·指南与共识·

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

中华医学会检验医学分会
通信作者：鲁辛辛，Email：luxinxin2009@126.com；王成彬，Email：wangcb301@126.com

【摘要】 宏基因组下一代测序（mNGS）技术直接针对标本中核酸无偏倚检测病原微生物序列。但是，mNGS需经标本前处理、核酸提取、文库制备、上机测序、数据库比对、报告生成及结果解读等一系列过程，对技术平台及人员素质要求较高。为规范mNGS技术在感染性疾病诊断中的应用，提高危急重症、疑难感染性疾病和新发突发传染病的救治水平，在多项国家科技专项的支持下，本领域有关专家起草了本共识，以促进mNGS技术的规范应用和良性发展。

【关键词】 宏基因组下一代测序；　感染性疾病；　病原微生物；　共识

基金项目：国家科技重大专项（2014ZX10004005，2018ZX10103001，2018ZX10102001）；国家重点研发计划（2019YFC1200700）

Expert consensus on clinical standardized application of metagenomics next-generation sequencing for detection of pathogenic microorganisms

Chinese Society of Laboratory Medicine
Corresponding authors: Lu Xinxin, Email: luxinxin2009@126. com; Wang Chengbin, Email: wangcb301@126.com

【**Abstract**】 Metagenome next-generation sequencing (mNGS) technique can directly target the nucleic acid in samples to detect the sequence of pathogenic microorganisms without any bias. However, mNGS needs to go through a series of processes, including sample collection, nucleic acid extraction, library preparation, sequencing, bioinformatic analysis and reporting. All these steps require qualified technical platforms and personnel. In order to standardize the application of mNGS technique in the diagnosis of infectious diseases and improve the treatment quality of critical, difficult and emerging infectious diseases, relevant experts in this field, with the support from many national scientific projects, have drafted this consensus, hoping to promote the standardized application and future development of the mNGS technique.

【**Key words**】 Metagenomics next-generation sequencing; Infectious diseases; Pathogenic microorganism; Consensus

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2014ZX10004005, 2018ZX10103001, 2018ZX10102001); National key Research and Development Program (2019YFC1200700)

快速准确的微生物鉴定技术始终是临床微生物关注的焦点。传统微生物检验，诸如形态学、培养、抗原抗体及靶向核酸检测等方法在解决疑难及未知病原微生物上存在局限性[1-2]。新型宏基因组下一代测序（metagenomics next-generation sequencing，mNGS）技术直接针对样本中所有核酸进行无偏性测序，结合病原微生物数据库及特定算法，检测样本中含有的可能病原微生物序列。随着

DOI：10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704
收稿日期　2020-09-03　　**本文编辑**　武昱
引用本文：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.

该技术的社会经济成本不断降低和技术的不断完善，已逐渐从科研走向临床应用，成为临床疑难和未知病原微生物检验的重要手段[3]。利用mNGS技术进行病原微生物检测需经样本前处理、核酸提取、文库制备、上机测序并满足测试的质量控制要求后，采用特定算法软件与专用的病原微生物数据库进行比对，实现对病毒、细菌、真菌、寄生虫及非经典微生物等的检测[1, 4-5]。mNGS技术不依赖培养，对常见病原微生物检验阴性、经验治疗失败、不明原因的危急重感染的病原学诊断以及新发突发传染病的病原体发现具有独特价值[6-7]。

为进一步规范mNGS技术在感染性疾病诊断中的应用，提高危急重症和疑难感染性疾病的诊疗水平，在多项国家科技专项的支持下，参考国内外相关文献、共识与规范[8-15]，特别借鉴了《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）》[16]，组织本领域有关专家起草了本共识，以促进mNGS技术的规范应用和良性发展。本共识中声明的内容为专家讨论并推荐的要点。

一、临床应用的基本要求

（一）适应证

基于医学决策的mNGS病原微生物检测申请，一般用于传统检验方法未能给出明确病原学结果从而影响患者准确诊疗的感染性疾病、新发突发传染病、验证常规检验结果或排除其他发热疾病。推荐临床通过拟诊先行传统微生物检验及聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测拟诊疑似常见病原微生物，不盲目使用mNGS技术。在必要或紧急情况下，如危急重症、疑难感染、群体性感染事件等，可考虑作为一线检测方法。表1列出了mNGS临床应用适应性说明。

临床上在选择mNGS进行病原微生物确认时应注意如下事项。

1. mNGS检测申请表：mNGS检测实验室应提供适合临床使用的申请表。除患者基本信息外，申请单应包括标本类型、拟诊、现病史、既往史、流行病学史、关注的病原体、抗菌药物使用史等。另外，申请表中应列出不同测序项目及适用范围供医生选择。

2. 靶向基因测序：基于高通量测序技术的病原微生物检测，除无偏倚的mNGS外，还包括原核生物的16S rRNA基因、真菌（5S rRNA基因两端的ITS1、ITS2及25-28S rRNA基因中的D1及D2区等）以及特定病原微生物靶基因等[17]。如怀疑沙眼衣原体可选*momp*（主要外膜蛋白基因），怀疑结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，MTB）可选*rpoB*等靶向基因测序[18-21]。临床医生通过测序实验室提供的项目清单选择适宜的项目，切忌大撒网式排查。

3. DNA测序与RNA测序的选择：mNGS技术理论上可检测以核酸为遗传物质的所有病原微生物。若临床上已排除病毒感染，可直接进行DNA测序。

表1 mNGS临床应用适应性说明

疾病类型	标本类型	适应证（如临床迫切需要不受如下限制）
血流感染	全血	培养、抗原抗体检测、已知病原体PCR检测阴性
重症肺炎	呼吸道分泌物或BALF	培养、抗原抗体检测阴性 PCR排除了甲型流感（H1、H3、H5、H7）、乙型流感、冠状病毒（NL63、229E、OC43、HKU1、SARS、MARS、2019-nCoV）、副流感病毒（1、2、3和4）、人偏肺病毒A和B、肠病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒A和B、腺病毒、肺炎支原体、Q热立克次体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、百日咳鲍特菌及耶氏肺孢子菌等临床常见呼吸道病原体
中枢神经系统感染	脑脊液	培养、抗原抗体检测阴性。PCR排除了单纯疱疹病毒1型和2型、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、人疱疹病毒6型、肠道病毒、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌等常见病原体
眼内炎、关节炎、腹膜炎、胸膜炎等	房水、关节腔积液等无菌体液标本	培养、抗原抗体阴性。PCR排除了巨细胞病毒、肠道病毒、单纯疱疹病毒1型和2型、人疱疹病毒6型、人双埃可病毒、水痘-带状疱疹病毒、肺炎链球菌、葡萄球菌属、流感嗜血杆菌、厌氧菌等临床常见病原体
感染性腹泻	粪便	肠道致病菌培养、抗原检测阴性。PCR排除了轮状病毒、星状病毒、腺病毒、诺如病毒（GⅠ、GⅡ）、沙门菌、志贺菌、气单胞菌、弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、空肠弯曲菌、结肠弯曲菌、致泻性大肠杆菌（EAEC、EHEC、EIEC、EPEC、ETEC）、艰难梭菌、蓝氏贾第鞭毛虫、溶组织阿米巴原虫等常见肠道病原体
脓肿	组织穿刺液	培养阴性
不明原因感染	感染部位相关标本	系统检验后未获得病原学诊断证据

注：BALF为支气管肺泡灌洗液，EAEC为肠聚集性大肠埃希菌，EHEC为肠出血性大肠埃希菌，EIEC为肠侵袭性大肠埃希菌，EPEC为肠致病性大肠埃希菌，ETEC为肠产毒性大肠埃希菌

考虑到DNA测序受人源基因组影响较大，为避免因死亡微生物DNA残留影响现症感染判断，可进行RNA测序[14, 22-23]。当怀疑病毒感染，尤其对呼吸道、脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）及血液标本，或临床表现复杂，无特定怀疑方向时，需要同时对样本中的DNA和RNA进行测序。mNGS技术本身是一种核酸检测技术，由于不同微生物类别本身结构差别，其核酸释放效率差异明显，尤其是真菌、分枝杆菌等核酸提取需要特定的破壁处理，对于疑似真菌或分枝杆菌感染时也应特别提出，在检测过程中增加必要的样本处理过程。

