

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

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

通信作者:王辉,Email:whuibj@163.com

【摘要】 宏基因组高通量测序技术通过对临床样本中微生物和宿主核酸的测序分析,可以无偏倚地检测多种病原微生物,正在逐渐应用于临床感染性疾病病原检测,然而业界对该技术的临床适应证、实验流程、质量管理、性能验证和报告解读等方面仍有困惑。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组织专家对上述问题进行了讨论并撰写了专家共识,对一些关键问题给出了推荐意见和处理方法,希望有益于业界的良性互动,促进该技术规范和发展,为临床抗感染诊治提供帮助。

【关键词】 宏基因组; 二代测序; 感染性疾病; 病原检测

基金项目:国家重点研发计划(2018YFE0102100);国家自然科学基金(81625014)

Chinese expert consensus on metagenomics next-generation sequencing application on pathogen detection of infectious diseases

Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Microbiology and Immunology, Society of Clinical Microbiology and Infection of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare

Corresponding author: Wang Hui, Email: whuibj@163.com.

【Abstract】 Metagenomic next-generation sequencing, the analysis of microbial and host genetic material in samples from patients, can detect pathogens unbiasedly. The emerging approach is rapidly moving to clinical laboratories for pathogen detection in infectious diseases. However, there are some problems about the clinical indications, experimental procedures, quality management, performance verification and report interpretation of the technology. Experts from the Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Laboratory Medicine, the Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Microbiology and Immunology, and the Society of Clinical Microbiology and Infection of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare discussed the above problems, wrote the expert consensus, and gave recommendations for some key issues. Hope to benefit the positive interaction of the industry, promote the technical specifications and development, and provide help for clinical anti-infection diagnosis and treatment.

【Key words】 Metagenome; Next-generation sequencing; Infectious diseases; Pathogen detection

Fund programs: National Key R&D Program of China (2018YFE0102100); National Natural Science Foundation of China (81625014)

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794

收稿日期 2020-10-26 本文编辑 武昱

引用本文: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.



感染性疾病一直备受临床关注。新型冠状病毒肺炎全球大流行,给世界经济和人类健康带来严峻挑战,更让病原的精准快速检测成为关注的热点。近年来,因物价、政策等方面的灵活性,独立实验室已广泛开展基于高通量测序(也称新一代测序技术, next-generation sequencing, NGS)的病原学检测实验^[1]。NGS 技术应用的成功案例,对部分感染性疾病的病原学诊断起到决定性作用^[2]。然而目前,临床对 NGS 应用的适应证认识不足,送检存在较大的盲目性和随意性;操作过程复杂,缺乏规范;提供检验的主体多元而检测质量良莠不齐;结果解释缺乏可信的标准,误导临床的案例屡见不鲜,限制了该技术的临床应用和普及。为提高 NGS 技术应用于感染性疾病病原诊断的质量,有效实施质量管理,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特组织专家编写制定本共识。希望本共识有益于业界的良性互动,促进该技术规范和发展,为临床抗感染诊治能力提升提供帮助。

一、共识制定过程

本共识由执笔小组撰写初稿。三个专科分会专家对推荐意见进行讨论、修改和首轮评议,再由执笔小组进行多轮修改,形成修改稿。修改稿再次提交专家组进行第二轮评议,形成终稿。

第一轮评议专家共 34 位,其中临床专业(包括感染、呼吸、重症)6 位,微生物学专业 28 位。初稿推荐共识条目共 38 条。对争议比较大的共识条目,不再推荐。细节建议讨论后纳入。

第二轮评议专家共 38 位,其中临床专业(包括感染、呼吸、重症等)20 位,微生物学专业 18 位。评议选项明确包括:同意、不同意、弃权。规则:90% 以上一致同意,则该共识描述为“建议”。70%~90% 同意,则该共识描述为“考虑”。70% 以下则不纳入共识推荐。

二、分类和术语

(一)分类

宏基因组高通量测序技术(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)通过对临床样本的 DNA 或 RNA 进行鸟枪法测序,可以无偏倚地检测多种病原微生物(包括病毒、细菌、真菌和寄生虫)。二代和三代测序平台均可用于该项技术。按从临床样本中提取的核酸类型可以分为宏基因组测序和宏转录组测序。按照测序模式可以分为单

端测序和双端测序。

(二)术语和定义

NGS:也称高通量测序,是一种可以同时对数十万到数百万条 DNA 分子序列进行读取的测序技术。

mNGS:m 指宏基因组,也称元基因组,是标本中全部生物(人、微生物)基因组的总称。mNGS 指对标本中的全部生物基因组进行 NGS 分析。在感染性疾病诊断领域中,侧重于微生物基因组的识别和分析。

诊断宏基因组学:指用于临床诊断目的的宏基因组学。该词字面含义仅指诊断,但实际上包括临床治疗、感染控制等^[3]。

临床宏基因组学:含义与诊断宏基因组学类似,但应用场景更为广泛。二者比较,专家建议用“临床宏基因组学”,因为“诊断”一词无法包括治疗、感控、流行病学等信息^[4]。

微生物组:指某一个系统、生态环境或特定区域中全部微生物的总和。生物医学领域常常是指存在于人体特定环境中全部微生物遗传物质的总和。例如,人体的肠道微生物组是人体肠道全部微生物遗传物质的总和。

试剂盒基因组:指来自核酸提取、文库制备等步骤试剂的核酸,来源如工程菌残留等,也可泛指检测过程中的核酸污染。

游离脱氧核糖核酸(cell-free DNA, cfDNA):循环中的 cfDNA 分子来源于濒死的人类细胞和定植或侵入的微生物,它们在分解时将核酸释放到血液中。

读长:测序仪单个测序反应所得到的碱基序列。读长长度指该碱基序列的碱基数。读长数量指测序获得的碱基序列的数量。检测报告中常列出某微生物种属名下的读长数,即针对该微生物种属特异性片段的数量,一般是原始序列数据经过过滤,去除了接头和低质量读长后的净读长数量。

文库:在遗传学领域特指某分子生物学技术创建/生成的若干基因片段的集合,本共识中主要指测序文库。通过文库制备步骤,可以将基因组 DNA 样本(或 cDNA 样本)转换为测序文库,然后可在测序仪器上进行测序。文库制备包括 DNA 样本的随机片段化,和为每个 DNA 片段连接 5' 和 3' 接头。

比对:指将测序的读长与参考基因组进行匹配的过程。

深度:指比对到已知参考序列的碱基平均测序次数。例如,30倍测序深度意味着基因组中的每个碱基平均被测了30次。深度越高,检出碱基的可信度越高。

覆盖率:指达到给定深度的测序碱基占整个基因组或目标区域的百分比。没有达到给定深度的部分称为盲隙(Gap)。通常同时使用覆盖率和深度描述测序结果。

相对丰度:指除去宿主序列之后,某微生物物种序列在相应大类物种(通常分成细菌、真菌、病毒、寄生虫4大类)中的分布比例。丰度越高,表示该物种所占比例越高。它只能指示同一样本中某个物种的相对的量,不能用于不同样本之间的比较。

Q值:指质量分值,用于衡量测序准确度。 $Q = -10\log_{10}P$,其中P代表该碱基被测错误的概率。如Q20表示该碱基检测错误的概率为1%。

标定对照:指检测体系中加入已知序列(一定浓度、一定序列),用以判断检测结果可信度或作为参比,是测序检测中一种特殊的阳性对照。

无模板对照:一般是以焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC,一种RNA抑制剂)处理后的去离子水(DEPC-ddH₂O)为样本,理想情况下应没有DNA或RNA模板,用以指示检测过程中的核酸污染情况。

