要】 感染性疾病的诊疗关键是早期、快速、准确发现病原微生物。靶向二代测序(tNGS)由于其技术优势和高检测性能,而越发受到临床的广泛关注和应用。然而,tNGS的临床规范化应用还尚未统一,导致应用场景、样本采集、实验室检测、临床解读、质量控制等方面参差不齐,限制了tNGS的合理应用。因此,中国医学装备协会检验医学分会组织专家制定该共识,以规范tNGS临床应用,发挥tNGS技术优势,为感染性疾病诊疗提供保障。

【关键词】 靶向二代测序; 感染; 病原体; 诊断

基金项目:国家自然科学基金(82302571);广东省基础与应用基础研究基金(2024A1515011037)

Expert consensus on the standardized application of targeted next-generation sequencing in the infectious diseases

The Laboratory Medicine Society, China Association of Medical Equipment

Corresponding author: Xu Yingchun, Email: xycpumch@139.com; Gu Bing, Email: gubing@gdph.org.cn

【Abstract】 The key to diagnosis and treatment of infectious diseases is to find pathogenic microorganisms early, quickly and accurately. Targeted next-generation sequencing (tNGS) has received increasing attention and application clinically due to its technological advantages and high detection performance. However, the standardized clinical application of tNGS has not yet been unified, resulting in uneven application scenarios, sample collection, laboratory testing, clinical interpretation, quality control, et al, which limits the reasonable application of tNGS. Therefore, The Laboratory Medicine Society, China Association of Medical Equipment organized experts to formulate the consensus to standardize the clinical application of tNGS, and to give play to the technical advantages of tNGS, and to provide guarantee for the diagnosis and treatment of infectious diseases.

【Key words】 Targeted next-generation sequencing; Infection; Pathogen; Diagnosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82302571); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2024A1515011037)

感染性疾病是临床诊疗的痛点,尤其在急、危、重、特等感染人群中,快速精准的诊断是临床靶向治疗的可靠依据。目前,新发感染性疾病总体呈上升趋势,病原体也呈现多元化和复杂化。因此,早

期、快速、准确诊断病原微生物种类,对临床合理使用抗菌微生物药物及改善患者预后具有重大意义^[1]。

宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS),通过对样本

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240817-00462

收稿日期 2024-08-17 本文编辑 武昱

引用本文:中国医学装备协会检验医学分会. 靶向二代测序在感染性疾病诊疗中的规范化应用专家共识 2025[J]. 中华检验医学杂志, 2025, 48(4): 469-477. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240817-00462.



中华医学装备杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



DNA 和/或 RNA 进行高通量测序,无偏倚地检测几千甚至上万种微生物(包括细菌、真菌、病毒、寄生虫等),但 mNGS 检测灵敏度极易受人源背景的干扰^[2],如何提高潜在病原体有效数据比例成为确保检测灵敏度的关键。靶向二代测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)通过前置捕获和富集特定病原体的核酸,再进行高通量测序和生物信息学分析,可有效提高病原体的数据量和占比,提高检测灵敏度^[3]。tNGS 可同时靶向检测上百种病原体,相较于传统病原学检测方法具有更广的检测范围和更灵敏的检出率,相较于 mNGS 能降低测序量,降低检测成本,减轻医疗负担。

tNGS 可分为基于液相探针杂交捕获建库的靶向测序和基于超多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增建库的靶向测序^[3-5]。此外,在测序平台的选择上,也可以使用基于单分子纳米孔测序技术路线的靶向测序进行病原体的鉴定^[6]。目前,mNGS 在病原诊断领域得到广泛应用,已有多篇专家共识^[7-11],但 tNGS 在感染性疾病诊疗方面尚无明确的共识。为进一步规范 tNGS 在感染性疾病诊疗中的应用,中国医学装备协会检验医学分会自 2023 年 4 月组织专家共同编写本共识,经多次开会研讨,形成 29 条专家共识,以期促进 tNGS 技术的规范应用及发展推广。

本共识拟实施的主要目标人群为危急重症感染的患者,使用者主要包括临床、检验、微生物、感染及公共卫生部门人员等,应用环境聚焦于传统检测受限、病情复杂或需精准治疗的感染场景。共识

制定工作组由来自国内外 41 家机构 54 位专家组成,包括执笔人、指导专家和讨论专家。共识由指导专家提出中心思想和主要框架,执笔人开展临床调研和文献检索,以 targeted next-generation sequencing、metagenomic next-generation sequencing、infection、pathogen、diagnosis 为关键词,在 Pubmed、Springer Protocols、Web of Science、中国知网、万方数据和维普资讯检测至 2024 年 8 月的中英文文献,去重并精读后纳入 30 篇文献,结合临床经验并整理信息,撰写了共识的主要内容。之后经多次研讨会和初稿会收集讨论专家的问题和修改意见,凝练形成多条专家共识;采取函审形式由所有的专家审阅,整合反馈意见完成修改;通过专题会和定稿会,90% 以上专家同意的共识描述纳入终稿,完成靶向二代测序在感染性疾病诊疗中的规范化应用专家共识。该共识主要规范了 tNGS 和 mNGS 的区别、tNGS 应用场景和优势、样本采集规范、实验室检测、临床解读、质量控制,助力感染性疾病的诊疗和监测。