4.mNGS技术的局限性：受临床mNGS技术本身、测序成本及数据库等影响，常规mNGS策略常无法获得样本中所有微生物的序列，临床标本中低浓度致病微生物可能会漏检，同时针对特定的耐药或毒力基因的分析亦较难实现[5]。如果需要对耐药基因或毒力基因进行分析，可以采用特定方法去除部分人源宿主核酸以提升微生物基因组比例，或者结合耐药相关基因或毒力基因进行靶向捕获富集后进行。申请者如有特殊要求应加以注明。

（二）标本类型及采集规范

理论上，凡存在于临床标本中的病原微生物均可通过mNGS检出，但该技术的准确性依赖标本中微生物的核酸质量及含量，也依赖于不同类别微生物核酸的提取效率。

1.血液及高凝标本：持针器肘静脉采集3~5 ml［实验室提供专用采血管，即游离DNA样本保存管，内含乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）抗凝剂和保护剂，可抑制血浆中核酸酶及有核细胞中DNA的释放］。采血时皮肤需彻底消毒，采血至刻度，上下颠倒混匀5~10次，条码标记或编号。切忌在输液处或导管处采集血标本。此外，高凝状态的关节液、胸腹腔积液，甚至CSF也可采用此方法。如果增加RNA测序应同时采2管。

2.支气管肺泡灌洗液及痰液：严格按操作规程采集支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF），弃去前段可能污染的部分，回收10 ml置无菌螺帽管（塑料或玻璃质地均可）中，内含支气管末梢和肺泡中的分泌物。咳痰标本需在医护人员协助下，患者用生理盐水漱口2~3次，弯腰90°，用力咳出深部痰3~5 ml置无菌螺帽管中。若无法自行咳痰，可通过吸痰器从气道采集。咽拭子只适用于呼吸道病毒检测。检查容器有无渗漏，紧盖后封口膜密封，条码标记或编号。

3.CSF、房水及其他体液：经专科医生标准化采集方法获得，无菌螺帽管封口膜密封。CSF（留取第2管或第2管后标本）、关节腔积液、胆汁等检测病原微生物DNA或RNA需采集1 ml，如同时进行DNA及RNA测序应采集2 ml。房水至少采集200 μl。骨髓单独进行DNA或RNA测序，0.5 ml标本即可，如果同时进行DNA及RNA测序则至少采集1 ml。这些临床标本采集困难，切记防污染，避免经引流管采集。胸腹腔积液需富集后提核酸，至少采集10 ml[24]。

4.脓肿及深部组织：（1）开放性脓肿需清创后采集深部伤口或溃疡基底部分泌物拭子置无菌管中。（2）封闭的脓肿需对病灶局部的皮肤或黏膜表面彻底消毒，注射器抽取脓液，若少于3 ml，应采集最大标本量送检。（3）深部组织感染需手术取材，置于无菌螺帽瓶中。多数情况下组织中病原微生物含量低于脓液，尽可能取脓肿边缘组织。

5.粪便标本：至少黄豆粒大小的新鲜标本，稀便3~5 ml，置螺帽容器中。

6.标本转运：若标本在24 h内到达实验室并开始检测，可考虑冰袋低温运输；若运输时间在24~72 h内，应干冰运输，并立刻进行标本前处理和核酸提取；血液标本4 ℃冰箱保存不得超过7 d（专用采血管），在运输过程中避免剧烈晃动；其他临床标本如需长期保存，应按如下原则执行：（1）DNA测序：-20 ℃保存不超过7 d。（2）RNA测序：应置-80 ℃。（3）避免标本反复冻融，一般不得超过3次。（4）理论上-80 ℃可长期保存。（5）若怀疑高致病性或新发突发传染病，严格按照国内传染病法等相关法律要求包装及转运。尽可能在医院生物安全防护条件下抽提核酸后再送测序。

建议1　原则上，临床怀疑病原微生物感染，常规方法未得到明确病原学证据而影响临床救治时，可利用mNGS进一步确认。鼓励临床在排除常见病原微生物后有目的选择mNGS。申请单应填写临床表现、症状体征、治疗经过、现病史、流行病学史及既往史等。测序实验室应让申请者知晓不同类型感染性疾病的标本选择、采集时机、采集方式、送检量、转运及储存条件、不同mNGS检测策略的适用范围。疑为传染病应符合国家相关生物安全标本采集及转运要求。申请者可提出重点关注的病原体，如呼吸道病毒、结核分枝杆菌、真菌及寄生虫等。实验室应提供适宜临床使用的申请单，内容应包括不同mNGS测序策略及对应的适

应证。

（三）报告解读原则

目前病原微生物的确认依然遵循 Koch 法则，即：(1)该微生物存在于同类疾病患者中，健康个体则无此微生物。(2)该微生物必须能够被分离、培养、纯化。(3)该微生物接种于易感动物可引起相同疾病，并可从被接种的动物体内分离到此微生物。(4)该微生物可引起每一个个体发病[25]。但是，作为一种临床检验方法，利用 mNGS 确认的感染病例并不能够完全满足传统 Koch 法则，作为该法则的补充，mNGS 具有如下特征。

1.mNGS 结果分析：理论上，凡存在于标本中的微生物均可检出，但因不同类型微生物基因组长度和测序平台等差异，导致无法针对所有微生物建立统一的阴阳性判读标准[7, 26-28]。实验室应根据预期用途、标本类型、检测目标和技术特点，建立并验证阳性阈值及判读标准。原则上 mNGS 的临床意义同核酸检测。另外，决定一个序列是否来自于某种微生物，很大程度上取决于用于比较的参考微生物序列数据库，如果数据库中未包括该物种以及与其进化距离较近物种的基因组序列可能造成结果不准确。

2.mNGS 结果确认：如果检出的微生物符合疾病特征则可能是引起感染的病原微生物，但不能只从序列数多少确认，需考虑序列在基因组上的覆盖度、特异性及保守性[11, 14]。该病原微生物可通过 PCR 等方法得到验证，如呼吸道标本中的流感病毒、腺病毒及新冠病毒等；粪便标本中的志贺菌、沙门菌及诺如病毒等；CSF 中的肠病毒、单纯疱疹病毒及西尼罗河病毒等；血液中的布鲁菌、巴尔通体及人类免疫缺陷病毒等。如果检出高序列数的某种未命名微生物，应高度警惕新物种的出现。

3.mNGS 阳性阈值及判读标准：报告单中的阳性阈值以百万分子序列数确定。阳性阈值的确定不依赖某个单一的指标，包括但不限于特定微生物的检出序列数、归一化每百万序列（reads per million，RPM）的比值、检出物种的基因组覆盖度等。病毒因极少存活于环境中，因此，少量的特异序列检出即可判为阳性（如少于 3 条特异序列）[26]。避免报出与临床不相关的环境菌、共生菌及条件致病菌等。一般序列数越高病原微生物的可能性越大（数十条特异性序列）。对于结核分枝杆菌、鼠疫耶尔森菌、布鲁菌等临床关注度高、且较难检测的病原菌可采用独立的判读标准，即检出 1 条特异序列即可判为阳性[7, 28]。寄生虫基因组因较为复杂，且与人源基因组相似，应在严格确认序列特异性之后再行判读[14]。如果检出序列为新发物种，则可不受阈值限制，但需给出同源性比对结果。

4.微生物种群致病：无菌部位脓肿标本可见多种病原微生物共检出现象。如脑脓肿、颈间隙脓肿、咽旁脓肿、口腔脓肿等，所检出的微生物序列数均可能达到阳性阈值，多数为严格厌氧菌与兼性厌氧菌共生。这种因微生物种群而致病的现象称为一个种群或一个微生物生态系统引起一种疾病，而非 Koch 法则的一种病原菌引起一种疾病。尽管种群致病的理论还需进行深入探讨，但随着深度测序技术的广泛应用，这种现象在临床上将得到更多验证[29]。

5.不可培养或难培养微生物的结果验证：mNGS 针对标本中所有病原微生物核酸序列，不可培养或难培养微生物不能通过传统培养方法再现，且这类病原微生物同样缺乏血清学或抗原检测。除病毒、螺旋体、立克次体、寄生虫外，这些微生物可通过核酸检测验证，测序同样是诊断的金标准。

6.致病菌、定植菌和污染菌：当确定条件致病菌为病原菌时应考虑患者免疫状态、基础疾病及标本来源。若出现大量背景菌或杂菌序列而无主导微生物应首先考虑污染，其次考虑条件致病菌。如果外科手术或其他有创操作后，无菌部位来源的标本，表现为细菌单一，序列数可能不高，应结合临床考虑医院感染，此时应与背景菌区分，不可一味认为污染。mNGS 不能区分微生物是定植还是感染。mNGS 检测阴性对排除感染有意义，但也应结合临床表现作出正确的诊断[14, 28]。