检出限(limit of detection, LOD):指检测对象可以被某特定方法可靠地检测到的最低浓度(严格意义上是达到某概率的最低检测浓度)。

正常无菌部位:指传统微生物学观念中,正常生理情况下没有细菌或其他有活性微生物存在的人体部位,通常也称无菌部位。如血液、脑脊液、浆膜腔积液、关节液、心包积液等正常无菌体液(normally sterile body fluid, NSBF)和骨骼、肌肉、组织等部位。膀胱尿液是NSBF,清洁中段尿、胆汁不是NSBF。通常情况下腹膜透析液、羊水归为NSBF。mNGS检测时,NSBF可能会有低浓度微生物核酸检出,但没有微生物活体存在。与之相应,如体表和开放的腔道,正常情况下定植有不同种类、不同数量的微生物,称为正常有菌部位。一般来说,无菌部位标本的诊断价值优于正常有菌部位标本。

三、mNGS技术应用于感染性疾病的适应证

目前没有国家和地区(包括中国国家药品监督管理局、美国食品药品监督管理局、欧洲药品管理

局)正式批准mNGS用于临床感染性疾病的病原诊断^[5]。

因为尚无官方机构正式批准的适应证或推荐领域,所以所有mNGS结果原则上都需要其他方法验证。从临床角度,mNGS结果不能单独作为病原学确诊或排除的证据。

(一)临床适应证

共识1 对常规微生物学检查容易明确病原体的感染,如尿路感染通过尿培养手段,不建议mNGS。

共识2 患者表现为发热或发热症候群,病因未明确(符合不明原因发热定义),考虑感染或不除外感染,但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。

发热症候群包括:发热+中枢症候群、发热+呼吸道症候群、发热+腹痛和/或腹泻症候群、发热+黄疸症候群、发热+肝脾症候群、发热+女性生殖系统症候群、发热+骨关节症候群、发热+皮疹症候群和发热伴多系统表现。

肠道、体表、女性生殖道等部位有正常微生物群,检测、结果解释应慎重。

不明原因发热(fever of unknown origin, FUO)诊断标准:四分类标准参见文献[6-7],其中经典FUO参见文献[8]。

共识3 各种原因导致患者急危重症表现,不除外感染所致,或考虑继发或危及生命的严重感染,建议常规检测的同时,或在常规检测基础上,开展mNGS。

急危重症指重要脏器衰竭,甚至多器官功能衰竭,也包括脓毒性休克^[9-11]、血流感染^[12]、脑膜炎^[13-14]、重症肺炎^[15]、复杂性腹腔感染^[16]、骨髓炎和脓毒性关节炎^[17-18]、坏死性筋膜炎等皮肤软组织感染^[19-20]等临床情况。

共识4 免疫受损患者疑似继发感染,常规病原学检查未能明确致病原或/和规范性经验抗感染治疗无效,建议进一步完善常规病原学检测的同时,或在其基础上,开展mNGS。

免疫受损标准参见文献[21-23]。

共识5 疑似局部感染,病原学诊断未明确、不及时处理则后果严重(危及生命或会导致局部功能不可逆性丧失)时,考虑常规检测的同时,或在其基础上,开展mNGS。如眼部(角膜炎/溃疡、眼内炎、急性视网膜坏死等)、鼻部、耳部、喉部感染、糖尿病足、外伤累及深部组织等情况^[24-27]。

共识 6 高度疑似感染性疾病,但病原学诊断未明确且常规抗感染治疗无效,建议进一步完善常规病原学检测、处理原发感染灶(如拔去导管、外科引流或拔去引流管、玻璃体切除)、调整经验抗微生物治疗方案的同时开展 mNGS。

如肺炎临床诊断成立,经验治疗无效仍然考虑感染,或发热患者经验抗微生物药物治疗 72 h 仍发热,或明确菌血症使用敏感药物治疗 48 h 仍持续性菌血症等。

共识 7 慢性感染,或慢性疾病不排除感染,尤其是二者临床表现相似、难以鉴别时,病情严重或抗感染治疗疗效不佳需要明确病因,建议在完善常规检测、调整经验治疗的同时开展 mNGS。

如糖尿病患者足部慢性临床表现疑似感染;或膝关节移植 3 个月后出现慢性症状不排除感染。

共识 8 除以上共识 2~7 之外的患者人群,不建议无条件普遍进行 mNGS 检测;进行 mNGS 检测前请感染病学和/或临床微生物学专家会诊。

共识 9 不建议应用 mNGS 技术评估抗感染治疗效果。

(二)微生物学适应证

传统微生物病原学诊断技术依然是临床微生物学首选手段,可以进一步强化应用^[28]。mNGS 不能替代传统病原学诊断技术,但可以作为传统手段的有益补充和印证。

共识 10 针对微生物,考虑出现疑似新发病原体,或某特殊病原体^[29-32],缺乏传统技术或传统技术手段不能确定种属时,建议常规检测的同时,或在其基础上,开展 mNGS。

特殊病原体指患者所在医疗机构或地区无法检测,但其他临床证据考虑疑似相应病原体感染,或不能除外该病原体,或实验室生物安全等级不允许分离高致病病原体时。

共识 11 临床表现高度怀疑感染性疾病而多种传统技术反复检测不能明确致病微生物,但仍高度怀疑微生物所致^[33],建议继续完善更多检测技术的同时或在其基础上,开展 mNGS。

共识 12 传统病原学检测的结果不能解释临床表现的全貌或/和抗感染的反应,怀疑同时存在其他病原感染时^[34],建议进一步完善更多检测技术的同时或在其基础上,开展 mNGS。

共识 13 感染性疾病的病原体已明确或高度怀疑某病原体,临床表现提示该病原体可能具有特殊的毒力表型,需要了解其毒力因子的相关信息

时,可以考虑对感染相应临床标本进行 mNGS 物种鉴定的同时,采用 mNGS 检测毒力基因。

说明:mNGS 检测细菌、真菌毒力存在较高的假阳性和假阴性,毒力基因的解释有一定难度。采用生物信息学方法应将毒力基因定位到具体的病原体上;解释时应明确基因型和表型可能不一致。不能定位、不具备解释能力时,不应进行检测。

(三)耐药学适应证

耐药性的分子生物学检测(指 PCR 方法为主的核酸扩增技术)于 2019 年正式写入 CLSI M100 文件。mNGS 耐药性检测结果难以解释,尤其是标本来自正常情况下有微生物定植或污染的部位。

共识 14 感染发生在正常有微生物定植的部位,或检测标本采集有污染时(如支气管肺泡灌液),不建议采用 mNGS 进行耐药性检测。

共识 15 感染发生在正常无微生物定植的部位且标本采集过程污染概率低时,可以考虑采用 mNGS 进行物种鉴定的同时检测耐药基因,并通过耐药表型试验对耐药基因进行验证。对有菌种特异性的耐药性基因,在测序深度足够时,可以考虑应用 mNGS 检测获得性的耐药基因,预测耐药表型。

说明:mNGS 检测细菌、真菌耐药性基因存在较高的假阳性和假阴性,耐药基因的解释有一定难度。基因型和表型可能不一致,耐药基因不能确定来自的菌种、不具备结果解释能力时,不应进行 mNGS 检测。

(四)流行病学和感染控制学适应证

共识 16 出现某种疾病的聚集性发病或暴发^[35],怀疑是微生物导致的感染性疾病但病原不明,且常规快速检测无结果时,建议完善常规检测的同时或在其基础上开展 mNGS 明确致病微生物。

感染性疾病的暴发是临床和疾控工作的焦点。发现感染性疾病暴发时应该采取准确、快速、全面、彻底的方法以明确导致暴发的致病微生物。尤其是检出疑似烈性传染病病原体,实验室应立即汇报临床和疾控部门,实现快速诊断和及时隔离。快速诊断是患者处置、隔离和综合感控措施的基础、前提和决定性因素。

