



中华人民共和国团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序 实验室检测技术规范

Technical specification for laboratory detection of targeted Next-Generation
Sequencing of pathogenic microorganisms in respiratory infection

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2024年07月12日)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国医药卫生文化协会 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 技术应用	3
6 实验原理	5
7 实验室分区、仪器设备及试剂	5
8 性能确认	6
9 检验前过程	9
10 检验过程	9
11 检验后过程	11
12 室间质评	13
附录 A（资料性） 呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序申请单模板	14
附录 B（资料性） 呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序检测报告模板	15
参考文献	16

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国医药卫生文化协会提出。

本文件由中国医药卫生文化协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

随着新发和再发病原微生物的出现、耐药问题日趋严重以及免疫功能低下人群的增加，感染性疾病仍是威胁人类健康的主要疾病之一。呼吸道感染性疾病是临床常见疾病类型，可分为上呼吸道感染和下呼吸道感染。上呼吸道感染主要累及鼻腔、咽/喉部等，而下呼吸道感染多为喉以下的气管支气管感染及肺部感染。病原微生物的快速检测和准确诊断是感染性疾病有效治疗的重要前提。传统的病原学检测手段主要包括形态学、微生物培养和鉴定、免疫学等方法，但仍有许多局限性，分子诊断技术，特别是二代测序（Next-Generation Sequencing, NGS）技术的迅猛发展，极大推动了感染性疾病的精准诊治。

靶向二代测序（targeted Next-Generation Sequencing, tNGS）是一种通过多重PCR特异扩增富集靶标核酸，再进行二代测序、生物信息学分析和结果解读，检测标本中特定靶标核酸的技术。在病原学检测领域，病原微生物tNGS技术可以一次性检测标本中特定的几十至几百种已知病原微生物及其毒力基因和/或耐药基因。tNGS的灵敏度受宿主核酸含量影响较小，可实现DNA和RNA共检测，性价比高，可应用于多个场景。

目前市场上已有多家医疗卫生机构提供病原微生物tNGS检测服务。不同机构的术语定义、检测流程和检测性能等均存在差异，造成报告单解读和临床应用困难。目前尚未有相关的政策或标准来规范检测流程，因此迫切需要制订规范的技术要求及标准。鉴于此，国内多位具有丰富临床、检验和产业经验的专家学者共同参与，参考国内外标准、指南与专家共识，结合tNGS检测技术特点，就病原微生物tNGS技术要求和操作规范达成共识，指导和规范tNGS在呼吸系统感染病原微生物检测中的应用。

呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序实验室检测技术规范

1 范围

本文件规定了采用靶向二代测序进行呼吸系统临床标本病原微生物检测（包括检验前、检验中和检验后）的方法和程序，以及性能确认和质量控制等。

本文件适用于采用靶向二代测序进行呼吸系统临床标本病原微生物检测的医疗卫生机构。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 22576.1—2018 医学实验室 质量和能力的要求 第1部分：通用要求

GB/T 29791.1—2013 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第1部分：术语、定义和通用要求

GB/T 39367.1—2020 体外诊断检验系统 病原微生物检测和鉴定用核酸定性体外检验程序 第1部分：通用要求、术语和定义

GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程

WS/T 640—2018 临床微生物学检验样本标本的采集和转运

WS/T 805—2022 临床微生物检验基本技术标准

WS/T 812—2022 病原微生物菌（毒）种国家标准株评价技术标准

3 术语和定义

GB/T 29791.1—2013、GB/T 39367.1—2020界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

呼吸系统感染 respiratory system infection

呼吸系统感染是由病毒、细菌、真菌、寄生虫、支原体、衣原体等病原微生物引起的呼吸系统的感染。

注：可分为上呼吸道感染与下呼吸道感染。上呼吸道感染包括普通感冒、流行性感冒、鼻炎、扁桃体炎、咽喉炎等，是人类最常见的传染病之一，其中70%~80%由病毒引起；下呼吸道感染指的是肺组织或者喉以下的气管支气管发生的感染，常来自口腔和上呼吸道病毒或细菌等微生物向下呼吸道蔓延引起，感染微生物种类复杂，细菌、病毒、非典型病原体、真菌等都会引起下呼吸道感染。