一、tNGS 和 mNGS 的比较

tNGS 和 mNGS 都是以高通量测序和生物信息学分析为基础,辅助诊断病原微生物的技术手段,但二者在检测范围、检测成本、检测性能等方面存在差异(表 1)。

共识 1 相对于 mNGS, tNGS 具有靶向性、测序数据量要求低、生信分析难度低、检测范围窄、检测成本低、灵敏度高、检测周期短的特点。

表 1 tNGS 和 mNGS 的参数比较

方法学	mNGS	tNGS
检测原理	样本核酸提取后,进行文库构建和高通量测序,分析和鉴定样本中的微生物种类及其相对丰度,并筛选与感染相关的病原体 ^[12]	多重 PCR 路线:样本核酸提取后,采用多重/超多重 PCR 对临床关注的病原体进行靶向扩增、文库构建和高通量测序,分析和鉴定检测范围内的病原体 ^[15] 探针捕获路线:样本核酸提取后,构建宏基因组文库,并采用探针捕获技术针对性地捕获和富集文库中的靶标病原体,进行高通测序和病原体的鉴定
靶向性	非靶向	靶向
测序数据量	较高,一般 20 000 000(20M)序列或以上 ^[12-13]	较低,一般 100 000(0.1M)序列~3 000 000(3M)序列 ^[3-4]
生信分析难度	较高 ^[12]	相对较低 ^[15]
检测范围	覆盖病原体可大于 10 000 种 ^[12, 14] 可检测罕见和新发病原体	一般检测数十种至数百种病原体(多重/超多重 PCR 技术路线);或数十种至上千种病原体(探针捕获技术路线) ^[23] ;无法检测罕见或新发病原体
检测成本	较高	较低(多重/超多重 PCR 技术路线)或中等(探针捕获技术路线)
检测性能	宿主背景较高时,检测灵敏度下降; 耐药基因来源广、灵敏度较低,不适用于耐药基因分析 ^[12-14]	不受宿主基因组占比的影响(多重/超多重 PCR 技术路线),或受宿主基因组占比的影响比宏基因组测序低(探针捕获技术路线) ^[23] ;耐药基因来源较明确、灵敏度较高,可用于耐药基因分析 ^[3]
检测周期	约为 24~38 h ^[3, 16-17]	约为 14~26 h ^[16, 18]

注:tNGS 为靶向二代测序,mNGS 为宏基因组二代测序,PCR 为聚合酶链反应



二、tNGS 的应用场景和优势

90% 以上 mNGS 阳性检出病原微生物种类不超过 200 种,而 tNGS 的检测范围主要针对常见、致病相对明确的 100~300 种病原微生物,可满足大部分感染性疾病诊疗需求。相较传统病原学检测(如涂片、培养、免疫学、PCR 等),tNGS 具有更广泛的检测范围和更高的检出率;相对于 mNGS, tNGS 成本较低,按需开展的同时可结合传统病原学检测,以获取更合理的诊断依据^[19]。对于危重症感染患者,传统病原学检测结果均阴性时, tNGS 检测则显得非常重要。

1. 血流感染:血流感染主要以全身性感染为主,病原体可随血液扩散,造成脏器功能损伤和病变,病情相对危重。与传统病原学检测相比, tNGS 的检测灵敏度和准确性更高。但需注意的是 tNGS 检测的特异性低于传统病原学检测,对阳性结果的解读需紧密结合临床,以排除采样和检测过程中微生物的干扰。

共识 2 疑似血流感染,建议抗菌药物使用前、抗菌药物疗效差、停用抗菌药物 24 h 后或下次用药前同步送检 tNGS 和血培养。

2. 呼吸系统感染:呼吸系统感染的病原体更为复杂,病毒感染、变异和播散范围广,且容易引起细菌和真菌的继发感染,培养等病原学检测病毒和特殊病原体感染的局限性较大^[20]。

共识 3 疑似呼吸系统感染,常规用药效果不佳,3 d 内病原学检测阴性或重症感染时,推荐送检 tNGS。

共识 4 疑似 tNGS 检测范围内特殊病原体感染(如螺旋体、军团菌、支原体、衣原体、分枝杆菌等)且病情进展快或病程长的患者,免疫抑制、合并基础疾病、反复呼吸系统感染等病情危重者,有临床症状、影像表现或者血清学表现但规范抗感染治疗无效者,推荐送检 tNGS。

共识 5 疑似罕见或新发病原感染,不在 tNGS 检测范围内,推荐 mNGS 检测。无法获得优质样本时,不建议送检 mNGS 或 tNGS。

3. 泌尿系统感染:泌尿系统感染是病原体直接侵入尿路,并侵犯尿路黏膜或组织而引起损伤。尿常规、尿沉渣镜检、尿涂片、尿生化等检查结果提示泌尿系统感染,尿培养是首选方法。对于支原体、衣原体、淋病奈瑟菌、结核分枝杆菌、非结核分枝杆菌、丝状真菌等培养困难或培养时间长的特殊病原体,尿培养通常为阴性,如有相关病史、高危暴露因素