7.高度传染性微生物：针对具有高度传染性的特殊病原微生物，实验室应根据相关卫生行政部门的规定制定特殊报告程序，标本上传疾病预防控制中心（Center for Disease Control and Prevention，CDC），如当出现像疑似 O1 群或 O139 群霍乱弧菌、鼠疫耶尔森菌、埃博拉病毒或新型病原微生物等，应尽快采用其他方法验证，如 PCR、血清学等，如果支持测序结果应迅速反馈临床和 CDC 系统。

8.提高测序深度：mNGS 常规数据量对耐药和毒力基因检测有局限性[8, 30]，因其得到的微生物序列数不足样本总序列的 5%，特异性序列覆盖度不到微生物基因组 1%，在这种情况下进行耐药基因、毒力岛基因、转录组及代谢通路分析几乎不可能。目前，有以下几种做法可提高测序深度：(1)在常规

测序深度下已明确了病原微生物，再提高测序数据量至可覆盖该物种基因组80%，但花费巨大不适合普及。(2)在宏基因组基础上叠加固定的若干种耐药基因进行靶向测序。(3)研发降低人源核酸比例的创新方法，获得更多微生物测序数据量[4, 7, 31]。

建议2　mNGS作为一种新型检测方法，其临床意义仍未超出核酸检测范畴，它补充了传统病原微生物确认的Koch法则。mNGS可检测难培养、罕见或新发病原微生物，可同时给出多种病原微生物信息，因此，在一份无菌部位来源的临床标本(尤其脓肿)中检出微生物种群(包括不同类别或同类不同种属)不应轻易视为污染。如果这些微生物的存在符合临床诊断，应给予抗菌药物全覆盖，这恰好体现了该技术对全面认识病原微生物的优越性。mNGS常规数据量对耐药和毒力基因检测有局限性，如需耐药和致病信息需提高测序数据量。

建议3　如果检出的病原微生物符合临床预期，应确认序列结果的准确性和特异性。为提高结果的特异性，降低错误率，即使病原微生物也应建立阳性阈值。阳性阈值建立在微生物特异序列数及其在基因组覆盖度上。临床医生在解读条件致病菌时，应排除污染和背景微生物，考虑患者免疫状态及与临床表现的符合性。mNGS结果不能作为临床决策的唯一依据，结果阴性也需结合临床排除感染。

二、mNGS检测病原微生物的实验室要求

mNGS是NGS技术的一种，多数实验室采用边合成边测序方法[32]。该方法使单个DNA分子扩增成大量相同的DNA，然后同步复制，以此增强荧光信号强度，从而读出DNA序列。因此，mNGS具有通量高、读长短、流程复杂、操作环节多、对实验环境及人员要求高的特点。因此，对实验室设施要求高，需要严格遵守临床基因扩增检验实验室管理暂行办法的相关规定。

(一)实验室分区及人员要求

1. 基本原则：即各区独立、注意风向、因地制宜、方便工作，以达到工作有序、互不干扰、防止污染、报告及时[16]。mNGS检测分“干、湿实验”，“湿实验”指从样本处理到测序数据产生的整个测序过程，需要在标准的测序分区实验室完成。一般“测试分区实验室”分试剂准备区、标本处理与核酸提取区、文库构建区及测序区。“干实验”指测序数据的生物信息学分析。

2. 单向工作流程：若实验室设有缓冲间，缓冲间统一为正压或负压。若未设缓冲间，从试剂准备区到测序区压力依次递减。为避免相互干扰，DNA和RNA操作(核酸提取)应分开。如在同一实验室应分两个区域，主要仪器耗材包括生物安全柜、核酸提取仪、移液枪、离心机、试剂及耗材等不可混用。如使用琼脂糖凝胶电泳检查核酸及文库质量，则需有单独的电泳区。靶向测序PCR应在单独的扩增区进行[33]。

3. 污染防控：应定期进行环境评估，为了监控污染需制定试剂、仪器和实验室物表定期消毒的标准作业程序(standard operation procedure，SOP)。还应对无模板参考品或阳性对照中可能出现的污染物进行连续跟踪，并使用保守的阈值标准(见第一章第三部分报告解读原则3)，最大程度减少假阳性结果产生[9]。

4. 实验室人员能力：实验室人员应参加相关培训，并获得国家要求的相应资质[27, 34]。检验人员应具备mNGS项目制定和质量控制能力。报告签发人员应具备临床医学、微生物学和分子生物学背景，掌握相关临床诊疗指南。疑难报告的签发及结果解释需咨询相关领域专家。开展mNGS实验室自建检测项目(laboratory-developed tests，LDT)的实验室同时还应具备生物信息学分析的专业人员，生物信息学分析人员需熟练掌握mNGS检测原理及生物信息软件，具备数据信息维护和管理、开发新算法及更新数据库的能力。

建议4　微生物检测非靶向mNGS实验室至少应包括试剂准备区、样本制备区、文库制备区及测序区。实验室工作流程应为单向。若实验室设有缓冲间，缓冲间统一为正压或负压。若未设缓冲间，压力从试剂准备区到测序区依次递减。DNA和RNA核酸提取分区域进行。若开展靶向扩增NGS测序，应额外增加扩增区及电泳区。若同时开展遗传及肿瘤NGS，核酸提取及建库过程不宜与之混用。报告签发人员应具备临床医学、病原微生物或分子生物学背景，罕见病原微生物结果解释可咨询相关领域专家。若配备有生物信息学分析人员，需掌握mNGS微生物检测软件应用，具备数据信息维护和管理、开发新算法及更新数据库的能力。

(二)检测平台

1. 建立标本前处理及核酸提取方法：标本预处理方法和核酸提取技术在使用前需经过验证。

2. 测序平台的选择：包括仪器设备的选择、测

序平台质量的评价及主流测序平台类型3个方面。

配备开展高通量测序检测项目所需的所有仪器设备：优先选择国家药品监督管理局（National Medical Products Administration，NMPA）批准的测序平台和配套试剂。

测序平台应达到临床预期：除开展满足临床需求的项目外，测序通量、序列的准确率、支持读长、仪器性能验证、内部质控、测序周期及批量检测能力等也是评价测序平台质量的重要指标。

主流测序平台：目前，mNGS主流测序方法有边合成边测序、DNA纳米球测序及半导体测序[3, 32]。实验室根据需要选择适宜的检测平台，使用模拟样本或临床已知微生物样本验证测序全流程。表2列出了不同类型测序平台的技术特点及环境要求。

3. 自动化测序平台：mNGS微生物检测的灵敏度与标本背景有关，如组织标本中含有大量人源基因组，导致微生物序列数占比减少，通过高效自动化测序平台，增加测序深度可提高检测灵敏度。自动化过程降低人工操作、减低外源污染，实验室分区简化。已有文献报道实现了血液、CSF、尿液等标本，从文库构建到报告发放全自动化过程[26]。自动化平台应包括标本前处理、核酸提取、文库构建、高通量测序、生物信息分析和报告发送。

（三）生物信息平台

生物信息学分析（也称“干实验”）是mNGS检测中的重要部分，是对测序产生的原始数据进行处理和分析，包括但不限于数据质控、人源序列比对过滤、微生物物种检测等过程[35-37]。目前尚无统一的标准化数据分析程序及软件[3]。数据分析流程由多种分析软件配套完成，包括数据质控软件（如Fastp、Trimmomatic、FastQC等）、比对软件（如Bowtie2、BWA、MAQ、SOAP2、Blast等）、物种分析软件（如SURPI、Taxonomer、MegaBLAST等）[26, 38-39]。人源基因组和微生物基因组检测数据库有美国国家生物技术信息中心、美国病原体系统资源整合中心[40]、真核生物病原体数据库[41]及病毒病原数据分析资源库[42]等，在构建物种比对数据库时可予以选择，还有耐药基因分析可考虑抗性基因数据库[43-45]，毒力基因分析可使用毒力基因分析数据库[46-47]等。随着mNGS产品的体外诊断化发展，结合人工智能技术的自动化的数据分析系统已经能够提供给临床实验室。