3.2

病原微生物 pathogenic microorganisms

可以侵犯人引起其感染甚至传染病的微生物。

注：包括病毒、细菌、真菌、寄生虫、支原体、衣原体等。

[来源：WS/T 812—2022，3.1，参考并修改]

3.3

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

体外扩增DNA的酶促反应过程。

[来源：GB/T 39367.1—2020，3.41]

3.4

多重聚合酶链式反应 multiplex polymerase chain reaction

使用多对引物进行的PCR反应。

[来源：GB/T 39367.1—2020，3.28]

3.5

二代测序 next-generation sequencing

又称高通量测序 (high-throughput sequencing)，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通常一次性产生数千条至数百万条测序片段。

[来源：GB/T 30989—2014，3.19，参考并修改]

3.6

靶向二代测序 targeted next-generation sequencing

一种通过多重PCR (3.3) 特异扩增或探针捕获等方法富集靶标核酸，再进行二代测序 (3.4)、生物信息学分析和结果解读，检测标本中特定靶标核酸的技术。

3.7

测序文库 sequencing library

连有相应接头的，且长度和接头序列都适于测序仪进行处理的一系列DNA片段。

注：上机测序之前，将待测DNA分子连上特定的检测接头序列的过程，即测序文库构建。

3.8

碱基识别质量 quality of base calling

评价碱基准确识别的概率。简称为Q，通常以数值表示，定义： $Q = -10 \lg P$ 。

注1：碱基识别质量值与碱基识别错误率负相关，二者遵循对数函数关系。

注2：碱基识别质量值越高，错误率越低。如Q20指测序数据中，碱基识别质量值为20的碱基识别准确率为99%，或错误率为1%；Q30指测序数据中，碱基识别质量值为30的碱基识别准确率为99.9%，或错误率为0.1%。

[来源：GB/T 30989—2014，3.29，参考并修改]

3.9

序列数 reads

匹配到该病原微生物 (3.2) 基因组的序列数目。

注：其多少与标本中病原微生物本身载量负荷、微生物基因组规模、核酸提取量等有关。Reads数越高，表示标本中检测到该病原微生物的可信度越高。

3.10

引物 primer

在DNA复制过程中，结合于模板链上并作为复制延伸的起始位点和/或终止位点的，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

[来源：GB/T 30989—2014，3.11]

3.11

扩增子 amplicon

由目标扩增反应产生的核酸产物。

[来源：GB/T 39367.1—2020，3.1]

3.12

内参 internal control

内标，在同一反应管中与靶序列共同扩增的一段非靶序列分子。

注：设置内参的目的是鉴别仪器故障、试剂因素、聚合酶活性因素或标本中存在抑制物等造成的结果不理想的原因。

[来源：美国食品药品监督管理局指南草案《Infectious Disease Next Generation Sequencing Based Diagnostic Devices: Microbial Identification and Detection of Antimicrobial Resistance and Virulence Markers》。]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BALF：支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid)

cDNA：互补脱氧核糖核酸 (Complementary DNA)

CRAB：耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 (Carbapenem resistant Acinetobacter baumannii)

CRE：耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌 (Carbapenem resistant Enterobacterales)

CRPA：耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌 (Carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa)

DNA：脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

DTT：二硫苏糖醇 (Dithiothreitol)

mNGS: 宏基因组二代测序 (Metagenomics Next-generation sequencing)
 MRSA: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin resistant Staphylococcus aureus)
 NGS: 二代测序 (Next-generation sequencing)
 PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)
 RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)
 tNGS: 靶向二代测序 (Targeted next-generation sequencing)