或既往阳性等,需优先考虑常规 PCR 或多重 PCR。

共识 6 疑似泌尿系统感染,推荐优先采用尿培养明确感染的病原体,当尿培养阴性或无法明确病原体时,如果有特殊病原体感染史或暴露因素等,推荐采用靶向 PCR;若无病原体怀疑方向时,推荐送检尿 tNGS。

4. 中枢神经系统感染:中枢神经系统感染常病情危急,表现为发热、乏力、头痛、抽搐、呕吐、脑膜刺激征、意识障碍等症状,需首先完善脑脊液常规和病原学检测。

共识 7 疑似中枢神经系统感染,若 3 d 内未明确感染病原体且抗感染经验性治疗无效,推荐送检脑脊液 tNGS。

共识 8 疑似 tNGS 检测范围内特殊病原体(隐球菌、脑膜炎双球菌、结核分枝杆菌等)且病势迅疾或迁延感染患者,建议送检 tNGS。

5. 局灶性感染:局灶性感染指除血流、呼吸系统、泌尿系统、中枢神经系统感染外,以局部组织出现感染性症状如红、肿、热、痛、扪及波动感、有脓液渗出为表现的一类疾病。如眼部感染伴随分泌物增多、疼痛、流泪、视物障碍等;骨关节感染伴皮温升高、肿痛、功能障碍等;皮肤软组织感染形成破溃、脓肿等。严重情况下可能出现非特异性表现或全身感染中毒症状。相对于传统培养, tNGS 在局灶性感染的病原学检测敏感性更高^[16]。

共识 9 疑似局灶性感染,3 d 内常规病原学检测阴性,经验性用药治疗效果不佳,或疑似检测范围内特殊病原体且病势迅疾或迁延者,推荐送检 tNGS。

6. 其他感染:以上未提及的样本来源,需完善相应的常规感染指标、微生物培养、PCR 等再行考虑高通量测序。

共识 10 疑似其他感染,无法明确感染源,或病情持续进展及抗感染治疗无效,推荐送检 tNGS。对于复杂感染、多重感染需判断主要病原体,以及明确急、危、重症患者感染源时,建议首选 mNGS。

三、样本采集规范

tNGS 检测样本应根据患者情况,选择与病灶最为相关的部位进行采样送检。若样本采集困难且无法获得优质样本,病情不能耐受有创操作,或暂无明确感染部位的患者,可选择患者血液样本送检,但其检测准确性和阳性率可能低于病灶部位样本。所有样本采集应严格执行无菌操作,同时尽量在抗微生物药物首次或下一次使用前采集标本,及



时送检。此外,无菌操作仍有可能引入其他非目标微生物的核酸,尤其是采样部位的定植微生物。为保障检测质量,需根据感染类型规范送检^[21-22]。

共识 11 根据不同感染类型,推荐不同样本类型和采集容器,并按不同的采集时机、采集要点、样本量要求、保存和运输条件规范送检,样本采集规范参考宏基因组检测或常规微生物采集要求。

四、实验室检测

1. 标本前处理:不同样本类型的前处理操作不同。对于咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、尿液、组织等样本,前处理主要涉及分装、破壁、离心、研磨、液化及消化等步骤。大多数细菌和所有的真菌都有细胞壁,需要破壁释放内部核酸,目前常用的破壁方式有机械研磨、化学酶处理和超声波破碎等。其中对于组织样本,需要研磨、切碎、胰酶消化;对于黏性较高的痰液等样本,需要进行液化处理,同时需注意在提取前样本已完全消化或液化,避免取样异质质对检测的影响。

对于血液样本,需考虑血液样本不同成分对不同技术路线检测灵敏度的影响。研究表明,基于探针捕获技术路线的血浆样本检测,其灵敏度高于血细胞或全血;对于超多重 PCR 建库路线,血细胞或全血的检测灵敏度高于血浆。因此应基于所选择的技术路线进行血液样本的离心分离和成分选择。

区别于 mNGS, tNGS 为正向捕获技术,人源基因组对检测的影响较小,一般无需对黏稠样本、组织样本等高宿主背景的样本进行人源细胞裂解及核酸消化等去宿主处理。

共识 12 tNGS 样本提取前需进行合适的前处理(如黏稠样本的完全消化或液化,以及血液样本的血浆分离等),一般无需去宿主核酸。

2. 核酸提取:首先要验证所选的核酸提取试剂盒,确保核酸提取的质量及效率。每次提取的核酸样本均需记录浓度、纯度和完整性,确保核酸质量符合建库要求。提取过程中应严格遵循无菌流程,每个实验批次中都应设有内参、阴性质控品和阳性质控品,以评估每批次核酸质量的可信度及实验室环境潜在的背景干扰。

由于核酸提取效率对检测结果准确性的影响较大,对于核酸提取浓度较低的样本, tNGS 检测灵敏度可能会下降,建议通过分析样本核酸提取浓度对检测灵敏度的影响,建立核酸提取的阈值,对于核酸提取浓度异常的样本,优先重新提取或重采样检测。