建议5　实验室构建mNGS技术平台以拟开展的检测项目及科研工作为依据，充分论证不同检测平台的适用性，包括生物信息平台。技术平台的建设应包含标本处理、核酸提取、文库构建（DNA和RNA文库）、高通量测序、核酸扩增、产物分析、数据分析等全流程。采用模拟样本或临床已知病原体样本对所有技术环节进行验证，包括检测灵敏性、测序通量、序列质量、读取准确率、支持读长、仪器性能验证、内部质控、测序周期及生物学信息分析能力。比对数据库应满足各类微生物检测需求。

三、mNGS微生物检测方法的建立

（一）标本前处理

标本液化、浓缩及去除宿主核酸等前处理方法和设备使用应标准化。所有标本应具有唯一标识，防止在信息录入和标本分拣过程中交叉污染。根据申请要求提前准备被检测微生物所需的文库资料及生物信息分析软件。建立临床标本的前处理程序，包括复杂标本、微量标本和组织标本的前处理程序，针对真菌和/或分枝杆菌等特殊微生物的破壁处理程序。建立RNA病毒、微生物游离核酸测序的前处理方法。建立组织标本研磨方法，具体方法见表3。

（二）核酸提取

1. 使用经性能确认的核酸提取试剂：临床标本中存在不同类型的病原微生物，核酸提取方法的可重复性和提取效率对保证核酸的完整性及纯度至关重要。实验室应根据临床标本类型和微生物种

表2　主流深度测序平台的技术特点及环境要求

项目	边合成边测序技术	DNA纳米球测序技术	半导体测序技术
测序原理	利用带有阻断基团的荧光标记碱基，随模板互补链延伸一同进行测序反应	通过DNA纳米球（DNA nanoball，DNB）测序模板与测序试剂中带荧光标记的探针相结合，根据荧光信号读取碱基排列顺序的技术，所有跟DNB相关的测序技术都属于DNA纳米球测序技术	该技术基于布满小孔的高密度半导体芯片（1个小孔就是1个测序反应池），当DNA聚合酶把核苷酸聚合到延伸中的DNA链上时，释放出的氢离子将改变反应池中的pH值，通过检测pH值变化并将其转化为数字信号，读出DNA序列
环境要求	室温（22±3）℃；相对湿度20%~60%；普通空气洁净度或以上；保持合适空间及环境	室温（22±3）℃；相对湿度20%~80%；测序实验室的洁净度为百万级或更高；保持合适空间及环境	室温20~30 ℃；相对湿度40%~60%；测序实验室的洁净度为百万级或更高；保持合适空间及环境

表 3　不同类型临床标本前处理方法

标本类型	预处理步骤（所有离心在 4 ℃进行）
组织块及吸针物	（1）大块组织，多部位取材液氮研磨至粉状，取 10~20 mg 加 400 μl PBS 提核酸 （2）小组织块或针吸物，无菌刀片切碎或手持研磨器研磨后提核酸
痰及 BALF	痰液或呼吸道分泌物 3~5 ml，加等量液化剂二硫苏糖醇混匀，室温或 37 ℃孵育，待完全呈液体状态后 45×*g* 离心 10 min，取上清 1.5 ml，10 000×*g* 离心 15 min，沉淀提核酸。BAL 液 10 ml，10 000×*g* 离心 15 min，弃上清（若沉淀黏稠可加等量液化剂，液化后取 1.5 ml，10 000×*g* 离心 15 min）沉淀提核酸
各种拭子	拭子管中加 450 μl 1×PBS，涡旋振荡 5 min，取 400 μl 提取核酸
血浆、脑脊液、穿刺液、关节液、脓液、胸腹腔积液、骨髓等	血浆及脑脊液可无需离心直接提核酸。DNA 测序时，1.5 ml 标本 10 000×*g* 离心 5 min，沉淀提核酸。胸腹水需取 10 ml，45 ×*g* 离心 10 min，取上清 1.5 ml，10 000×*g* 离心 15 min，沉淀提核酸。骨髓加等量 PBS 稀释后操作同上
粪便标本	适量 PBS 或生理盐水溶解混匀 45×*g* 离心 5 min，上清提核酸

注：PBS 为磷酸缓冲盐溶液；BALF 为支气管肺泡灌洗液

类建立针对性的标准化提取程序。建议使用经性能验证的商品化提取试剂及设备。

2. 核酸质量验证：（1）高质量的 DNA A_{260}/A_{280} 应在 1.7~1.9，A_{260}/A_{230} 应>2，可用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 质量（无杂带、无拖尾、背景无蛋白污染）。（2）DNA 完整性（如 Agilent 2100 Bioanalyzer）检测，如果大部分片段在 200 nt（血浆游离 DNA 除外，140 nt）以下说明 DNA 降解严重，需重提。（3）高质量的 RNA A_{260}/A_{280} 应在 1.8~2.0，A_{260}/A_{230} 应>2。（4）微量的核酸采用 Qubit 荧光染料法进行定量测定[15]。

3. 核酸含量极低样本的处理：如 CSF、房水等，应在标本中加 50 μl ATL（DX）研磨珠，低频震荡 10 min，离心后取 150 μl。加入 150 μl 裂解液和 8 μl 蛋白酶 K，涡旋震荡混匀 30 s，56 ℃恒温震荡 15 min（若无恒温震荡仪，可用金属浴代替，期间每 3 min 混匀 1 次）；取裂解后的样本 300 μl，加入磁珠 240 μl，震荡混匀，室温静置 5 min，上清提核酸。按照商品化的操作说明进行。

4. 去除人源 DNA 的方法：多数临床标本存在大量宿主细胞和宿主游离核酸，微生物核酸丰度相对较低。因此，在核酸提取环节中可考虑建立高效去宿主 DNA 方法，提高 mNGS 微生物检测的灵敏度[4, 48]，去除人源核酸的方法选择需要结合临床检测目的，举例如下。

去污剂处理：因人源细胞的细胞膜较微生物外壁脆弱，在核酸提取前用温和去污剂（如皂苷）裂解宿主细胞释放 DNA，再用脱氧核糖核酸酶Ⅰ降解人源 DNA，通常可使微生物富集效率提高 1 000 倍[49]。

低渗溶液破坏宿主细胞：使用细胞膜不透性的叠氮碘化丙锭结合暴露在溶液中的宿主 DNA[48]。

抗甲基化 DNA 磁珠：因人源 DNA 甲基化程度高，大多数微生物基因组中缺乏甲基化 DNA，使用抗甲基化 DNA 磁珠可有效去除人源 DNA，可实现 3~5 倍富集[26]。

使用 CRISPR-Cas9（基因编辑技术）剥离目标序列：此法对构建 RNA 文库较为有利，可提高非编码 rRNA 序列含量，但对 DNA 文库构建意义不大，不推荐花费更大财力去除全部人源 DNA。

5. qPCR 预估人源核酸的去除效率：去除宿主 DNA 后，对宿主及微生物常用的标志基因，如 β 肌动蛋白基因、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因和 16S rRNA 基因等，进行实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）定量检测，通过经验积累大概预估宿主残余比例及有效数据比例，必要时可提高测序数据量。

（三）文库制备

文库制备是将基因组 DNA 片段化并在片段末端连接寡核苷酸接头的过程，文库质量直接影响测序数据质量。目前常用的建库方法有超声波打断建库、酶切建库及转座酶建库等，选用操作简单的方法对降低污染有利。

1. 明确核酸质量及文库产出标准：实验室根据文库制备方法及测序平台明确起始核酸质量标准（纯度、浓度）及文库产出标准（文库浓度、片段大小等）。

2. 建议使用配套试剂：若起始 DNA 在 10 ng 以上，可采用普通建库试剂盒；若 DNA 在 100 pg~10 ng 之间，则采用超微量 DNA 建库试剂盒；若 DNA 量低于下限，应先行全基因组扩增，再进行建库。

3. 构建 RNA 文库：逆转录前需在冰上操作，防止 RNA 降解。应添加 RNA 酶抑制剂，必要时在建库前采用杂交捕获法或核糖体分离法去除 rRNA[15]。

4. 文库质量：可采用 Qubit 荧光染料法检测文库浓度，qPCR 检测文库中有效连接接头的核酸浓度。上机前需根据不同的测序平台对文库浓度的要求进行。高质量的文库 DNA，其 A_{260}/A_{280} 通常在 1.75~2.00。此外，还应采用生物分析设备检测文库片段大小及峰型，文库片段大小为插入片段和接头序列的总长度，合格文库插入片段长度大于 100 bp，文库应主峰明显、无杂峰、无接头、无引物二聚体[15]。