共识 17 感染性疾病患者有特殊区域(如北美地区有某些致病性真菌)旅居史,或有特殊职业工作史(如畜牧业、屠宰业、水产业等^[36]),感染病原未明,建议常规手段检测的同时开展 mNGS。

四、mNGS 的基本流程和管理要求

临床微生物实验室 mNGS 的基本流程包括标本采集、运送、核酸提取和富集、建库测序和生物信息分析来鉴定感染的病原体。

(一) 标本采集

共识 18 从正常无菌部位采集 mNGS 检测标本, 应严格无菌操作, 避免污染; 从有菌定植或污染部位采集的标本, 应采取必要措施, 尽量减少污染; 用于宏基因组 RNA 测序的标本, 应添加核酸稳定剂。mNGS 标本的运送须防污染、防震荡、冷链快速运送; 标本如不能及时检测, 应保存于低于 -70°C 冰箱或液氮(血液标本应分离血浆后保存)。建议的常用临床标本采集要求和相关说明见表 1。

如果临床标本提取的 DNA 初始浓度低(尤其是用去宿主核酸提取方法), 建库时可能需要扩增, 这会造成污染被放大。因此用于 mNGS 检测的标本一定要严格无菌操作。当 mNGS 检测应用于有菌部位标本(如呼吸道标本、粪便等)时, 微生物菌群会使测序结果对病原体的解释更加困难。如果标本中宿主细胞含量高, 在测序数据量恒定(如 20M 读长)的条件下, 核酸提取如不去宿主, 会造成测序结果大部分来自人基因组, 而病原微生物基因组序列相对较少。

标本转运装置的类型、贮存时间和温度影响核酸的数量和完整性。许多转运装置存在微生物

DNA, 会导致 mNGS 检测假阳性和背景污染物的引入。因此, 应使用无菌、无核酸容器收集和运送标本, 同时尽可能冷链运送, 缩短运送时间, 送检新鲜标本。

(二) DNA/RNA 提取

共识 19 建议实验室的核酸提取流程、病原体核酸提取试剂盒应经过验证; 高宿主背景标本提取时应采用经过验证的方法去除宿主细胞或核酸; 整个提取过程必须有防污染措施, 包括阴性对照和阳性对照等。

DNA/RNA 提取方法是导致 mNGS 结果差异的一个重要因素。核酸提取方法中的一些细节会影响 mNGS 结果, 包括离心、纯化、DNA 消化、核糖体 RNA (ribosomal ribonucleic acid, rRNA) 去除、RNA 或 DNA 分离以及随机扩增等。

核酸提取试剂盒至关重要。不同试剂盒对不同病原体的提取效能不同, 例如有些试剂盒适合提取病毒, 但提取真菌的效能差。因此, 必须对选取的病原体核酸提取试剂盒进行验证, 包括革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、病毒、寄生虫等核酸提取效能的验证, 避免病原体的漏检。

mNGS 的局限之一是标本高背景导致检测灵敏度降低。高背景主要来自人类宿主(例如, 组织活检标本)或微生物菌群(例如, 呼吸道标本、粪便等)。一些感染中的病原体载量可能非常低($< 10^3$ 拷贝/ml), 例如, 腹泻患者粪便中的志贺菌载量

表 1 mNGS 常用临床标本的相关说明

标本类型	要求	说明
全血	成人 3~5 ml; 婴幼儿 1 ml; 专用采血管(进行检验的微生物学实验室提供; 即游离 DNA 样本保存管, 内由 EDTA 和保护剂组成, 可抑制血浆中核酸酶及有核细胞中 DNA 的释放)	采集后充分混匀。在运输过程中避免剧烈晃动
正常无菌部位体液(胸腔积液、腹腔积液、关节液、脑脊液等)	胸腔积液 10 ml 以上; 脑脊液 1 ml 以上。房水 200 μl 以上。骨髓 0.5 ml 以上。专用采血管(预期标本可能凝集)或无菌冻存管	采集第 2 管脑脊液。胸腔积液需富集后提核酸。避免经引流管采集
组织	尽可能采集病灶边缘, 病变与正常交界的组织	
脓肿	开放性: 清创后采集深部或溃疡基底分泌物; 体积尽量多。封闭性: 彻底消毒后抽取脓液; 体积 3 ml 以上	
支气管肺泡灌洗液	弃去前段可能污染的部分, 收集后段 10 ml 置塑料或玻璃管	污染程度比痰液低
痰	如果为自然咳痰, 生理盐水漱口 2~3 次, 然后用力咳深部痰 3~5 ml	一般而言须医护人员监督下完成
粪便	3~5 ml, 新鲜	有大量正常菌群, 结果解释有难度, 须谨慎送检

注: 临床对标本采集环节负责。所有类型标本, 如果有不确定因素, 采集前请和微生物学实验室沟通; 采集时须注意无菌操作。须注意避免采集标本导致感染扩散。有 RNA 测序需求时, 须采集第 2 管。所用标本容器须事先得到实验室确认。无渗漏、有螺纹盖可以拧紧、封口膜密封、条码标记或编号。非血液标本: 在 24 h 内可以送达实验室并开始检测, 可以用冰袋低温保存。24~72 h 内送达, 则应干冰保存运输, 并立刻进行标本前处理和核酸提取。长期保存原则: (1) DNA 测序 -20°C 保存不超过 7 d; (2) RNA 测序应置 -80°C ; (3) 避免标本反复冻融, 一般不得超过 3 次; (4) 理论上 -80°C 可长期保存。怀疑高致病性或新发、突发传染病, 须按国际“通用生物安全标本转运要求”包装及转运要求。尽可能在生物安全条件下提取核酸后再运送

或虫媒传播发热性疾病的患者血浆中寨卡病毒的载量^[37-38]。对于这些患者的感染性标本,如果存在高背景,当测序深度不变时,会漏检致病病原。因此,对于高宿主背景的标本,须在提取的过程中去除宿主细胞或核酸。

部分污染可能来自核酸提取试剂盒,即“试剂盒基因组”^[39]。为了确保内部的有效性和可重复性,并确定潜在污染,应将所有提取和测序过程的室内质量控制作为标准操作程序的一部分。阳性对照通常加入 DNA 或 RNA,例如合成核酸标准品如 Sequins^[40];阴性对照通常是空白样品(例如预期不含微生物基因组的人源核酸),或者理想情况下是相似或相同的基质(组织、体液等),根据患者因素和测试结果,这些基质预期不含微生物基因组。进行临床宏基因组学检测的实验室检测必须纳入外部控制系统,如外部质量保证/能力验证。

(三)建库和测序

共识 20 建议采用经过验证的流程进行建库和测序;建库慎用各种扩增方法,因为扩增会使正常菌群或污染病原体的序列扩大,难以判断真正病原体;测序原始数据应进行质控,并且过滤掉低复杂度、低质量的序列,确保测序原始数据的质量。

大部分 mNGS 建库过程需要进行扩增。不同物种的克隆扩增效率不同,这会导致背景污染的物种读长数变得很高,mNGS 结果判断更加困难。

不同的宏基因组测序平台可能会产生不同类型的读长,例如,单端和双端、短读长(50~300 bp)和长读长(>1 000 bp)。测序平台的错误率不同,错误读取碱基的概率不同,从 Illumina 测序仪的小于 0.01% 到 Oxford nanopore 测序仪的 5%~10%(截至 2020 年 2 月)^[41]。此外,测序仪在处理具有大的均聚物重复序列、富含 GC、结构重复以及基因组其他复杂区域的样本时,往往会错误地读取碱基。因此,报告物种组成时需考虑结果的假阳性和假阴性。