此外,对于样本性状较为澄清的肺泡灌洗液、胸腔/腹腔积液等,可通过离心富集进行核酸提取的方式,提高对结核分枝杆菌、隐球菌等核酸提取效率较低病原体的检测性能。

共识 13 提取样本核酸的质量控制是保障 tNGS 结果准确的前提。

3. 文库构建:由于检测病原体类型、物种报告范围、技术路线(超多重 PCR 或探针捕获)等存在较大差异,因此存在多种建库路线。临床通常多为病原体 DNA 和 RNA 共同检测,一般有 3 种不同的建库路线:(1)对提取的总核酸直接逆转录处理后进行建库;(2)分别提取基因组 DNA 和 RNA, RNA 逆转录后,再等比混合基因组 DNA 和互补 DNA 进行文库构建;(3)分别对 DNA 和 RNA 单独建库,即一个样本构建两个文库。如仅需检测病原体 DNA 或仅需检测 RNA,适用于第 3 种建库路线,单独建库。

共识 14 文库构建是 tNGS 的核心内容,直接影响检测灵敏度和特异性,需根据检测目的选择合适的建库路线,并做好质量控制。

文库构建的核心是超多重 PCR 扩增引物或捕获探针,其目的是扩增或捕获目标病原体及耐药基因等。目标病原体的范围需根据不同感染类型的流行病学特点确定,可纳入大样本量培养等传统方法学阳性的物种,以及不同地域的病原谱研究相关的物种,并在大样本量 mNGS 数据(如 10 000 例以上)中进行验证,以确定检测范围可反映临床病原体感染的比例,病原体应满足以下筛选规则:(1)需要有人类感染报道或在特定部位有感染报道;(2)基因组清晰,至少有 1 个完整的基因组;(3)覆盖临床感染的比例 $\geq 95\%$ 。对于耐药基因的检测范围,建议纳入常见的、与表型相关性比较高,以及对临床用药有较高指导意义的基因。

探针捕获和超多重 PCR 建库 2 种技术路线在引物设计或捕获探针设计的原则具有相同的原则,也存在一定差异。2 种路线均基于关注的分类水平(如种、属和复合群等)上筛选核心基因组区域,在核心基因组区域上筛选关注分类的特异区域(即捕获/扩增区域)。同时,对于探针捕获技术,也会考虑在细菌、真菌的核糖体 16S、18S 和转录间隔区等区域选择高变区附近的序列进行设计,通过捕获高变区进行物种鉴定。而对于超多重 PCR 建库技术,由于所筛选的区域更多考虑分类水平的保守性和特异性,因此主要考虑针对核心基因组进行引物设计,以提高在关注的种、属或复合群等分类水平



上鉴定的准确性和特异性。为确保检测结果的特异性,降低非特异性捕获或扩增的影响,建议针对每个物种设计多个捕获区域或多个扩增区域。

共识 15 捕获探针或超多重 PCR 引物,建议至少设计 3 对或以上;对于致病性或常见感染的病原体,建议设计 5 对或以上。

质控方面,选择高质量且稳定的建库试剂盒,并做好质控记录;同时严格遵守防污染流程,批次实验前后进行消杀,并定期进行实验室环境监控,降低气溶胶污染风险。此外,同一批检测需加入至少 1 个阴控样本进行环境背景监控,同时,建议在文库试剂盒可加入外源内标序列,和/或捕获/扩增内参序列的方式进行捕获或扩增效率的监测。

4. 上机测序:tNGS 主要为边合成边测序,测序平台和检测试剂直接影响检测性能,测序需采用模拟样本或临床已知病原样本验证全流程。相较于 mNGS, tNGS 的病原体序列的占比显著提高,其中基于超多重 PCR 的 tNGS 病原体占比往往在 50% 甚至 90% 以上,而基于探针捕获的 tNGS 其病原体序列占比相对 mNGS 也能提高约 10 倍,因此在同等灵敏度的情况下可极大降低 tNGS 数据量要求^[23]。测序数据量由 tNGS 扩增体系的质量、文库碱基平衡情况及检测预期性能等实际情况决定。此外,主流 tNGS 测序读长包括 SE50(单端 50 bp 测序)、SE75、SE100 等。由于读长越短,物种鉴定的准确性越低,对于基因组同源性较高的物种可能存在鉴定错误的可能,因此建议如采用 <50 bp 读长的测序策略,需充分验证对物种鉴定准确性的影响。

共识 16 基于探针捕获的 tNGS 建议数据量在 1 000 000 (1M) 序列以上,基于超多重 PCR 的 tNGS 最低数据量建议在 100 000 (0.1M) 序列以上。

5. 生信分析:生物信息学分析是对测序原始数据进行分析处理的过程,包括原始数据质控、比对目标参考序列、目标微生物序列质控及归一化计数。搭建实验室分析流程时,需对分析流程进行性能验证,使用质控品或已知阴阳性样本进行模拟测试,以保证分析流程的准确性和可重复性。此外,生信分析输出应尽可能全面,必须含数据质控和物种注释信息,以满足临床报告判断。