建议 6　实验室应具备针对不同类型临床标本的前处理方法，尤其针对复杂和极微量标本应具备经验证的灵敏的手段。无论 DNA 还是 RNA 核酸提取质量应满足测序要求。在核酸提取的过程中应引入经验证的降低人源核酸处理方法。推荐使用配套试剂构建文库，根据初始核酸浓度选择文库建库试剂盒，若 DNA 量低于下限应先行全基因组扩增再进行建库，文库核酸浓度、纯度及长度应达到测序（包括靶向测序和宏基因组测序）要求。文库制备方法需用已知临床标本或模拟样品或质控品进行验证或开展实验室间比对，合格后方可用于临床。

（四）上机测序

测序数据量指每个样本测序所得的序列数或碱基数（nt），二者可相互转换，一般宏基因组测序用序列数表示。测序数据量与预期用途（如微生物检测、耐药基因检测、微生物组学分析、宏基因组学分析等）、样本中微生物与人源核酸占比、测序灵敏度以及测序成本等因素相关。

mNGS 微生物检测的灵敏度与标本人源核酸含量有关，不同类型临床样本人源核酸平均含量不一样，为保证结果可靠性，在相同样本处理和核酸提取方法时，通常不同类型临床标本推荐不同测序数据量，原则上背景简单的标本如 CSF、血浆等（人源核酸含量低）较低的测序数据量即可满足病原微生物检出。在条件允许的情况下可增加测序数据量以提高检测灵敏度。可通过数据抽样，即从下机数据中（如 20 M）随机抽取 15 M 组成一个模拟的 15 M 测序数据集模拟分析不同测序数据量、不同物种的检测限，从而最终确定不同标本类型的最佳测序数据量。通常靶向测序的数据量应≥3 万条序列，宏基因组测序鸟枪法测序数据量应≥2 000 万（20 million，20 M）高质量序列，准确度 Q30 比例≥85%。也有文献推荐 CSF600 万条（6 M）序列[26, 35]、血液游离 DNA 2 400 万条序列（24 M）[50]、咽拭子病毒检测 1 000 万条（10M）序列[51]等。测序数据量提升可显著提高灵敏度，以血流感染为例，每个标本平均 20 M 序列时，总体灵敏度为 31%[52]，每个标本平均 24 M 序列时，总体灵敏度达到 48%[50]，当每个标本平均数据量达到 33 M 序列时，总体灵敏度达到 71%[53]。

（五）生物信息学分析

生物信息分析是对测序得到的原始序列进行数据分析和处理的过程，以预定程序执行。该流程由多个软件组成，包括去除人源序列、处理微生物序列及相关元数据、检测候选目标微生物，实现检测与数据的转换。数据分析中应考虑预期用途、软硬件功能、数据存储位置、版本号及信息备份等。同时应确保患者信息安全，设置读取规则、人员权限、数据异常提取的警报。目前已经具有商业化的自动分析系统可以选择，实验室也可选择与国际同步的算法和软件，搭建实验室自己的分析流程，搭建过程中应选已知阴阳性样本或质控品进行生物信息学分析能力模拟测试。

1. 序列质量：碱基质量值是衡量测序质量的重要指标，用于评估下机序列数的准确度。质量值（Q）越高代表碱基被测错的概率（P）越低，两者关系为 Q=−10 lgP。Q20 对应的测序错误概率为 1%、准确率 99%。Q30 对应的测序错误概率为 1‰、准确率 99.9%。常用 Q20 和 Q30 分别代表质量值≥20 或 30 的碱基所占百分比。实验室应要求保证 Q30 至少达到 85%[54]。在对测序数据进行分析之前，应首先进行质量控制，去除读长过短（如<50 bp）和低质量的序列，获得的高质量序列再与人源基因组比对去除，剩余序列进入后续的微生物检测分析[11, 14-15]。

2. 判读标准：判读标准与测序数据量密切相关，在生物信息学分析流程搭建和优化过程中，应确定判读标准，以区分阴阳性结果。实验室应对不同类型的临床标本和不同类型微生物建立不同的判读标准。判读标准应包括但不限于检出序列数、基因组覆盖度、微生物丰度、测序深度、离散度、RPM 比值等技术指标[7, 11, 14, 26, 35]。

高通量测序得到的是大量短序列（通常在 100 bp 以内），因此，当序列比对到参考序列时，如同时出现人源和某种微生物，则优先判为宿主序列。判读为某微生物属水平的序列数应大于种水平。当种水平序列数越接近属水平，则该物种的可能性越高。比对到微生物的序列数与基因组测序覆盖度

呈正相关。实验室可根据基因组覆盖度、序列特异性等参数计算出病原微生物检测可信度(%),便于临床判断。

其他判读方法:有文献通过自建参考品先设定判读标准,再采用临床标本进行判读标准的确认。也有文献通过检测一定数量的已知阴阳性样本,采用统计学方法,如受试者工作特征曲线或准确率-召回率(precision-recall,PR)曲线来确定合理的判读标准[27]。

3.阳性阈值:判读为阳性的界值即为阳性阈值。阈值的设置与检出序列数、检出序列的特异性、特异序列的基因覆盖度、该物种同源性复杂程度以及检测灵敏度有关。即使病原微生物也应制定阳性阈值。针对某些特殊传染病病原微生物,在排除污染的前提下,即使检出 1 条序列也应视为阳性,如 MTB、鼠疫耶尔森菌及流行性出血热病毒等[7, 29, 55]。

4.数据库:包含两个部分,即微生物检测数据库和人源数据库。微生物检测数据库包含细菌、真菌、病毒和寄生虫基因组序列信息,其中支原体、衣原体、螺旋体、立克次体视情况可独立也可并入细菌类别中。公共数据库需经验证方可使用。构建微生物数据库应优先选择全长参考基因组以及测序质量高、样本来源、临床信息完整的序列。临床重要的病原微生物应入选具有时间和地域代表性的毒菌株基因组。有条件应构建科研数据库二级数据,以确保重要的病原微生物不错报、不漏报。人源数据库是为去除人源序列干扰而设计,包含染色体基因组、线粒体基因组及转录组等序列信息。收录的信息应确保准确、完整、有详细注释,不是越多越好。推荐采用模拟数据对数据库的有效性进行验证(见本文第四章第三节分析性能确认)[56]。

5.具备数据库更新能力:实验室应持续跟踪使用版本的数据库。应使用标准化数据集对更新后的数据库进行验证,确保数据的准确性和可重复性。

6.建立背景微生物数据库:mNGS 可能含有多种微生物信息,其中不乏正常菌群、污染微生物及背景微生物[57]。应建立人体不同部位正常种群数据库,并纳入报告分析解读流程。虽然有些微生物存在于标本中,但与疾病无关,应在报告中去除或说明。此外,mNGS 流程中所用的各种试剂中也可能存在微生物个体或核酸,应建立试剂背景微生物序列数据库,在报告中予以去除。

7.建立错误数据修正机制:mNGS 同样存在测序错误的情况,因此需去除原始下机数据中的低质量序列,包括测序接头污染的序列、质量值低的序列及短重复序列等。由于 mNGS 为批量标本平行上机测序,难以完全避免标签跳跃,应通过技术手段与分析流程防止高拷贝微生物序列污染平行上机样本。

建议 7　实验室需通过已知标本确立不同类型标本个性化的测序数据量、验证序列质量值、确定判读标准及不同类型微生物阳性阈值。在进行序列比对时掌握如下原则:序列比对一致性相同优先考虑人源序列,该序列与数据库中微生物种属匹配度高、属水平序列数大于种水平、种序列数越接近属水平则确认该种的可能性越大、结果的可靠性与基因组覆盖度成正比、低于阳性阈值的病原微生物不可轻易放过,需结合临床或复检或重留标本再测。

建议 8　实验室应使用国际公认或经验证或文献推荐的公共数据库,包括人源数据库与微生物数据库。实验室可在临床用库的基础上建立二级科研数据库,以便应对罕见或新发微生物。建立生物信息学分析程序并进行性能确认,确定测序数据量与不同类型微生物的判读标准。生物信息学分析程序满足预期检测性能参数,结果应符合预期要求。实验室应建立监测生物信息学分析程序,记录分析流程中各组分改变或版本更新(如软件升级、数据库更新、脚本更改等),定义流程及数据库的版本号,以保证报告的可溯源性。