5 技术应用

5.1 应用场景

怀疑呼吸系统感染的患者，若经传统病原学检测无法明确诊断或者抗感染治疗疗效不佳（病情无明显缓解、完全无缓解或者病情恶化），可能存在混合感染、传统病原学检测范围以外的病原体或者某些病原微生物产生耐药时（耐药基因需在tNGS检测范围内）建议送检呼吸道tNGS。

怀疑上呼吸道感染者建议送检上呼吸道感染tNGS，怀疑下呼吸道感染患者建议送检下呼吸道感染tNGS，最终是否送检由临床医生根据患者病情需要来决定。

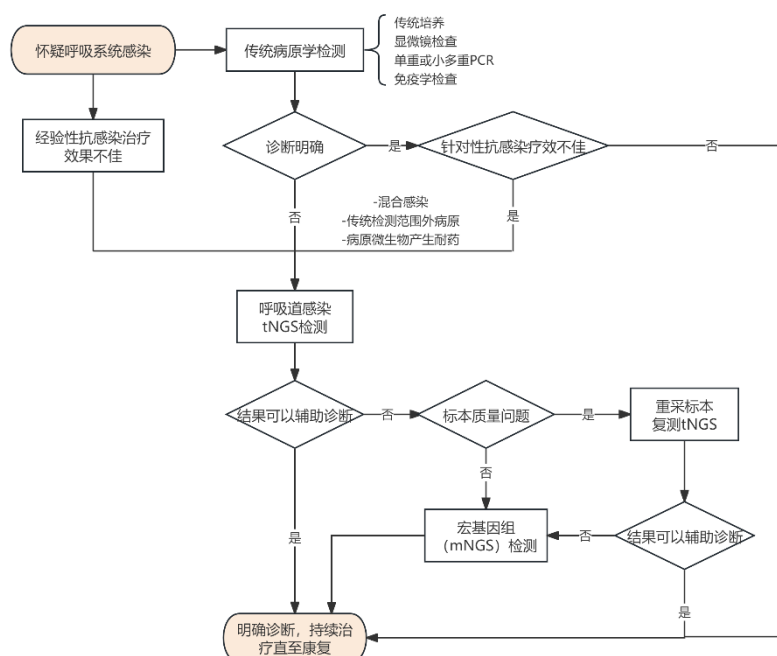


图1 呼吸道感染 tNGS 检测应用场景

5.2 检测范围

5.2.1 上呼吸道感染建议纳入病原微生物

参考国内外专家共识及最新的流行病学调查数据，上呼吸道感染tNSG检测建议至少纳入的较常见病原微生物见表1。

表1 上呼吸道感染 tNGS 检测建议至少纳入的较常见病原微生物

分类	上呼吸道感染tNGS检测建议至少纳入的较常见病原微生物 ^a
病毒	呼吸道合胞病毒、流行性感冒病毒（至少包含甲型、乙型）、鼻病毒、副流感病毒（包含1至4型）、腺病毒、冠状病毒（至少包含新型冠状病毒、冠状病毒229E、冠状病毒HKU1、冠状病毒NL63、冠状病毒OC43）、博卡病毒、偏肺病毒、肠道病毒
细菌 ^b	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌、百日咳鲍特菌、化脓链球菌
非典型病原体	肺炎支原体、肺炎衣原体
耐药基因	与肺炎支原体、百日咳鲍特菌相关的大环内酯类耐药基因