需要注意的是,由于 tNGS 是针对目标物种进行靶向检测的技术,检测范围一般不包括检测范围外的其他微生物,因此 tNGS 一般不对检出的物种在不同病原体类型中的相对丰度进行分析和报告;如相对丰度进行分析和报告,需注意该分析所得

的丰度信息不能完全反映该物种在所有微生物中的占比情况。

共识 17 tNGS 数据比对范围应包括检测范围内所有病原体和人源基因组,原始数据应去除低质量数据(质量值 <20)、短序列数据[(N 碱基比例过高的序列(N 碱基 >5%)]、低质量和接头序列(<36 bp)、舍弃去 adapter 及质量修剪后长度小于 30 bp 的序列和低平均质量值序列(平均质量值 <30)^[24]。

共识 18 生信分析输出,数据质控应包括:数据量(总序列数)、测序质量(Q30 比例)、内参序列数;物种注释应包括:种/属水平的中文名和拉丁名、原始序列数、归一化序列数、覆盖度(探针捕获法)或扩增子数(超多重 PCR 法)、阴控数据及各物种批次检出情况。

6. 结果报告:目前尚无统一的、公认的阳性判读标准^[3, 25-26],实验室可根据方法学建立时确认的阳性阈值确定原则,确立不同病原体阳性检出的阈值,并持续调整和优化。不同检测体系中微生物类型的检出可能存在差异,需分别建立阳性阈值,如可根据革兰阳性菌、革兰阴性菌、丝状真菌、酵母菌、DNA 病毒、RNA 病毒、寄生虫及特殊病原体分别确定阳性阈值。检测结果需首先排除背景微生物的影响,若出现大量杂而无明显优势的微生物时,应先考虑为污染。

共识 19 检测值低于阳性阈值,不报告;检测值达到或高于阳性阈值,排除实验干扰后报告阳性;无法排除实验干扰应复测或重新采样送检,必要时进行第二种方法学的验证(实时荧光定量 PCR 等);无法重新采样或无剩余样本,高致病性病原体需结合临床表现后谨慎考虑是否报告,其他病原体可作为疑似背景(灰区)进行报告,以提供更多信息供临床参考;检出病原体同时存在关联的耐药基因,建议同时报告耐药基因信息。

tNGS 检出一定序列数的特定病原体(如共识 4、共识 8~10),但低于阈值且属于背景水平,则无法与背景信号进行区分。灰区信号的样本,需结合临床信息进行解读,对于临床明确怀疑某特定的病原体感染时,建议在灰区检出后进行其他方法学验证或复检后报告。

对于 tNGS 来说,由于文库构建的过程均涉及到通过 PCR 等进行靶标富集,同时,基于靶向捕获的 tNGS 检测,其文库构建也相对于 mNGS 更为复杂,因此 tNGS 检测受检测环境中微生物污染以及

实验室气溶胶污染的概率相对更高。因此在低序列数检出的情况下,难以排除来源于实验室污染或样本之间相互干扰的可能性。对于临床重点关注的致病性病原体(如结核分枝杆菌等),在一定的检测灰区建议采用其他方法学进行确认。

共识 20 不同病原体在不同部位中检出的临床意义不同,建议根据微生物本身的致病性和样本来源,分为致病性微生物、条件致病性微生物及定植或微生态微生物进行分级报告。

五、临床解读

正式报告中,致病、条件致病和定植/微生态微生物是基于特定样本类型中病原体的致病性进行分级,具体是否为病原体,需综合临床情况进行判断。tNGS 检出多种条件致病微生物,而传统微生物检测报告一种或多种提示某病原体时,其他条件致病微生物可考虑为定植或微生态微生物^[27]。

共识 21 致病性微生物,建议考虑为病原体。条件致病微生物,建议结合免疫状态、宿主因素、理化指标、影像特征、用药史、治疗效果、传统微生物检测结果等,综合判断是否为病原体。

共识 22 定植或微生态微生物,一般不考虑为病原体;如为免疫抑制或与其他微生物检测结果一致或与临床诊断相符,建议作为病原体依据之一。

mNGS 报告的耐药基因来源广,灵敏度较低,一般无法定位到相应病原体。而 tNGS 是针对耐药基因片段设计引物或探针,靶向性强,耐药基因来源较明确,灵敏度高于 mNGS,可用于耐药基因分析。致病菌耐药表型不仅受耐药基因的携带情况,也受耐药基因的表达和其他耐药因素影响,因此临床解读耐药基因也需考虑耐药基因与耐药表型的一致性^[8, 10]。