RNA 的文库制备比 DNA 更耗时,但在某些情况下,RNA 测序比 DNA 测序更有益。首先,如果仅提取 DNA,则 RNA 病毒无法检测到^[42]。其次,进行总 RNA 提取/测序可捕获 DNA 和 RNA 的表达,并且 mRNA 序列可翻译成蛋白质。氨基酸序列比核苷酸序列更保守,因此可产生更明确的分类信息^[43-44]。

(四)生物信息学分析

共识 21 建议生物信息学分析流程应进行性

能确认和验证,包括数据库的优化、比对方法和比对参数的优化等,确保准确报告致病病原体。

不同实验室或商业公司会采用不同生物信息学分析流程,应清楚描述所使用的生物信息学方法,包括软件名称、版本、主要命令等。

典型的生物信息学流程从原始输入 fastq 文件开始,系列分析步骤包括低质量和低复杂度序列过滤、去除接头、去除宿主序列、与参考数据库比对进行微生物鉴定,可选做序列组装、耐药基因和毒力基因鉴定等。仔细评估生物信息学分析流程中的每个步骤,以确保数据处理的准确性和完整性。生物信息学分析流程必须经过性能确认和验证,包括将对照和患者数据集进行分析和比较,并通过常规临床测试来确定最终结果的准确性^[44],目前尚缺乏标准。

五、mNGS 应用于感染性疾病病原诊断的质量管理保证

目前,尚无国家药品监督管理局批准的用于感染性疾病检测的 mNGS 试剂盒。因此,每个临床实验室必须验证实验室开发的测试系统,包括核酸提取、文库制备、测序和分析流程,各组件的任何更改都须重新确认。

mNGS 检测的质量控制对于确保性能准确至关重要。由于 mNGS 是复杂的多步骤测试,因此需要多个质量控制指标,包括样品对照、外部对照、内部对照、文库质量指标、测序质量指标和污染对照。实验室可以采用可接受的标准来定义每个参数,以确保样品质量和运行质量,并保证在样品处理中不发生错误。

mNGS 污染、结果解释、用于分析的数据库及根据测序数据预测药敏等问题,仍存在挑战。每个样本添加已知序列和已知浓度的内部样本质控;每一批包含两种外部样本质控:阴性质控或环境质控(缓冲液)、阳性质控[已知浓度的革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、病毒(可选)、寄生虫(可选),如表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和烟曲霉]。

(一)特殊病原体的 DNA/RNA 提取技术要求

共识 22 建议病毒核酸提取应保证病毒核酸的完整性;对于细胞壁较厚的病原体应采取常规方法以外的破壁方法。

病毒 mNGS 诊断的关键问题是在提取过程中保持病毒核酸的完整性,并利用临床上有重要意义的病毒提取方法。对于一些细胞壁比较厚的病原(如分枝杆菌、真菌等)^[45],常规核酸提取方法难以

保证核酸提取的质量,因此需要使用一些特殊的破壁方法,并标准化。

(二)标本采集、DNA/RNA 提取、建库引入的实验室污染问题

共识 23 污染既包括标本采集、核酸提取、建库测序引入的污染,也包括生物信息学分析引入的污染;建议实验室自建有效的防污染策略,包括使用背景微生物库的方法。

采用 mNGS 进行感染性疾病诊断最大的瓶颈是污染导致假阳性。“污染”来源包括实验室试剂或环境中检测到的背景微生物和正常人体菌群,以及生物信息分析或数据库错误(例如错误注释),这些错误均可能导致物种识别错误。在样品收集、核酸提取、文库制备和混样过程中引入的少量外源 DNA 或 RNA 都能从污染的读长中产生可检测的信号。此外,实验室物品表面、耗材和试剂可能均含 DNA。因此,mNGS 检测的复杂性要求人员训练有素,样品处理过程格外小心,以避免操作错误和交叉污染。

对于任何进行分子分析的实验室而言,污染的风险始终存在。实验室应通过合理的布局、环境洁净度控制、质量控制、单向工作流程和严格的去污染方案来减少风险。实验室可能需要 mNGS 的专用空间,以最大程度减少污染。但许多临床实验室因空间狭小而无法建立 mNGS 检测专区。

可有效避免因污染而误读 mNGS 结果的策略包括:(1)根据临床微生物专家和临床医生的指导添加解释性注释;(2)使用替代方法确认由 mNGS 新鉴定的物种;(3)实施污染监测策略,例如专用的污染参考数据库;(4)由经验丰富的实验室主任和专科医师主持的实时电话会议(临床微生物测序委员会),结合临床实际与主管医师讨论检测结果^[13]。

(三)测序深度对结果的影响

共识 24 建议实验室验证不同标本、不同感染类型病原体检测所需的测序深度。

实验过程中测序深度不同主要是测序平台的通量不同和上机的均一性决定。不同标本的测序深度需求,主要是由不同的标本的宿主背景比例、微生物多样性决定,其次是不同测序平台和测序成本的影响^[45-47]。测序深度对低丰度物种鉴定、对测序数据可信度均有影响^[45]。测序深度影响 mNGS 的敏感性。尽管 mNGS 比涂片或培养更敏感,但大多数情况下,它不如靶向核酸扩增灵敏,部分原因是因为检测过程中对大量人类 DNA/RNA 进行测序

和去除。分析灵敏性也可能因病原体而异^[48]。影响 mNGS 敏感性的其他因素包括标本采集的时机、标本稳定性和来源及方法学变量,如提取方法、文库制备和数据分析^[48-49]。去除宿主核酸有利于提高用于感染性疾病病原体检测的 mNGS 灵敏度^[50],但去除宿主核酸同时,也会损失一部分病原体核酸。

(四)生物信息学分析结果中疑似背景微生物对病原诊断结果的影响

共识 25 建议实验室建立自己的背景微生物数据库以控制假阳性结果。

分析前、分析中和分析后的每个阶段,mNGS 检测的特异性都会受到影响。在 mNGS 的技术性能中,阴性对照和基因组覆盖对照能帮助从试剂或实验室中鉴定外源 DNA。在某些平台上,一些序列可能会被错误拆分(即索引跳变,index hopping),如在分析过程中不加以控制和过滤,会导致假阳性结果^[51]。在数据分析和序列比对期间还会出现其他问题,包括分类错误、数据库错误以及鉴定非源自患者样品的 DNA。

尽管在验证过程中可以通过适当的控制来解决分析特异性问题,但更大的关注点在于 mNGS 测试的临床特异性,如检测的序列与患者当前的疾病过程符合程度,不同宿主间病原体核酸的半衰期或潜伏期,报告阳性结果的阈值及不同的疾病过程或宿主的阈值差异等。

检测中需建立背景数据库,包含 mNGS 数据中可检测到的正常菌群或实验室污染引起的背景微生物^[4]。如背景库中微生物具有临床意义,报告时需更高的报告阈值,而这个阈值需要通过验证获得。

(五)病原诊断阈值的设定

共识 26 考虑建立 mNGS 的诊断阈值以排除背景微生物的干扰、改善检测结果的准确性。

实验室应基于自己的 mNGS 流程,针对不同感染类型,设定不同病原体的诊断阈值来发放报告。

建立阈值区分真阳性与实验过程中污染的微生物,且这些阈值包含度量标准,例如与检测到的微生物比对上的读长数、标准化为百万分之一的读长数、外部无模板对照样本或内部添加物质的读长数、覆盖非重叠基因组区域的数量及相对于阴性对照样本的临床样本中的读长丰度(以避免报告污染物种)。ROC 曲线分析是确定已知结果的临床样本训练集的最佳阈值的有用工具,并使用独立的验证

集验证预先设定的阈值^[14]。大多数验证研究使用残留冷冻样本,而不是前瞻性采集的新鲜样本,这限制了对样本稳定性和时间变异性的评估。不同标本类型、不同病原体的诊断阈值可能不同,实验室应建立常见标本类型、常见病原体的诊断阈值。