(六)检验报告

1.基本要求:过滤后的序列才可用于微生物检测报告,用于种属检测的短序列应为特异序列,特异序列作为最后报告的阳性阈值。正式报告单应包括测序总序列数、内标检测数据量、检测病原微生物列表、检出病原特异序列数量、检测病原范围、测序数据质量、检测方法及检测技术说明。同时对相关专业术语进行解释说明,并注明检测方法的局限性、检测的灵敏度和特异性以及疑似背景微生物等。由于测序可检出以往罕见的病原菌,需解释物种来源、致病性、流行病学特点及最新研究结论等[58]。科研 mNGS 报告应满足用户要求。实验室应保留所有检出的微生物参数,包括但不限于比对序列数、相对丰度、基因组覆盖度和测序深度等。

2.报告单的使用:从技术角度讲,mNGS 阳性或阴性结果不能作为临床诊疗决策的唯一依据,即使

无菌部位标本的mNGS结果也需结合临床表现或其他检查结果进行综合判断。mNGS检出或未检出某物种的核酸片段，提示患者标本中含有或不含有该物种核酸，但不能明确该物种与感染的关系，即mNGS阳性不一定是病原微生物。另一方面，受取样及病程变化、测序策略本身的灵敏度局限、实验室检测能力和生物信息学分析水平的影响，mNGS检测阴性结果也需结合临床进行判定。从法律角度讲，无认证实验室的检测结果不能成为诊断依据，仅做研究所用。因此，目前国内任何实验室出具的mNGS微生物检测报告均不可直接用于临床诊断，也不应成为医疗文书[59]。

建议9　用于临床辅助诊断的mNGS报告应包括测序总序列数、检测病原微生物列表、检出病原特异序列数量、检测病原范围、覆盖度、测序深度、检测方法及检测技术说明。mNGS结果的本质与PCR相似，代表临床标本中检出或未检出某微生物的核酸片段，不能明确该物种与感染的关系，即使阴性结果也需结合临床表现及其他检查结果进行综合判断。

四、性能确认

优先选择NMPA批准的仪器与试剂，如果改变获批试剂制定的预期用途、试剂组分、操作流程等，则按照LDT试剂要求进行管理，在开展临床服务之前所有与mNGS有关的仪器、试剂、检测流程、数据库及分析软件均需进行性能确认[16]。

（一）测序平台的性能确认

依据检测项目及临床预期用途，综合考虑测序读长和通量、测序准确率、运行时间、测序成本等选择测序平台。安装时，由厂方工程师按照说明书所注明的仪器性能指标逐项验证，达到厂方声称的指标并满足临床预期用途为合格。

（二）生物信息分析平台的性能确认

实验室可以选择商业化的自动分析系统，也可需根据检测项目和预期用途选择合适的算法和软件，搭建本实验室的生物信息学分析流程，并进行必要的性能确认，以保证对病原微生物检测的准确性。性能确认包括但不限于最低测序数据量及碱基识别质量值等，实验室应根据国际上本领域发展不断优化分析平台。临床标本的测序数据是进行性能确认时最重要的数据，即临床标本mNGS全流程检测后得到的测序数据。计算机模拟的测序数据可通过数据模拟软件ART等软件生成[59-60]。但是计算机模拟和参考物质的测序数据只能作为补充数据，不能完全替代临床标本测序数据。

（三）分析性能确认

分析性能确认包括从临床样本前处理到生物信息学分析的全过程，观察指标至少应包含精密度、准确度、可报告范围、分析敏感性、分析特异性等。

1. 精密度：指在规定条件下所获得的多次独立检测结果的一致度，评价检测方法的重复性。包括对同一批样本在同一条件下（相同的环境、操作人员及仪器）至少进行3次以上检测，评价重复精密度，以及不同日间、不同人员、不同仪器（相同型号）至少进行3次以上检测，评价再现性精密度。可选择高、低2个不同梯度的参考品进行验证，精密度应>90%[13]。

2. 准确度：是指与真阳样本、真阴样本结果或金标准方法检测结果的符合率。对准确度的评价可通过两部分进行。

通过临床样本验证：选另一NMPA已获批或被普遍接受的金标准方法与mNGS同时检测临床样本，比较mNGS与金标准方法之间的差异，不一致的结果再用第3种方法进一步确认，通过阳性符合率和阴性符合率评价定性测定的准确度[16, 35, 61-62]。

通过参考品验证：mNGS目前尚无国际或国家参考品，实验室可自制企业参考品进行验证。如在明确阴性或健康人标本中掺入不同类型病原体的标准参考品（如病毒、细菌、真菌、寄生虫等）制备模拟阳性样本，建议使用8~10种病原微生物（包括RNA病毒）验证检测的准确度。样本数量不少于20例，浓度范围应覆盖高、中、低，一致率应大于90%[26, 62]。

3. 最低检测限（limit of detection，LoD）：用于描述测序方法的分析敏感性，它是指能够通过测序获得准确目标微生物的最低浓度，一般要求可信度≥95%。可根据预期用途、标本类型等，选择含有代表物种的混合参考品，10倍梯度稀释进行检测，每个梯度至少3个重复，计算出LoD值，并在该LoD浓度进行20次以上重复，确保95%的检出。实验室需要建立不同样本类型、不同代表物种的LoD[63]。

4. 分析特异性：分析特异性主要评价样本中潜在干扰物质对检测结果的影响。mNGS最大的干扰物是人源核酸，高浓度的宿主背景可严重降低检测灵敏度。痰标本需增加黏蛋白对结果干扰程度的评估。血液标本需增加血红蛋白干扰程度评估。应使用接近临床真值的干扰物浓度进行验证，建议

包含每种干扰物质的潜在最大浓度。可将不同含量的干扰物质分别添加到阳性样本中，以评估干扰物质对检测结果的干扰程度。mNGS 分析特异性还需考虑近源物种的交叉反应，即鉴别不同亚种、亚型的能力[4, 26, 50]。

5. 可报告范围：mNGS 的可报告范围理论上应为参考数据库中包含的所有微生物，在对参考数据库进行更新升级时，可报告范围也相应发生变化。实验室应在数据库升级时对可报告范围和上述各项性能指标重新进行确认。在准确度验证中，应确认可报告范围，实验室在日常检测中，应对可报告范围持续关注和确认[26]。

（四）性能确认的样本要求

1. 代表性：涵盖不同类型微生物的各类感染标本是理想的性能验证样本。未经性能验证的标本类型应被视为无法准确得到结果的样本。如果缺少具有代表性的病原微生物，可使用模拟样本代替。不同类型微生物应特别强调结核分枝杆菌、丝状真菌、RNA 病毒及寄生虫。不同类型的临床标本特别强调血液、CSF、BALF、组织标本和关节液及胸腔积液。

2. 样本量：进行分析性能验证的样本量需达到统计学意义。有文献建议精密度确认至少需 3 份样本，准确度评价至少检测 59 份样本，进行 LoD 评价时至少需要检测 20 次。如果短时间内无法获得丰富的样本类型及微生物种类，可选 PCR 已知微生物的人源 DNA 含量低（CSF 及血浆）及高含人源 DNA 样本（痰及 BALF）各 2 份进行验证，如果可准确检出，则认为系统满足 mNGS 使用。其他类型样本可在实践中逐步补充完善[62, 64]。

（五）临床性能确认

临床性能确认包括临床敏感性和特异性。实验室需结合临床信息对检测结果进行临床性能确认，如常规检查、影像学检查、临床表现及临床医生的判断等。如果疾病种类、标本类型及病原微生物的覆盖度无法达到临床性能确认的统计学标准，实验室可从无症状对照组获得临床特异性的指标。此外，也可根据文献建立临床性能确认指标[7, 26, 35]。

建议 10　使用 NMPA 批准的 mNGS 试剂应进行分析性能验证，LDT 试剂应根据预期用途进行方法设计和优化，并对检测全流程进行整体的性能确认。分析性能确认应包含不同类型样本及重要病原微生物，如果没有足够的临床样本可用模拟样本代替。分析性能确认包括但不限于精密度、准确度、检测限、分析特异性和可报告范围等。在确认分析性能后建立“湿实验”和“干实验”的 SOP，明确性能参数及检测局限性。若实验室流程改变需进行全面或部分性能再确认。