共识 23 耐药基因,建议主要关注临床常见导致耐药的调控基因。革兰阴性杆菌或肠杆菌科,建议关注头孢菌素耐药相关的 *bla*CTX-M、*bla*SHV、*bla*TEM 等基因;碳青霉烯类耐药相关的 *bla*NDM、*bla*KPC、*bla*IMP、*bla*VIM、*bla*OXA-23、*bla*OXA-48、*bla*OXA-51 等基因;甲氧西林耐药相关的 *mecA* 等基因,万古霉素耐药相关的 *vanA*、*vanB*、*vanC* 等基因;大环内酯类耐药相关的核糖体 23S rRNA 基因突变;结核分枝杆菌一二线用药相关的基因突变及非结核分枝杆菌耐药相关的 *erm*、*rrl* 等基因。

tNGS 检出致病或条件致病微生物与临床怀疑方向不一致时,应根据 tNGS 检测结果重新进行临

床评估。经过完善检测后仍不考虑的,条件致病微生物考虑定植,而致病微生物需实验室排除污染可能后再行评估。怀疑特定病原体而 tNGS 检测阴性时,需排除假阴性可能或灰区,可进行第二种方法学验证。

六、质量控制

1. 人员要求:检测全流程由不同职能的人员组成^[28],负责样本核酸提取、文库构建、上机测序操作的“湿实验”操作人员应具备分子生物学检验专业技能;负责生物信息分析流程开发和维护(即“干实验”操作)的人员,应具备生物信息学研发和管理相关技能;报告解读团队,应具备临床感染病学、临床微生物检验学和/或分子生物学等专业背景,负责结果解读、审核和报告咨询,尤其是针对疑难病例^[29]。某些特定领域需获得国家要求的相应资质,如“湿实验”操作人员在上岗前应根据《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》的规定获得相应的资质。

共识 24 实验室人员应根据岗位职责参加不同的培训,包括政策法规、质量管理体系、标准操作规程、性能确认、生物安全、仪器设备的使用和维护、室内质量控制、室间质量评价及其他专业知识,并留存培训记录。

共识 25 检测全流程的管理,应制定相应的质量体系文件,及仪器、项目等标准操作流程(standard operating procedure, SOP),形成质量手册,放于固定位置以备随时查阅,指导检测全流程质量控制。

2. 检验前中后的质量控制:采样前应填写知情同意书,采样后填写样本送检申请单,应确保申请单包含必要的信息(如患者姓名、性别等基本信息,样本类型、采样部位、采样时间等样本信息,以及诊断方向、感染指标及其他实验室检查结果、抗微生物药物种类及用药时长等临床信息)。应明确样本接收标准和拒收标准,可同时设置让步检测的样本标准。若让步检测,需及时与临床沟通,确认后再进行让步检测。

共识 26 检验前质量控制,建议包含知情同意书、送检申请单、接收标准、拒收标准、让步检验标准。

共识 27 检验中质量控制,建议遵循基因扩增实验室标准要求,合理规划分区并制定详尽的全流程检测 SOP 及异常情况处理程序。

全流程检测 SOP 应包括实验检测(样本前处



理、核酸提取、文库构建、上机测序)、生物信息学分析,当质量控制指标发生异常时,应按异常情况处理程序进行分类处理,如重新采样、重新检测、让步检测、结果验证后发放报告等。

共识 28 检验后质量控制,建议建立结果报告流程,剩余样本保存规定及实验室环境管理规定。

tNGS 的结果报告需建立适当的流程,包括解读者和审核者双人复核机制;对于特殊样本或罕见病原体检出,需进行实验、生信、临床解读等多学科讨论;对于高致病性病原微生物,应按照国家法定流程进行结果上报,并及时对生物样本进行无害化处理。剩余样本的保存可确保检测结果异常或其他需要进行结果复核时,可重新进行核酸提取和 tNGS 检测。剩余样本应统一分装至标准保存容器,进行低温冷冻保存,建议保存期限>2 周,并在保存期满后,无论检出情况如何均需按感染性医疗废物统一处理。实验室应定期进行环境检测、评估与消杀,每次实验前后都需要对实验室进行清洁消杀,对环境背景监控异常区域应进行重点清洁与消杀,防止气溶胶等污染。

共识 29 tNGS 检测应对“干实验”及其全流程进行适当的性能确认。

“干实验”的性能确认包括对计算机模拟测序数据的分析;利用序列模拟软件模拟生成覆盖所有检测范围内物种的测序数据集,数据应与真实测序数据具有相同/相似的技术参数,并采用相同流程分析临床样本,确认生信分析可准确鉴定检测范围的所有物种。全流程的性能确认包括精密度、检出限、交叉反应、方法学符合率、干扰物质以及试剂稳定性等^[28-29]。

七、局限性

1. 检测范围难以标准化:目前 tNGS 的检测和报告范围没有统一,各检测试剂设置不同的检测范围,存在重要或常见的病原体漏检的可能。因此,对于不同的感染症候群,有待于形成以临床最关注病原体为核心,并明确规范最低检测范围的行业共识或团体标准,以便提高 tNGS 检测的临床实用性。

2. 低载量病原体的检测偏向性:对于超多重 PCR 法的 tNGS,首先面临的挑战是如何提高扩增反应的能力/效率,以允许在每个 PCR 周期中有效扩增起始量差别较大的靶标;第二个挑战是在存在大量引物的情况下保持目标扩增特异性^[23, 30]。对于探针捕获法的 tNGS,同样面临杂交捕获时低载