(六)数据库对病原学诊断结果的影响

共识 27 建议实验室验证自建的数据库中物种的准确性,过滤数据库错误和不正确的序列,并定期更新数据库。实验室应尽最大可能完善病毒、真菌和寄生虫数据库,提高鉴定的敏感性和准确性。

小型精简数据库或严格标准数据库可能不包括新的或少见物种,从而导致假阴性结果。未精简数据库或宽松标准数据库也可能会错误鉴定物种。目前,各实验室或商业公司的数据库都是自建,缺乏标准化。标本污染或不完整(如基因组中包含重要突变的不完整区域)产生的序列是参考数据库的常见错误特征,尤其是包括基因组草图时。如超过 1 000 个已发表的微生物基因组序列已鉴定为被 phiX174 污染——phiX174 是一种在 Illumina 测序中用作对照的噬菌体^[52]; 2 250 个 NCBI GenBank 细菌和古细菌草图基因组含有虚假的人类序列^[53]。假阴性也可能是数据库中缺少某物种所致。

真菌和寄生虫拥有庞大基因组,可与人类宿主序列相混淆,并且可能低滴度存在于临床标本中,给 mNGS 带来挑战。目前临床上重要的真菌和寄生虫物种的数据库有限,这更给 mNGS 分析带来困难。

微生物参考基因组的公共数据库不断更新,实验室除处理潜在的错误注释和其他数据库错误外,还需定期更新数据库。尽管公共数据库(如 NCBI 的核苷酸数据库)更多、更完整,但是它比经过精选的序列有限的数据库[例如 FDA-ARGOS^[54]或 FDA 参考病毒数据库(RVDB)^[55]]包含的错误也更多。整合多个数据库的注释序列可提高微生物鉴定的敏感性和特异性。

六、mNGS 应用于感染性疾病病原诊断的性能验证和标准化

mNGS 检测微生物的性能、有效性和临床意义是亟待解决的问题。可采用“代表性物种”方法,使用单个物种作为检测该类别中其他病原体(如 DNA 病毒、RNA 病毒、革兰阴性菌、革兰阳性菌、酵母菌和丝状真菌)的代表^[14],以期对相似病原体具有指示作用。实验室应不断扩大所检测物种的清

单,建立能可靠进行 mNGS 分析测试和报告的病原谱。

共识 28 对 mNGS 整个检测和分析流程进行性能验证是其应用于临床的瓶颈,建议对感染性疾病常见的“代表性”物种进行检出限、包容性、抗干扰、精密度、携带和交叉污染、稳定性等的验证。

检出限提供对特定靶标分析灵敏度的度量,是指可以准确测序并与阴性样品区分开的最低浓度靶标,且在 ≥95% 的重复样品中具有一致的检测能力。

包容性或分析反应性:指验证能够特异性检测病原体之间潜在的遗传变异以及耐药性和毒力标记的能力。包容性验证应使用培养的微生物。在某些情况下,可以使用预先提取和已知浓度的核酸,如稀有物种、不可培养物种、BSL3 和 BSL4 物种等。评估中使用的靶标浓度应在设备的 LOD 处或附近。如 mNGS 检测并鉴定了肠沙门菌,建议在特定 LOD 或临界值附近进行检测,证明该方法可检测到所有常规报告的血清型。当菌株不可获得时,可通过对靶序列进行计算机分析来完成验证。

干扰物质验证:应该对临床标本中可能影响测序的干扰物质进行评估。临床标本的潜在干扰来源包括外源性物质(即药物、抗凝剂等)和内源性物质(即蛋白质、脂质、血红蛋白、胆红素等)。同时,应全面评估由测序仪引入的潜在干扰,包括预处理或洗涤过程中残留的化学物质。对未知序列应该验证:宿主背景的干扰;存在靶标污染物或其他微生物的干扰;不存在靶标时发生的交叉反应(非致病菌群、邻近物种);PCR 抑制剂的干扰。

精密度:当重复测试同一样本并引入多个变量时,应评估设备的可重复性。如可在多个地点使用仪器,并由不同的操作人员在不同的日期运行仪器,以评估可重复性。评估还应确定多种试剂批次对设备性能变化的影响以及对最终结果可能产生的影响。同样,在固定条件下多次分析标准物质时,应评估可重复性。

应评估残留污染的影响,包括样品制备和文库制备,其中将已知的阳性样本(目标浓度高)和阴性样本交替使用。应计算并报告以前运行的携带污染率。

其他验证:根据设备的预期用途、标本类型和研究设计,可能需要进行下列内容验证,包括矩阵等效性、新鲜和冷冻试剂稳定性、混合感染中评估含多个物种的标本。

七、mNGS 应用于感染性疾病的报告解读

共识 29 解读报告考虑如下参数:测序质量(是否去除低复杂度、低质量序列, Q20、Q30 等)、读长、特异性读长、覆盖率、深度、丰度、微生物序列的数据量、阈值等。

共识 30 mNGS 检测报告中,建议结合不同标本类型与检出病原微生物的种类进行解读,区分无菌部位(血、无菌体液、组织、骨髓等)与正常有菌部位(如呼吸道、尿液、开放性伤口)。确认致病微生物时,应考虑检出微生物是否为感染部位的潜在病原。如脑脊液检出新型隐球菌,呼吸道标本检出结核分枝杆菌、腺病毒、流感病毒,关节液或血液标本检出布鲁菌属,均可认为是致病微生物。注意排除常见定植菌、污染菌与工程菌的影响。

共识 31 血浆样本对 cfDNA 进行 mNGS 检测时,建议从临床的角度鉴别检出序列属于致病微生物、样本污染、死亡微生物裂解,还是定植菌群所致的一过性菌血症。

mNGS 检测中,来自环境、检测试剂的细菌、病毒、真菌的序列也将混杂其中,深度测序时会将其信息放大。对于检测结果中出现的罕见致病报道的环境中微生物,应首先考虑污染所致^[56]。注意识别检测报告给出的常见定植菌、污染菌与检测试剂中工程菌^[48, 50]。

实际工作中, mNGS 报告常见定植菌或污染菌,与检测标本类型、采集方式、检测环境有关,可依据传统微生物学中基础知识初步判断。工程菌则与检测环节所用的试剂有关,如果某一批检测样本的报告出现少见的微生物,应注意检测过程中空白对照的检出情况。mNGS 检测的目标是核酸,而非存活的病原微生物。DNA 在体内需要一定时间降解,可能存在病原微生物已死亡而 mNGS 给出阳性结果,应注意甄别^[57]。

共识 32 mNGS 报告中常规容易培养的病原菌,建议临床医师结合传统方法,综合判断其临床价值。

对于常规容易培养的病原菌,如革兰阳性菌中的葡萄球菌属、肠球菌,革兰阴性菌中的肠杆菌目、非发酵菌等,传统的培养方法能给出较好的结果,并非 mNGS 的优势所在^[1, 58]。

共识 33 建议对于在核酸提取过程中破壁困难的微生物,如分枝杆菌属、诺卡菌属、真菌(主要包括曲霉菌、毛霉菌、隐球菌属与双相真菌)等,即使在检测报告中读长数较低,也要考虑其为致病微

生物的可能,并采用其他方法验证,如特异引物的 PCR 或一代测序等分子生物学检测, G 试验, GM 试验, 曲霉菌 IgG 抗体或隐球菌荚膜多糖抗原等血清学试验。

对于上述核酸提取较为困难的微生物,应注意 mNGS 提供的线索,进一步确认与排除^[14, 29, 48, 56, 59]。

共识 34 采用 mNGS 进行病原微生物鉴定的同时,可以考虑检测耐药基因,但需要将耐药基因准确定位到具体的病原体上以明确其临床价值。即通过对 mNGS 测得序列进行具体病原体基因组组装之后,确定耐药基因位于哪个病原体上,位于质粒上还是位于染色体上。