五、质量保证

（一）质量要素

质量要素包括核酸提取的浓度和纯度、文库构建所需的核酸量、文库片段分布、文库浓度、最低测序数据量、符合要求质量值的碱基百分比（如 Q30）以及检测的局限性、检测全过程 SOP（采样要求、样本前处理、核酸提取、文库制备、上机测序、生物信息学分析等）及其他参数（内标、质控品、分析参数、质量标准、数据库等）。若试剂、软件及其版本、参数和数据库发生改变，实验室应根据影响程度进行全流程或部分环节的再确认[26, 64-66]。

（二）分析前

实验室应针对不同样本类型（如肺泡灌洗液、痰液、血液、CSF、脓肿、组织等）、采集方法、采集容器、采样量、运送及保存条件等制定 SOP 文件并进行确认，保证标本质量，避免交叉污染。应制定临床标本接收和拒收标准，对不满足接收标准又无法重新取样的标本，实验室与临床沟通后实施让步检测（虽然标本不合格，但难以再次获得，征得临床同意后进行的检测）[67-70]。

（三）分析中

实验室应根据性能确认或性能验证结果，针对不同类型样本建立分析中检测的标准操作程序。

1. 记录：核酸提取浓度、文库上样量、文库片段大小分布范围、测序数据量、测序质量值及序列数量是分析中记录的重点。当上述指标未达到检测标准时，实验室应建立异常情况处理程序，如让步检测、确认检测或检测报告待发等。鼓励实验室记录信息化，减少人为错误。

2. 室内质量控制程序：可采用模拟样本作为阴性及弱阳性对照的质控品（包括 DNA 质控品和 RNA 质控品）。模拟样本的生物学特征和基质应尽可能与临床样本一致。自制质控品应有制备流程及验证记录[16, 26, 36, 71-72]。

阴性对照为不含任何微生物核酸的样本，可使用多种材料制备，如核酸提取试剂或其他试剂的洗脱缓冲液、商品化的人体模拟样本或经确认的临床阴性样本。阴性对照可对外部污染（如采集管、实验室环境、消耗品等）、试剂和交叉污染进行一定程度上的控制。

弱阳性对照可通过在阴性对照中掺入适量浓度具有代表性的微生物核酸(一般指细菌DNA、真菌DNA、病毒RNA)进行制备。如果弱阳性对照未检测到目标微生物,则可能表明在标本前处理、核酸提取、文库制备、测序及生物信息分析过程中出现错误,需重新检测。

若质控品出现失控,应分析失控原因,并采取相应的纠正措施和预防措施。若在检测过程中发现试剂污染或某一检测步骤存在问题,则应重复检测。

3.不合格率统计:实验室定期统计核酸提取、文库构建、下机数据质控、测序数据量等的不合格率,以及污染率及病原微生物阳性率等,动态监测检测量和室内质控数据。mNGS受环境菌、试剂工程菌、实验室背景微生物影响,应定期对实验室环境、试剂等进行监测,确定对mNGS干扰的背景微生物种类。

4.参加室间质评或能力验证:目前我国尚未开展mNGS微生物检测的室间质评。本共识鼓励进行实验室间比对,如果发现结果不符合应查找原因。

(四)分析后

1.总体要求:mNGS检测结果应分类报告病原微生物,如病毒、细菌、真菌、寄生虫及未命名微生物等。检出的微生物应报告特异序列数,原始数据分析结果、相对丰度、置信度、基因组覆盖度、测序深度等指标为临床提供参考。mNGS报告单还应体现相关专业术语解释、检测方法及局限性、检出微生物的临床相关性、疑似背景微生物等[14, 28]。

2.结果的可溯源性:参照指南、共识或文献建立报告解读的SOP。结果解释应准确及时,并描述该微生物的临床意义。意义不明、无法排除背景干扰的微生物可在报告附录中显示。可疑新发病原微生物需用其他方法验证,并转送国家CDC或有资质实验室确认[14, 16, 28]。

3.报告内容:(1)基本信息同申请单。(2)正式报告除明确微生物特异序列数外,还应包括测序数据总量。(3)结果解释中有微生物基本信息及可能的临床意义。(4)未命名微生物需给出同源性比对结果。(5)注明检测范围、方法的局限性及实验室信息[11, 28]。

建议11 实验室应建立全面的质量控制体系,针对"人、机、料、法、环"及分析前、中、后所有环节制定相应的程序文件、SOP、记录表格、室内质控要求及报告的质量控制。对让步检测建立异常情况处理程序,在报告中提示风险因素。mNGS结果报告应对检测局限性等进行说明。具有明确临床意义的病原微生物应在报告正文中提示,意义不明或无法排除背景干扰的微生物应在附录中提示。针对特殊病原微生物应提示临床进行多方法验证。

mNGS技术是针对未知、疑难病原微生物检测的新型核酸检测手段,无论针对新发突发传染病还是临床棘手的疑难感染性疾病都有出色表现。它以无选择性、结果快速、适用各类临床标本而较其他检测技术有不可比拟的优势,成为传统方法难以为继时认可度最高的检测手段。但是任何技术都不可能解决所有问题,mNGS技术仍然没有摆脱核酸检测的局限性,每一结果的解释都需结合临床。同时,基于该技术开展的不同临床检测策略本身还有比技术更多的局限性,不同测序策略也有不同的适用范围,因此,对mNGS技术应用于临床微生物检测保持科学严谨、合理、规范使用的态度,使其发挥最大作用是检验同道的期望。希望本共识对提高疑难感染性疾病的诊疗水平、完善微生物检验技术、指导mNGS实验室建设发挥作用。

执笔人:鲁辛辛(首都医科大学附属北京同仁医院检验科);王玫(首都医科大学附属北京同仁医院检验科);赵建玉(首都医科大学临床检验诊断学2018级);樊高威(首都医科大学附属北京朝阳医院检验科);杨瑞馥(军事医学研究院微生物流行病研究所);任丽丽(中国医学科学院病原生物学研究所);胡继红(北京医院国家老年医学中心卫生部临床检验中心);鲁炳怀(中日友好医院临床微生物室与感染实验室);赵晓涛(北京大学人民医院检验科);吴丽媛(广州市妇女儿童医疗中心检验科);隋文君(首都医科大学附属北京同仁医院检验科);周倩倩(首都医科大学临床检验诊断学2018级)

撰写专家组成员(按姓氏汉语拼音排序):陈唯军(中国科学院大学华大教育中心);金荣华(首都医科大学附属北京佑安医院肝病科);李振军(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所);胡继红(北京医院国家老年医学中心卫生部临床检验中心);鲁炳怀(中日友好医院临床微生物室与感染实验室);鲁辛辛(首都医科大学附属北京同仁医院检验科);任丽丽(中国医学科学院病原生物学研究所);苏建荣(首都医科大学附属友谊医院检验科);王成彬(中国人民解放军总医院第一医学中心临床检验科);王辉(北京大学人民医院检验科);王晶(中国科学院大学心理所);王景林(军事医学研究院微生物流行病研究所);王佳伟(首都医科大学附属北京同仁医院神经内科);肖迪(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所);徐英春(中国医学科学院北京协和医院检验科);杨启文(中国医学科学院北京协和医院检

验科）；杨瑞馥（军事医学研究院微生物流行病研究所）；于艳华（首都医科大学附属北京佑安医院临床检验中心）；赵雁林（中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心）

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

志谢　麻锦敏（深圳华大因源医药科技有限公司）、刁智娟（欧蒙未一医学检验实验室）、张柳燕［欧蒙医学诊断（中国）有限公司］、马丽娟［欧蒙医学诊断（中国）有限公司］、李沛志［因美纳（中国）科学器材有限公司］、梁蕊［因美纳（中国）科学器材有限公司］和李永军（广州微远基因科技有限公司）对本共识中所涉及的技术路线及方法给予验证，并提出修改建议

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(7): 605-615. DOI: 10.1080/14737159.2018.1487292.

[3] 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.

[4] Hasan MR, Rawat A, Tang P, et al. Depletion of human DNA in Spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by next-generation sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(4): 919-927.DOI: 10.1128/JCM.03050-15.

[5] Simner 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. DOI: 10.1093/cid/cix881.

[6] 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.DOI:10.1128/mBio.01888-15.

[7] 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. DOI:10.1093/cid/ciy693.

[8] Center for Devices and Radiological Health. Infectious Disease next generation sequencing based diagnostic devices: microbial identification and detection of antimicrobial resistance and virulence markers. Draft guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. FDA-2016-D-0971. 2016. [EB/OL] [2020-09-01]. https://www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/infectious-disease-next-generation-sequencing-based-diagnostic-devices-microbial-identification-and.