量病原体片段的捕获效率相对偏低的情况。此外,如果采用多样本混合进行杂交捕获,还存在高载量病原样本数据占比较高,低载量病原样本数据量不足,导致灵敏度下降的可能。因此,对低载量病原体应溯源生信分析和结果报告过程,并结合免疫状态、宿主因素、验证指标、影像特征、传统微生物检测结果等临床信息进行综合分析,必要时联系临床开展病例讨论。

3. 污染防控:对于超多重 PCR 法的 tNGS,扩增时靶标的模板量可能会放大到上百万倍,同时在文库构建中有开盖的操作,因此扩增产物很容易形成气溶胶而对同批次样本和后续批次样本的检测造成干扰,导致假阳性结果。对于探针捕获法的 tNGS,检测环节增加了杂交、洗脱等步骤,导致低序列结果检出时,来源于交叉污染的可能性相对 mNGS 有所提高。此外,人员操作的不规范也是污染引入的来源之一。因此,针对不同技术路线的特点,实验室需建立确切可行的实验室污染预警和防控体系,建立基于自动化工作站的全自动或半自动实验流程,并做好人员培训和定期考核,有助于污染的防控和污染来源的追溯。

八、前景与总结

感染性疾病是临床面临的主要疾病之一,存在多重、疑难、危重、特殊感染等,而经验性使用抗菌生物药物将可能加重耐药微生物产生和播散,因此快速准确鉴定病原体是实现临床精准治疗、有效监测、控制传播和降低医疗负担的重要环节。相对于 mNGS, tNGS 检测的成本较低,且受人源影响较小;相对于荧光定量 PCR 和多重 PCR, tNGS 检测能覆盖更多病原体。此外, tNGS 可联合镜检、培养、免疫学等传统方法,在病原体诊断中发挥关键作用。但 tNGS 仍有一定的局限性,其体系构建、污染防控、质量控制、稳定性等仍需要进一步关注并标准化。

目前 tNGS 技术还在不断发展,本共识的观点仍有不断完善的空间,随着临床应用的普及和经验的积累,临床数据和检测技术迭代发展,有望发挥 tNGS 早诊早治的优势,为实现感染性疾病精准诊疗提供技术保障。

执笔人:赵云虎[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],胡雪姣[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],禄梦笛[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],凌勇[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学



院)检验科],孟玥[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科]

专家组成员(按姓氏拼音排序): Tony Chan(美国临床和实验室标准协会),毕利军(广州实验室检测与诊疗技术研究部),陈培松(中山大学附属第一医院检验科),陈小华(上海交通大学附属第六人民医院感染病科),邓倩昀[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],邓朝晖(新疆生产建设兵团医院检验科),邓梓晴[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],方超(中国科学技术大学附属第一医院输血科),顾兵[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],郭主声(东莞东华医院检验科),胡雪姣[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],黄平(广州达安临床检验中心),柯培峰(广东省中医院检验科),李健(中山大学附属第一医院耳鼻喉科),李一荣(武汉大学中南医院检验科),李永鑫(新疆生产建设兵团医院检验科),李正康[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],李卓(西安医学院第一附属医院检验科),金大卫(合肥市第二人民医院检验科),林华明(广州达安临床检验中心),林丽开(武汉大学医学管理研究所/武汉大学中南医院),凌勇[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],刘培辉(深圳市妇幼保健院感染科),卢仁泉(复旦大学附属肿瘤医院检验科),禄梦笛[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],罗阳(重庆大学医学院智慧检验与分子医学中心),罗壮(昆明医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科),孟玥[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],欧启水(福建医科大学附属第一医院检验科),孙世珺(中山市人民医院病理科),孙水林(南昌大学第二附属医院感染科),谭玉洁(贵州医科大学附属医院临床检验中心),童明庆(南京医科大学附属第一医院检验科),王凯(山东第一医科大学第一附属医院小儿内科),王亮[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],王世富(山东大学附属儿童医院临床微生物科),王晓玲(山西省中医院 山西省中医药研究院检验科),王艳(广州达安临床检验中心),魏莲花(甘肃省人民医院检验科),吴涛[宁夏回族自治区人民医院(宁夏医科大学第三临床医学院)检验科],徐英春(中国医学科学院北京协和医院临床检验诊断系),许建成(吉林大学第一医院检验科),严虹(南京医科大学附属第二医院检验医学中心),杨阳(四川省医学科学院·四川省人民医院呼吸与危重症医学科),袁凯旋[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],袁育林(广西医学科学院/广西广西壮族自治区人民医院检验科),张桂菊(山东中医药大学附属医院儿科),张娇(南方医科大学皮肤病医院皮肤科),张云辉(云南省第一人民医院呼吸与危重症医学科),赵平森(粤北人民医院检验科),赵云虎[南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科],郑青(海口市妇幼保健院检

验科),周宏伟(南方医科大学深圳医院院长办公室),卓超(广州医科大学附属第一医院感染科)