目前,对原始样本直接检测耐药基因指导临床使用抗微生物药物,还存在很多疑问,对于正常有菌部位样本,将耐药基因与特定病原微生物准确匹配存在较多困难。对于生长缓慢,而其耐药基因型与表型有良好相关性的病原菌,可对纯菌落进行全基因组测序(whole genome sequencing, WGS),推测耐药情况。如克拉霉素是治疗脓肿分枝杆菌重要的抗微生物药物,但是表型药敏实验非常复杂耗时, WGS 检测脓肿分枝杆菌 *erm*(41) 与 *rhl* 基因点突变,可准确预测耐药情况^[60]。对于结核分枝杆菌, WGS 可以预测异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、氧氟沙星的耐药状况,具有很好的特异性^[60-63]。如果待检样本仅有单一病原微生物检出,且读长较多,或者多种微生物存在,但是测序长度较长(如采用 nanopore 测序),耐药基因与微生物之间匹配,也可间接推测其耐药情况。

共识 35 mNGS 对于新发或少见病原微生物的检出具有重要价值。建议解读报告前应了解比对数据库的内容,明确其是否涵盖少见病原或新发病原。检出高致病性病原微生物,应及时与临床联系。

mNGS 的优点之一是能够诊断出少见的感染微生物。从公共卫生的角度来看, mNGS 检测可以提供新出现或重新出现的高致病病原体的证据,检出不常见病原体可以报告给公共卫生机构,公共卫生机构可以协助进行后续的确证测试。

对于新发病原,如新型冠状病毒, mNGS 以较快速度明确了病原,为下一步的检测、诊断、治疗、疫苗制备提供了条件^[64]。对于少见病原,如鼠疫耶尔森菌、双相真菌(如马尔尼菲蓝状菌、荚膜组织胞浆菌、球孢子菌等)、耶氏肺孢子菌、钩端螺旋体、以及各种寄生虫(如阿米巴原虫、疟原虫)引起的感

染;或原始样本中数量较少的病原,如脑脊液中的诺卡菌属、曲霉菌属、结核分枝杆菌,临床实验室常缺乏有效的检测手段,需要 mNGS 的结果提供线索作为参考。当然也必须与临床症状有明确相关性,方可考虑为致病微生物^[13, 50, 56, 64]。

共识 36 mNGS 结果为阴性,对于排除感染常具有较好的阴性预测值。但对于某些病原微生物,如结核分枝杆菌等,原始样本中含量较少,或核酸提取困难的病原微生物,应考虑 mNGS 检测灵敏度较低,阴性预测性差,并不一定优于 PCR 等常规检测方案。

准确的 mNGS 阴性结果可能表明感染的可能性较低,因此有可能作为“排除”实验(虽然也可能需要其他检测,例如血清学检测)。未检测到病原体核酸序列,多数情况下可以排除感染微生物的存在,但是对于感染病原微生物数量少或核酸提取困难的微生物,判断应谨慎^[9, 57, 65-66]。对于呼吸道样本, mNGS 对于结核分枝杆菌的检出率并不优于 GeneXpert,而对于脑脊液等无菌部位样本, mNGS 常有较好的表现^[29, 67-68]。例如:对于脑脊液模拟样本, mNGS 对不同的病原微生物 LOD:巨细胞病毒(9.4 拷贝数/ml), HIV-1(100.8 拷贝数/ml),肺炎克雷伯菌(8.7 CFU/ml),无乳链球菌(8.9 CFU/ml),新型隐球菌(0.01 CFU/ml),黑曲霉菌(130 CFU/ml),弓形虫(55 个/ml)^[48]。各检测实验室可以确定自己检测的 LOD。mNGS 依然需要与传统方法(包括培养、PCR、血清学实验)结合才能更准确地诊断^[48], Wilson 等^[13]研究表明 mNGS 对脑脊液检测阴性的脑膜炎或脑炎患者,有 18 例是通过血清学实验明确诊断。

共识 37 建立 mNGS 病原诊断的阈值影响因素较多,包括测序平台、测序流程、标本类型、病原种类、患者状况,目前尚无统一公认的阈值,建议各实验室建立自己的阈值,并在临床工作中加以验证。

对于无菌部位样本,检出微生物核酸序列可能有较大临床价值,但应排除污染菌、工程菌、cfDNA、检测流程等干扰^[69]。对于正常有菌部位的样本,情况要复杂得多,除了病原微生物的种类外,还要综合考虑宿主的因素。实验室可根据自己条件建立阈值。如:Wilson 等^[13]对脑脊液的 mNGS 研究中,对于病毒(DNA 或 RNA 病毒),检出读长应至少覆盖全基因组的 3 个非重叠区域,判断为阳性;对于细菌、真菌与寄生虫, RPM(指每百万序列的特

异性读长比率, RPM=RPM 脑脊液/RPM 非模板对照)≥10,判断为阳性。Miao 等^[1]将 mNGS 检出真菌(种水平)的读长数是其余真菌的 5 倍以上,判断为阳性; mNGS 只要检测到 1 条属水平的结核分枝杆菌复合群读长,即判断为阳性^[70]。

共识 38 不同病原微生物读长对结果判断的影响:同等条件下(相同微生物,相同标本),如某一微生物检出的读长数量多,为致病微生物的可能性大。但是,不同病原微生物基因组大小不同(寄生虫>真菌>细菌>病毒),核酸提取效率存在差异[难易程度:病毒<革兰阴性菌<革兰阳性菌(不包括分枝杆菌、需氧放线菌等)<真菌],致病力也相去甚远,因此不能仅仅依靠读长多少来判断是否感染,建议同时考虑病原微生物种类差异与致病特性^[71-72]。

共识 39 mNGS 病原微生物检测结果,建议由具有一定生物信息学知识,并从事临床感染或临床微生物等专业人员,结合患者临床背景、影像学资料、其他的实验室检查结果,综合判断。不加以正确解读与甄别,盲目依据 mNGS 报告开展治疗,必将导致抗微生物药物的滥用^[71-73]。

临床感染病原学诊断是具有挑战性的工作^[56-57, 65]。mNGS 仅检测样本中的核酸(包括 DNA 与 RNA),是否反映患者真实感染状况,需要将检测结果与临床情况结合,核对甄别。mNGS 技术检测的是核酸,不能简单将核酸等同于病原微生物。血浆 cfDNA 的 mNGS 检出结果,仅有 50% 与临床相关^[57]。

综上,本文对 mNGS 技术应用于感染性疾病病原检测的质量管理进行了推荐,并给出了推荐强度。因为该技术可对部分病例的病原诊断产生决定性影响,现实中又存在种种问题^[74-75],所以需要确保该技术的检验质量,并需要进行持续性评估。在评估结果明朗、中国国家药品监督管理局正式批准应用之前,理性、有节制、可信地应用该技术始终是一个挑战。既有的专家共识^[71-73]和本专家共识将有益于业界对该技术的恰当应用。

执笔:陈宏斌(北京大学人民医院检验科),宁永忠(清华大学附属垂杨柳医院检验科),鲁炳怀(中日友好医院呼吸与危重症医学科),尹玉瑶(北京大学人民医院检验科)

编写组成员(按姓名拼音顺序)

阿祥仁(青海省人民医院检验科),安友仲(北京大学人民医院重症医学科),曹彬(中日友好医院呼吸与危重症医学科),曹敬荣(首都医科大学宣武医院检验科),陈佰义(中国医科大学附属第一医院感染科),陈宏斌(北京大学人民医