分类	上呼吸道感染tNGS检测建议至少纳入的较常见病原微生物 ^a
	<p>注1：上、下呼吸道标本均适宜于肺炎支原体、肺炎衣原体的核酸扩增检测，但下呼吸道标本的结果相对更具病原学诊断价值。</p> <p>注2：由于不同文献资料中病原微生物名称有差异，表1主要参考《人间传染的病原微生物目录（2023版）》、《临床微生物学手册（第12版）》进行了相应的命名。</p>
	<p>^a 本表所给出的病原微生物已结合文献报道等进行了严格筛选，考虑到临床医学诊断技术的发展，疾病谱和病原谱可能发生变迁，本文件使用者宜根据实际情况进行调整。</p> <p>^b 上呼吸道标本通常不推荐用于细菌核酸扩增检测，本表给出的细菌类型已结合文献报道进行了严格筛选（如百日咳鲍特菌主要感染鼻咽部，因此鼻咽拭子适宜用于百日咳核酸扩增检测）。考虑到分子检测无法判断定植与感染，本文件使用者宜结合检测结果、患者临床症状、影像学特征等信息进行综合判断。</p>

5.2.2 下呼吸道感染建议纳入病原微生物和耐药基因

参考国内外专家共识及最新的流行病学调查数据，下呼吸道感染tNGS检测建议至少纳入的较常见病原微生物和耐药基因见表2。

表2 下呼吸道感染 tNGS 检测建议至少纳入的较常见病原微生物和耐药基因

分类	下呼吸道感染tNGS检测建议至少纳入的较常见病原微生物和耐药基因
病毒	呼吸道合胞病毒、流行性感冒病毒（至少包含甲型、乙型）、鼻病毒、副流感病毒（包含1至4型）、腺病毒、偏肺病毒、冠状病毒（至少包含新型冠状病毒、冠状病毒229E、冠状病毒HKU1、冠状病毒NL63、冠状病毒OC43）、博卡病毒、肠道病毒、疱疹病毒（至少包含EB病毒、巨细胞病毒）
细菌	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、阴沟肠杆菌、结核分枝杆菌复合群、化脓链球菌、嗜肺军团菌、百日咳鲍特菌、诺卡菌属、鸟分枝杆菌复合群（胞内分枝杆菌等）、脓肿分枝杆菌、偶发分枝杆菌、戈登分枝杆菌
真菌	念珠菌属、曲霉属、毛霉属、根霉属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌、马尔尼菲篮状菌
非典型病原体	肺炎支原体、肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体
耐药基因	与肺炎支原体、百日咳鲍特菌相关的大环内酯类耐药基因，与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌（CRE）、耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌（CRAB）和耐碳青霉烯铜绿假单胞菌（CRPA）等有关的耐药基因
	<p>注1：由于不同文献资料中病原微生物命名有差异，表2主要参考《人间传染的病原微生物目录（2023版）》、《临床微生物学手册（第12版）》进行了相应的命名。</p> <p>注2：抗菌药物的不合理使用导致的细菌耐药已成为影响人类健康的主要威胁之一，避免抗菌药物不合理使用、遏制细菌耐药的关键在于感染性疾病病原微生物的早期、快速、精准诊断。耐药基因检测能够早期、快速识别耐药基因突变位点。但目前尚缺乏足够的循证医学证据来说明tNGS检测耐药基因能够直接影响临床用药决策，本文件给出的耐药基因检测范围仅供参考。</p>

5.3 标本选择

5.3.1 基本要求

选择标本应考虑感染症状、患者免疫状态、患者疾病严重程度、接受有创检查的风险、流行病学、可疑病原微生物的特性、播散能力和受累的器官及感染部位等多方面因素。

5.3.2 上呼吸道感染

上呼吸道感染tNGS检测可采集标本主要包括口咽拭子、鼻咽拭子、鼻咽吸取物等。为提高病原微生物检出率，建议鼻咽拭子与口咽拭子各采集一根放到同一个采集管中，有助于提升病原载量。