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Cui P, Zhang HC, et al. Clinical application and evaluation of metagenomic next-generation sequencing in suspected adult central nervous system infection[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 199. DOI: 10.1186/s12967-020-02360-6.
- [2] 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.
- [3] Gaston DC, Miller HB, Fissel JA, et al. Evaluation of metagenomic and targeted next-generation sequencing workflows for detection of respiratory pathogens from bronchoalveolar lavage fluid specimens[J]. J Clin Microbiol, 2022, 60(7): e0052622. DOI: 10.1128/jcm.00526-22.
- [4] Huang C, Huang Y, Wang Z, et al. Multiplex PCR-based next generation sequencing as a novel, targeted and accurate molecular approach for periprosthetic joint infection diagnosis[J]. Front Microbiol, 2023, 14:1181348. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1181348.
- [5] Mourik K, Sidorov I, Carbo EC, et al. Comparison of the performance of two targeted metagenomic virus capture probe-based methods using reference control materials and clinical samples[J]. J Clin Microbiol, 2024, 62(6): e0034524. DOI: 10.1128/jcm.00345-24.
- [6] Karamitros T, Magiorkinis G. Multiplexed targeted sequencing for Oxford nanopore minION: a detailed library preparation procedure[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1712:43-51. DOI: 10.1007/978-1-4939-7514-3_4.
- [7] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(12): 1181-1195. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704.
- [8] 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.
- [9] 中华医学会细菌感染与耐药防治分会. 呼吸系统感染中宏基因组测序技术临床应用与结果解读专家共识[J]. 中华临床感染病杂志, 2022, 15(2):90-102. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2022.02.002.
- [10] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(6):516-521. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20220113-00046.
- [11] 《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. DOI: 10.3760/cma.j.cn311365-20200731-00732.
- [12] Filkins LM, Bryson AL, Miller SA, et al. Navigating clinical utilization of direct-from-specimen metagenomic pathogen detection: clinical applications, limitations, and



- testing recommendations[J]. Clin Chem, 2020, 66(11): 1381-1395. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa183.
- [13] Peng JM, Du B, Qin HY, et al. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of suspected pneumonia in immunocompromised patients[J]. J Infect, 2021, 82(4): 22-27. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.01.029.
- [14] Yan G, Liu J, Chen W, et al. Metagenomic next-generation sequencing of bloodstream microbial cell-free nucleic acid in children with suspected sepsis in pediatric intensive care unit[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:665226. DOI: 10.3389/fcimb.2021.665226.
- [15] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(6): 341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
- [16] Gaston DC, Miller HB, Fissel JA, et al. Evaluation of metagenomic and targeted next-generation sequencing workflows for detection of respiratory pathogens from bronchoalveolar lavage fluid specimens[J]. J Clin Microbiol, 2022, 60(7): e0052622. DOI: 10.1128/jcm.00526-22.
- [17] He Y, Fang K, Shi X, et al. Enhanced DNA and RNA pathogen detection via metagenomic sequencing in patients with pneumonia[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 195. DOI: 10.1186/s12967-022-03397-5.
- [18] Dai Y, Sheng K, Hu L. Diagnostic efficacy of targeted high-throughput sequencing for lower respiratory infection in preterm infants[J]. Am J Transl Res, 2022, 14(11):8204-8214.
- [19] Li B, Xu L, Guo Q, et al. GenSeizer: a multiplex pcr-based targeted gene sequencing platform for rapid and accurate identification of major mycobacterium species[J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(2): e00584-00520. DOI: 10.1128/JCM.00584-20.
- [20] 张国良, 瞿介明. 呼吸感染性疾病诊治年度进展 2023[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2024, 47(2):141-146. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20231117-00317.
- [21] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 640—2018 临床微生物学检验标本的采集和转运[S].2018-12-11.
- [22] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(20): 3192-3200. DOI: 10.11816/cn.ni.2018-183362.
- [23] Yin Y, Zhu P, Guo Y, et al. Enhancing lower respiratory tract infection diagnosis: implementation and clinical assessment of multiplex PCR-based and hybrid capture-based targeted next-generation sequencing[J]. EBioMedicine, 2024, 107: 105307. DOI: 10.1016/j.ebiom.2024.105307.
- [24] Hardwick SA, Deveson IW, Mercer TR. Reference standards for next-generation sequencing[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(8):473-484. DOI: 10.1038/nrg.2017.44.
- [25] Huang C, Chen H, Ding Y, et al. A microbial world: could metagenomic next-generation sequencing be involved in acute respiratory failure? [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:738074. DOI: 10.3389/fcimb.2021.738074.
- [26] 高通量测序共识专家组. 高通量测序技术在分枝杆菌病诊断中的应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2023, 41(3): 175-182. DOI: 10.3760/cma.j.cn11365-20221203-00492.
- [27] Kumpitsch C, Koskinen K, Schöpf V, et al. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease[J]. BMC Biol, 2019, 17(1): 87. DOI: 10.1186/s12915-019-0703-z.
- [28] 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.
- [29] 中国药学会, 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, 2024, 58(4): 454-465. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20230720-00019.
- [30] Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3724-3730. DOI: 10.1128/AEM.64.10.3724-3730.1998.