院检验科),陈天艳(西安交通大学第一附属医院感染性疾病科),褚卓(中国医科大学附属第一医院检验科),戴二黑(石家庄市第五医院检验科),戴媛媛(中国科学技术大学附属第一医院检验科),杜鸿(苏州大学附属第二医院检验科),杜艳(昆明医科大学第一附属医院医学检验科),高燕(北京大学人民医院感染科),耿燕(西安交通大学第二附属医院检验科),公衍文(山东大学第二医院检验医学中心),谷丽(首都医科大学北京朝阳医院感染和临床微生物科),顾兵(徐州医科大学附属医院检验科),胡必杰(复旦大学附属中山医院感染科),胡继红(国家卫生健康委临床检验中心微生物室),胡志东(天津医科大学总医院检验科),贾伟(宁夏医科大学总医院医学实验中心),李敏(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科),李轶(河南省人民医院检验科),廖康(中山大学附属第一医院检验科),刘家云(空军军医大学第一附属医院检验科),刘根焰(南京医科大学第一附属医院检验学部),刘洪英(河北省人民医院感染性疾病科),刘文恩(中南大学湘雅医院检验科),刘学东(青岛市市立医院呼吸与危重症医学科),鲁炳怀(中日友好医院呼吸与危重症医学科),吕火焯(浙江省人民医院检验中心),马筱玲(中国科学技术大学附属第一医院检验科),穆红(天津市第一中心医院检验科),倪语星(上海交通大学医学院附属瑞金医院临床微生物科、医院感染控制管理科),宁永忠(清华大学附属垂杨柳医院检验科),邱海波(东南大学附属中大医院重症医学科),尚游(华中科技大学同济医学院附属协和医院重症医学科),余丹阳(解放军总医院呼吸与危重症医学科),孙宏莉(中国医学科学院北京协和医院检验科),孙世俊(北京大学人民医院检验科),陶传敏(四川大学华西医院实验医学科),单斌(昆明医科大学第一附属医院检验科),王辉(北京大学人民医院检验科),王明贵(复旦大学附属华山医院抗生素研究所),王世富(山东大学齐鲁儿童医院临床微生物科),王一民(中日友好医院呼吸与危重症医学科),魏莲花(甘肃省人民医院检验科、甘肃省临床检验中心),吴文娟(同济大学附属东方医院医学检验科),伍勇(中南大学湘雅三院检验科),许建成(吉林大学第一医院检验科),许兰平(北京大学人民医院血液病研究所),杨青(浙江大学医学院附属第一医院检验科),杨志宁(山西省心血管病医院检验科),姚开虎(首都医科大学附属北京儿童医院微生物研究室),尹玉瑶(北京大学人民医院检验科),余方友(同济大学附属上海市肺科医院检验科),余跃天(上海交通大学医学院附属仁济医院重症医学科),俞云松(浙江大学医学院附属邵逸夫医院感染科),张静(复旦大学附属中山医院呼吸内科),张文宏(复旦大学附属华山医院感染科),赵彩彦(河北医科大学第三医院感染科),赵鸿(北京大学第一医院感染疾病科),赵建宏(河北医科大学第二医院检验科),郑美琴(温州医科大学附属眼视光医院检验科),周宏伟(南方医科大学珠江医院检验医学部),朱镛(山西省儿童医院临检中心),卓超(广州医科大学附属第一医院检验科)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 中国医学科学院北京协和医院杜斌教授为本文提出的建议

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(25): 2408-2417. DOI: 10.1056/NEJMoa1401268.
- [3] Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics [J]. *Expert Rev MolDiagn*, 2018, 18(7): 605-615. DOI: 10.1080/14737159.2018.1487292.
- [4] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6): 341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
- [5] Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention[J]. *J Biotechnol*, 2017, 243:16-24. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.03.035.
- [6] Durack DT, Street AC. Fever of unknown origin--reexamined and redefined[J]. *Curr Clin Top Infect Dis*, 1991, 11:35-51.
- [7] Wright WF, Auwaerter PG. Fever and fever of unknown origin: review, recent advances, and lingering dogma[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2020, 7(5):ofaa132. DOI: 10.1093/ofid/ofaa132.
- [8] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 发热待查诊治专家共识[J]. *中华传染病杂志*, 2017, 35(11):641-655. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2017.11.001.
- [9] 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.
- [10] Anh NT, Hong N, Nhu L, et al. Viruses in vietnamese patients presenting with community-acquired sepsis of unknown cause[J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(9). DOI: 10.1128/JCM.00386-19.
- [11] Crawford E, Kamm J, Miller S, et al. Investigating transfusion-related sepsis using culture-independent metagenomic sequencing[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(5): 1179-1185. DOI: 10.1093/cid/ciz960.
- [12] Greninger AL, Naccache SN. Metagenomics to assist in the diagnosis of bloodstream infection[J]. *J Appl Lab Med*, 2019, 3(4):643-653. DOI: 10.1373/jalm.2018.026120.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Li H, Gao H, Meng H, et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 205. DOI: 10.3389/

- fcimb.2018.00205.
- [16] Wu SC, Rau CS, Liu HT, et al. Metagenome analysis as a tool to study bacterial infection associated with acute surgical abdomen[J]. *J Clin Med*, 2018, 7(10): 346. DOI: 10.3390/jcm7100346.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Jiang H, Zhang X, Li L, et al. Identification of *Austwickiacheloniae* as cause of cutaneous granuloma in endangered crocodile lizards using metataxonomics[J]. *Peer J*, 2019, 7:e6574. DOI: 10.7717/peerj.6574.
- [21] Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host[J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(3): e44-e100. DOI:10.1093/cid/cit684.
- [22] Ramirez JA, Musher DM, Evans SE, et al. Treatment of community-acquired pneumonia in immunocompromised adults: a consensus statement regarding initial strategies. *Chest*, 2020, 158(5): 1896-1911. DOI:10.1016/j.chest.2020.05.598.
- [23] Young BA, Hanson KE, Gomez CA. Molecular diagnostic advances in transplant infectious diseases[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2019, 21(12): 52. DOI: 10.1007/s11908-019-0704-7.
- [24] Doan T, Wilson MR, Crawford ED, et al. Illuminating uveitis: metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens[J]. *Genome Med*, 2016, 8(1):90. DOI: 10.1186/s13073-016-0377-x.
- [25] Li Z, Breitwieser FP, Lu J, et al. Identifying corneal infections in formalin-fixed specimens using next generation sequencing[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(1):280-288. DOI: 10.1167/iovs.17-21617.
- [26] Gallon P, Parekh M, Ferrari S, et al. Metagenomics in ophthalmology: Hypothesis or real prospective? [J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2019, 23:e00355. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00355.
- [27] Borroni D, Romano V, Kaye SB, et al. Metagenomics in ophthalmology: current findings and future perspectives [J]. *BMJ Open Ophthalmol*, 2019, 4(1): e000248. DOI: 10.1136/bmjophth-2018-000248.
- [28] Abayasekara LM, Perera J, Chandrasekharan V, et al. Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1):631. DOI: 10.1186/s12879-017-2727-8.
- [29] Shi CL, Han P, Tang PJ, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. *J Infect*, 2020, 81(4): 567-574. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.08.004.
- [30] Chen H, Fan C, Gao H, et al. Leishmaniasis diagnosis via metagenomic next-generation sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 528884. DOI: 10.3389/fcimb.2020.528884.
- [31] Wu J, Wu Y, Huang M. Metagenomic next-generation sequencing helped diagnose scrub typhus without eschar: A case report[J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 90:1-4. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.10.020.
- [32] Zhang WW, Hu YB, He GX, et al. Rat bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis* infection in a Chinese patient [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 637. DOI: 10.1186/s12879-019-4281-z.
- [33] Dai Y, Chen L, Chang W, et al. Culture-negative streptococcus suis infection diagnosed by metagenomic next-generation sequencing[J]. *Front Public Health*, 2019, 7:379. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00379.
- [34] Wang J, Han Y, Feng J. Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 252. DOI: 10.1186/s12890-019-1022-4.
- [35] Loman NJ, Constantinidou C, Christner M, et al. A culture-independent sequence-based metagenomics approach to the investigation of an outbreak of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O104:H4[J]. *JAMA*, 2013, 309(14):1502-1510. DOI: 10.1001/jama.2013.3231.
- [36] ThiKhaTu N, Thi Thu Hong N, Thi Han Ny N, et al. The virome of acute respiratory diseases in individuals at risk of zoonotic infections[J]. *Viruses*, 2020, 12(9): 960. DOI: 10.3390/v12090960.
- [37] DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, et al. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission[J]. *J Infect Dis*, 1989, 159(6): 1126-1128. DOI: 10.1093/infdis/159.6.1126.
- [38] Corman VM, Rasche A, Baronti C, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus[J]. *Bull World Health Organ*, 2016, 94(12): 880-892. DOI: 10.2471/BLT.16.175950.
- [39] 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.
- [40] Hardwick SA, Chen WY, Wong T, et al. Synthetic microbe communities provide internal reference standards for metagenome sequencing and analysis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):3096. DOI: 10.1038/s41467-018-05555-0.
- [41] Minervini CF, Cumbo C, Orsini P, et al. Nanopore sequencing in blood diseases: a wide range of opportunities[J]. *Front Genet*, 2020, 11:76. DOI: 10.3389/fgene.2020.00076.
- [42] Chen H, Yin Y, Gao H, et al. Clinical utility of in-house metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of lower respiratory tract infections and analysis of the host immune response[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(Suppl4): S416-S426. DOI: 10.1093/cid/ciaa1516.
- [43] Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases[J]. *New Engl J Med*, 2008, 358(10): 991-998. DOI: 10.1056/NEJMoa073785.