5.3.3 下呼吸道感染

下呼吸道感染tNGS检测可采集标本包括支气管肺泡灌洗液（BALF）、痰液、气管吸取物等。

注1：相较于痰标本具有黏稠、不均匀以及易被口咽部定植菌影响的短板，更推荐BALF作为下呼吸道感染的检测标本。

注2：收集BALF需进行有创的纤维支气管镜检查，应考虑患者耐受情况，咳痰、诱导痰或经上呼吸道吸痰标本可作为一种替代标本，但痰液质量需合格，合格的痰液标本应是来自下呼吸道，不混入唾液、鼻咽分泌物、食物、漱口水等。有条件的实验室建议进行显微镜下检查：合格痰标本应鳞状上皮细胞<10个/低倍镜视野，白细胞>25个/低倍视野，或白细胞：鳞状上皮细胞>2.5。

5.3.4 采样耗材

采样耗材要求如下：

- a) 标本采集容器应首选经国家行政部门批准的商业化采样管。采样管应使用带有螺旋盖的无菌包装、耐低温、耐伽马射线辐照、不易碎裂的医疗级聚丙烯等塑料容器。采集深咳痰液时宜使用宽口容器；
- b) 采样液应首选经国家行政部门批准的商业化病毒采样液，因标本用于核酸检测等分子生物学检测和研究，可选择含裂解液或含培养基采样液；
- c) 采样拭子应使用商品化无菌拭子，拭子头材质为合成纤维，不宜使用医用棉签等天然棉纤维拭子，以免干扰后续检测结果。拭子杆应光滑无毛刺，杆上设有断点，全杆长度 15cm±1cm。拭子应经无菌处理，且无灭菌成分残留。采样时应选用对应的鼻咽拭子或口咽拭子，以免对采样部位造成损伤。

6 实验原理

tNGS检测技术流程包括标本处理、核酸提取、文库构建、二代测序、生物信息分析等。核酸提取先通过裂解使样品中的核酸游离在裂解体系中，再通过纯化使核酸与裂解体系中的其他成分（如蛋白质、多糖、脂类和有机溶剂等）彻底分离。文库构建将待测序的核酸片段制备成两端连有接头、中间有短序列标签结构的标签文库，集合成为基因文库，然后对基因文库进行大规模平行扩增得到含有待测核酸样品的测序文库。最后对测序文库进行二代测序与生物信息分析。结果解读将测序序列比对到的病原微生物结果结合患者临床信息进行分析，生成结果报告。

7 实验室分区、仪器设备及试剂

7.1 实验室分区原则

tNGS检测技术具有灵敏度高的特点，易发生交叉污染，实验室应采取适当的预防措施，最大限度降低交叉污染导致假阳性结果的风险。可根据不同工作内容划分独立区域，并设置明显标识，各区所用的器材（如移液器和吸头）不可混用，工作流程和空气流向按照单一方向进行。基因扩增检验实验室各工作区域的设置、进入方向及气流控制等要求见《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》。

tNGS实验室分区可分为：试剂准备区、样品处理区、文库构建区、上机测序区等。

7.2 仪器设备及试剂

7.2.1 试剂准备区

- a) 仪器设备：
 - 医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；
 - 超净工作台；
 - 微量移液器；
 - 微型掌上离心机；
 - 旋涡混匀器。
- b) 试剂：
 - 以下提到的试剂均需试剂准备区长期保存。

7.2.2 样品处理区

- a) 仪器设备：
 - 医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；
 - 旋涡混匀器；
 - 生物安全柜（II级或III级）；
 - 微量移液器；
 - 微型掌上离心机；
 - 冷冻离心机（最大离心力 12000 g 以上）；