[9] New York State of Opportuity, Department of Health. validation of whole-genome sequencing (WGS)using next generation sequencing (NGS)-based methods for identification and/or characterization of infectious agents. New York, 2015[EB/OL] [2020-09-01]. https://www. wadsworth. org/sites/default/files/WebDoc/1205717160/ID_WGS%20NGS_Molecular_Guidelines_for_Isolates.pdf.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 周永召, 李亚伦, 范红, 等. 临床宏基因组学在呼吸感染性疾病精准诊疗中的疑问解析[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(6): 539-543. DOI: 10.7507/1671-6205.201804048.

[13] 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.

[14] 宏基因组学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. 宏基因组学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.

[15] 中华预防医学会. T/CPMA 010-2020 基于高通量测序的病原体筛查通用准则[Z].2020-07-01.http://www.cpma.org.cn/zhyfyxh/tzgg/202007/3db1fa533bf24409931048096cbfa997.shtml.

[16] 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.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA sequencing. 2nd ed. CLSI guideline MM18[S]. Wayne, PA: CLSI, 2018.

[18] Rutanga JP, Van Puyvelde S, Heroes AS, et al. 16S metagenomics for diagnosis of bloodstream infections: opportunities and pitfalls[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(8): 749-759.DOI:10.1080/14737159.2018.1498786.

[19] Tenover FC. Developing molecular amplification methods for rapid diagnosis of respiratory tract infections caused by bacterial pathogens[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52 Suppl 4: S338-345.DOI:10.1093/cid/cir049.

[20] Tessler M, Neumann JS, Afshinnekoo E, et al. Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6589.DOI:10.1186/s13059-017-1266-3.

[21] Schlaberg R. Microbiome Diagnostics[J]. Clin Chem, 2020, 66(1): 68-76.DOI:10.1373/clinchem.2019.303248.

[22] Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 257-271.DOI:10.1038/nrg.2016.10.

[23] van den Esker MH, Koets AP. Application of transcriptomics to enhance early diagnostics of mycobacterial infections, with an emphasis on Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis[J]. Vet Sci, 2019, 6(3):1-22.DOI:10.3390/vetsci6030059.

[24] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床微生物学检验标本的采集和转运[S]. 2018-12-11.
[25] 曹茂开, 汪美先. 科赫氏法则在现代医学中的新思考[J]. 医学与哲学, 1991, (12): 8-10. DOI: CNKI: SUN: YXZX.0.1991-12-003.
[26] 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.
[27] 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.DOI:10.3389/fcimb.2020.00088.
[28] Fan S, Wang X, Hu Y, et al. Metagenomicnext-generation sequencing of cerebrospinal fluid for the diagnosis of central nervous system infections: a multicentre prospective study[J]. bioRxiv, 2019: 658047. DOI: 10.21203/rs.2.17334/v1.
[29] Salzberg SL, Breitwieser FP, Kumar A, et al. Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2016, 3(4): e251. DOI: 10.1212/NXI.0000000000000251.
[30] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(6): 341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
[31] Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, et al. From theory to practice: translating whole-genome sequencing (wgs) into the clinic[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(12): 1035-1048. DOI:10.1016/j.tim.2018.08.004.
[32] Barzon L, Lavezzo E, Militello V, et al. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(11): 7861-7884. DOI: 10.3390/ijms12117861.
[33] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M].2 版. 北京: 科学出版社, 2017.
[34] Buckley R, Caple J. The theory and practice of training[M]. London:Kogan Page, 2009.
[35] 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.
[36] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14: 319-338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
[37] Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, et al. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the association for molecular pathology and the college of american pathologists[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(1): 4-27. DOI:10.1016/j.jmoldx.2017.11.003.
[38] 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.
[39] Flygare S, Simmon K, Miller C, et al. Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling [J]. Genome Biol, 2016, 17(1): 111. DOI: 10.1186/s13059-016-0969-1.
[40] Snyder E, Kampanya N, Lu J, et al. PATRIC: the VBI pathosystems resource integration center[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: D401-406. DOI:10.1093/nar/gkl858.
[41] Warrenfeltz S, Basenko E, Crouch K, et al. EuPathDB: The Eukaryotic pathogen genomics database resource[J]. Methods Molecul Biol (Clifton, N.J.), 2018, 1757: 69-113. DOI:10.1007/978-1-4939-7737-6_5.
[42] Pickett B, Sadat E, Zhang Y, et al. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: D593-598. DOI:10.1093/nar/gkr859.
[43] McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(7): 3348-3357. DOI:10.1128/AAC.00419-13.
[44] Jia B, Raphenya AR, Alcock B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D566-573. DOI:10.1093/nar/gkw1004.
[45] Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D517-D525. DOI:10.1093/nar/gkz935.
[46] Chen L, Zheng D, Liu B, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D694-697. DOI:10.1093/nar/gkv1239.
[47] Liu B, Zheng D, Jin Q, et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D687-692. DOI: 10.1093/nar/gky1080.
[48] 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.
[49] Charalampous T, Kay GL, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(7): 783-792. DOI:10.1038/s41587-019-0156-5.
[50] 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.
[51] Wei F, Yuc Y, Hue Z, et al. Laboratory validation of an RNA/DNA hybrid tagmentation based mNGS workflow on SARS-CoV-2 and other respiratory RNA viruses detection [J]. MedRxiv, 2020.DOI: 10.1101/2020.05.12.20099754.
[52] Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al. Diagnosis of sepsis with cell-free DNA by next-generation sequencing technology in ICU patients[J]. Arch Med Res, 2016, 47(5): 365-371. DOI:10.1016/j.arcmed.2016.08.004.
[53] 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.
[54] 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.
[55] Satta G, Atzeni A, McHugh TD. Mycobacterium

tuberculosis and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist[J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(2): 69-72. DOI:10.1016/j.cmi.2016.09.005.

[56] Sichtig H, Minogue T, Yan Y, et al. FDA-ARGOS is a database with public quality-controlled reference genomes for diagnostic use and regulatory science[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3313. DOI: 10.1038/s41467-019-11306-6.

[57] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses[J]. BMC Biol, 2014, 12: 87. DOI: 10.1186/s12915-014-0087-z.

[58] Clinical and Laboratory Standards Institute. Nucleic acid sequencing methods in diagnostic laboratory medicine; approved guideline--second Edition. MM09-A2.2014. [EB/OL] [2020-09-01]https://shop. clsi. org/media/1481/mm09a2_sample.pdf.

[59] Miller S, Naccache S N, 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.

[60] Escalona M, Rocha S, Posada D. A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(8): 459-469. DOI: 10.1038/nrg.2016.57.

[61] 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.

[62] Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists[J]. J Mol Diagn, 2017, 19(3): 341-365. DOI:10.1016/j.jmoldx.2017.01.011.

[63] 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.

[64] Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing[J]. Eur J Hum Genet, 2016, 24(10): 1515. DOI:10.1038/ejhg.2016.63.

[65] Gargis AS, Kalman L, Bick DP, et al. Good laboratory practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines[J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(7): 689-693. DOI:10.1038/nbt.3237.

[66] Kozyreva VK, Truong CL, Greninger AL, et al. Validation and implementation of clinical laboratory improvements act-compliant whole-genome sequencing in the public health microbiology laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2502-2520. DOI:10.1128/JCM.00361-17.

[67] Ayuso C, Millán JM, Mancheño M, et al. Informed consent for whole-genome sequencing studies in the clinical setting. Proposed recommendations on essential content and process[J]. Eur J Hum Genet, 2013, 21(10): 1054-1059. DOI: 10.1038/ejhg.2012.297.

[68] Goswami RS, Luthra R, Singh RR, et al. Identification of factors affecting the success of next-generation sequencing testing in solid tumors[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 145(2): 222-237. DOI:10.1093/ajcp/aqv023.

[69] Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, et al. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 256-257. DOI:10.1373/clinchem.2003.026013.

[70] 李艳, 李金明 . 个体化医疗中的临床分子诊断[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.

[71] Bharucha T, Oeser C, Balloux F, et al. STROBE-metagenomics: a STROBE extension statement to guide the reporting of metagenomics studies[J]. Lancet Infect Dis, 2020, 20(10): e251-e260. DOI: DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30199-7.

[72] Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR[J]. Nature, 1989, 339(6221): 237-238. DOI: 10.1038/339237a0.