- [44] Feng H, Shuda M, Chang Y, et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma[J]. *Science*, 2008, 319(5866): 1096-1100. DOI: 10.1126/science.1152586.
- [45] Sims D, Sudbery I, Iltott NE, et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(2):121-132. DOI: 10.1038/nrg3642.
- [46] Clark MJ, Chen R, Lam HY, et al. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(10): 908-914. DOI: 10.1038/nbt.1975.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] Illumina. Effects of index misassignment on multiplexing and downstream analysis[EB/OL]. [2020-10-20]. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/whitepapers/index-hopping-white-paper-770-2017-004.pdf>.
- [52] Equator Network. Equator (enhancing the quality and transparency of health research) Network home page[EB/OL].[2020-01-01]. <https://www.equator-network.org/>.
- [53] Breitwieser FP, Perteza 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.
- [54] 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.
- [55] Goodacre N, Aljanahi A, Nandakumar S, et al. A reference viral database (RVDB) to enhance bioinformatics analysis of high-throughput sequencing for novel virus detection [J]. *mSphere*, 2018, 3(2): e00069-18. DOI: 10.1128/mSphereDirect.00069-18.
- [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] Lee RA, Al Dhaheri F, Pollock NR, et al. Assessment of the clinical utility of plasma metagenomic next-generation sequencing in a pediatric hospital population[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(7): e00419-20. DOI: 10.1128/JCM.00419-20.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] Lipworth S, Hough N, Leach L, et al. Whole-genome sequencing for predicting clarithromycin resistance in mycobacterium abscessus[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(1): e01204-18. DOI: 10.1128/AAC.01204-18.
- [61] Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(10):1193-1202. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00062-6.
- [62] Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(1):2-22. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.11.012.
- [63] Enkirch T, Werngren J, Groenheit R, et al. Systematic review of whole-genome sequencing data to predict phenotypic drug resistance and susceptibility in swedish mycobacterium tuberculosis isolates, 2016 to 2018[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(5): e02550-19. DOI: 10.1128/AAC.02550-19.
- [64] Ai JW, Zhang Y, Zhang HC, et al. Era of molecular diagnosis for pathogen identification of unexplained pneumonia, lessons to be learned[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1):597-600. DOI: 10.1080/22221751.2020.1738905.
- [65] 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.
- [66] O'Grady J. A powerful, non-invasive test to rule out infection[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 554-555. DOI: 10.1038/s41564-019-0424-7.
- [67] Niles DT, Wijetunge D, Palazzi DL, et al. Plasma metagenomic next-generation sequencing assay for identifying pathogens: a retrospective review of test utilization in a large children's hospital[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(11): 400794-20. DOI: 10.1128/JCM.00794-20.
- [68] Fan S, Ren H, Wei Y, et al. Next-generation sequencing of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of neurobrucellosis[J]. *Int J Infect Dis*, 2018, 67:20-24. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.11.028.
- [69] van Ingen J, Kohl TA, Kranzer K, et al. Global outbreak of severe mycobacterium chimaera disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(10): 1033-1041. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30324-9.
- [70] Langelier C, Zinter MS, Kalantar K, et al. Metagenomic sequencing detects respiratory pathogens in hematopoietic cellular transplant patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(4): 524-528. DOI: 10.1164/

- rccm.201706-1097LE.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] 刘婷, 石华, 刘芳, 等. 宏基因组测序技术在新生儿感染性疾病病原体检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(6): 609-613. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200304-00172.
- [75] 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.

附: 2021 年继续教育单项选择题(三)

1. 下列关于 mNGS 的描述, 错误的是()
- A. 宏基因组高通量测序技术的英文是 metagenomic next-generation sequencing, 缩写是 mNGS
- B. 其中 m 指宏基因组, 也称元基因组, 是标本中全部生物(人、微生物)基因组的总称
- C. mNGS 指对标本中的部分生物基因组进行 NGS 分析
- D. 在感染性疾病诊断领域中, mNGS 侧重于微生物基因组的识别和分析。
2. 关于 mNGS 适应证, 耐药性检测描述正确的是()
- A. 感染发生在正常有微生物定植的部位, 不建议采用 mNGS 进行耐药性检测。
- B. 一律进行 mNGS, 和表型检测互相印证
- C. 任何情况下都不能进行耐药性检测, 因为结果无法解释
- D. 对有菌种特异性的耐药性基因, 在测序深度足够时, 也不能考虑应用 mNGS 检测获得性耐药基因
3. 关于 mNGS 下列表述错误的是()
- A. mNGS 整个实验流程需要防污染
- B. mNGS 敏感性高于 qPCR
- C. 测序深度影响病原鉴定的敏感性
- D. 对于高宿主背景的样本应去除宿主核酸后测序
4. 关于 mNGS 检测临床样本, 下列说法正确的是()
- A. 测序报告中最多读长数的微生物, 为致病微生物
- B. 下呼吸道感染时, mNGS 在肺泡灌洗液中未检出结核分枝杆菌序列, 可以排除肺结核
- C. 怀疑血流感染时, 采用血浆进行 mNGS, 若检出多种微生物的序列, 应考虑样本在采集过程中污染所致
- D. 肺组织样本经 mNGS 检出新型隐球菌的序列, 可考虑其为致病菌, 必要时采用隐球菌荚膜多糖抗原实验验证
5. 深部咳痰样本, mNGS 检出下列哪一种病原的读长时, 应高度怀疑为致病微生物()
- A. 巨细胞病毒
- B. 马尔尼菲篮状菌
- C. 白念珠菌
- D. 鲍曼不动杆菌

【编后】 经全国继续医学教育委员会批准, 本刊开设继教专栏, 全年选择 10 篇文章作为继教文章, 文后附 5 道单选题, 读者阅读后可扫描标签二维码答题, 每篇可免费获得 II 类继教学分 0.5 分, 全年最多可获 5 分。