破碎仪（匀浆仪、均质器）；

自动核酸提取仪；

干式恒温器。

b) 试剂：

液化试剂；

注：根据采取的液化方法选择对应的液化试剂，如二硫苏糖醇（DTT）法选用试剂DTT，NaOH法选用NaOH。核酸提取试剂。

7.2.3 文库构建区

a) 仪器设备：

医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；

生物安全柜（II级或III级）；

PCR仪；

自动纯化仪；

微型掌上离心机；

旋涡混匀器；

微量移液器。

b) 试剂：

文库制备试剂；

注：试剂盒内至少应包含cDNA合成引物、一链合成酶、PCR预混液、文库扩增预混液、纯化磁珠等。靶向扩增试剂；

注1：引物设计时根据目标病原微生物核酸序列，从公共数据库中选择已收录的病原微生物高质量基因组或基因序列，进行数据库构建及清洗。

注2：根据常用于鉴定病原微生物的靶标基因，包括但不限于功能区域、保守区域、多拷贝区域或经过生物信息评估过的其他特异性区域。基于其基因序列特性，采用同源方式或种间特异性方式进行引物设计。

PCR产物纯化试剂。

7.2.4 上机测序区

a) 仪器设备：

医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；

生物安全柜（II级或III级）；

二代测序仪；

服务器；

微型掌上离心机；

旋涡混匀器；

微量移液器；

荧光定量仪；

全自动核酸蛋白分析仪；

酶标仪。

b) 试剂：

二代测序试剂。

注：试剂盒内至少应包含测序引物、高效测序反应酶、缓冲液。

8 性能确认

8.1 方案选择

临床实验室可以根据实际检验方法、预期目标等因素选择性能验证方案或性能确认方案。性能验证是指按照检测试剂盒或检测系统说明书使用时，能复现厂家宣称检测性能。性能确认是在检测研发时最早建立的性能特征。目前tNGS推荐性能确认方案。

注1：性能验证指通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定，适用范围有配套检测系统、固定组合的检测系统、标准方法的检测方法，由临床实验室独立完成，目的是满足厂商声明或预期用途。

注2：性能确认指通过提供客观证据证明给定项目满足规定的要求，适用范围是非标准方法、实验室开发的方法、超出预定范围使用的标准方法和修改过的确认方法（自建检测系统）的检测方法，可以由厂商、方法的研究和开发者或临床实验室完成，目的是满足检验预期用途的特定要求。

8.2 性能验证

按照相关标准、制造商说明书或作业指导书规定的方法对实验方法进行验证。tNGS（定性检测）选择验证的性能指标宜包括方法符合率、检出限、抗干扰能力、交叉反应、方法符合率和检出限等。

8.3 性能确认时机

8.3.1 仪器在投入使用前应通过性能确认。影响检测性能的关键检测设备（如提取仪、PCR仪、二代测序仪）搬迁、仪器故障维修后、仪器更新升级，应重新进行确认，其他辅助设备可不进行重新确认（如离心机、生物安全柜等）。

8.3.2 试剂方案和检测方案在投入使用前应通过性能确认。包括但不限于核酸提取试剂、PCR产物纯化试剂、文库构建试剂、二代测序试剂等全流程所用到的试剂。更换试剂品牌或型号前，应重新进行确认。

8.3.3 生物信息分析流程投入使用前应通过性能确认。包括但不限于数据库建立和更新、生物信息分析流程建立和变动后。

8.4 性能确认参数

建议实验室tNGS检测系统应对精密度、准确度、最低检测限、分析特异性、稳定性确认、临床准确性评估等性能参数进行确认。

8.5 生物信息分析流程的性能确认

8.5.1 实验室可选择商业化的自动分析系统，或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。

8.5.2 对重要指标进行必要的性能确认（最低测序数据量、准确率、召回率、精确率和F1-Score等），以保证对病原微生物检测的准确性。

8.5.3 以使用临床标本tNGS全流程检测后得到的测序数据进行确认为宜。

8.6 参考品制备

实验室可自制参考品进行确认，可在明确阴性的临床标本中加入梯度稀释的临床阳性标本或病原体培养物（如病毒、细菌、真菌、非典型病原体等）制备模拟阳性样品，标准微生物菌株可以选用ATCC或CMCC菌株等，建议使用5种~10种病原微生物（包括G-菌、G+菌、真菌、DNA病毒、RNA病毒、支原体/衣原体）确认检测的准确度等，本标准根据内部tNGS病原检出率，推荐参考品建议纳入的病原微生物至少覆盖呼吸道常见病原微生物检出率的80%~90%，见表3。

表3 参考品建议纳入的病原微生物

分类	参考品建议纳入的病原微生物
细菌G-	流感嗜血杆菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、百日咳鲍特菌、嗜肺军团菌、卡他莫拉菌、嗜麦芽窄食单胞菌等
细菌G+	肺炎链球菌、结核分枝杆菌复合群、金黄色葡萄球菌、非结核分枝杆菌（胞内分枝杆菌）、诺卡菌属（圣乔治诺卡菌）等
DNA病毒	疱疹病毒（单纯疱疹病毒1型、EB病毒、巨细胞病毒）、博卡病毒、腺病毒等
RNA病毒	鼻病毒、呼吸道合胞病毒、冠状病毒（新型冠状病毒、冠状病毒229E）、流行性感冒病毒（至少包含甲型、乙型）、偏肺病毒、肠道病毒、副流感病毒等
真菌	新型隐球菌、念珠菌属（白念珠菌、热带念珠菌）、曲霉属（烟曲霉、黄曲霉）、马尔尼菲篮状菌、耶氏肺孢子菌等
支原体/衣原体	肺炎支原体、肺炎衣原体等

8.7 全流程性能确认

8.7.1 精密度

- a) 重复精密度：对同一批样品在同一条件下（相同的环境、操作人员及仪器）应至少进行 3 次以上检测，评价重复精密度。
- b) 再现性精密度：以及不同日间、不同操作者、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。
- c) 可选择高、低 2 个不同梯度的参考品（接近检测限）进行确认，精密度应 >90%。

8.7.2 准确度

可选择以下两种不同类型的标本来进行准确度确认（需要具有统计学意义，建议至少 59 例样品）：

- a) 使用临床标本：选择呼吸道临床标本（BALF、鼻咽拭子、痰液等），可选取阴性标本、阳性标本（宜包含弱阳性/低扩增的标本，并尽可能覆盖检测范围内常见病原微生物），比较 tNGS 与参比方法之间的差异，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，一致率应 >90%。

注：所选临床标本应经过参比方法（如培养）的确认，参比方法可以为金标准方法、行业公认方法、经验证性能符合要求满足临床预期用途的方法等。

- b) 使用参考品进行确认时，浓度范围应覆盖高（10 倍 LoD 浓度）、中（3 倍 LoD 浓度）、低（LoD 浓度），一致率应 >90%。

8.7.3 最低检出限（LoD）

应选择含有代表物种的混合参考品（定值标准物质），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。如果是 20 次检测，必须检出至少 18 次靶核酸（90% 以上）。

实验室应建立不同标本类型、不同代表物种（如 G- 菌选鲍曼不动杆菌，G+ 菌选择金黄色葡萄球菌等）的 LoD。

8.7.4 分析特异性

可通过以下措施进行分析特异性确认：

- a) 交叉反应：验证与检测对象核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状的病原微生物核酸是否会产生影响，宜在病原微生物感染的医学决定水平进行验证，如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌、白念珠菌和热带念珠菌。将两对微生物分别按照 1: 1、3: 1、1: 3 的浓度比例进行混合后测序，应至少重复检测 3 次。比值与理论值需相差两倍以内。
- b) 抗干扰能力：tNGS 潜在干扰物包括内源性物质（如宿主细胞、血液、粘液等）、外源性药物（如用于缓解淤血、鼻噪、刺激或哮喘和过敏症状的鼻腔和咽喉药物等）、消毒剂等。痰标本应增加黏蛋白对结果干扰程度的评估。实验组为在弱阳性标本中加入干扰物溶液（接近临床真值的干扰物浓度，对照组加入等量的溶剂），与常规标本一样处理，应至少重复测定 3 次以上。符合率应 ≥90%。
- c) 对核酸提取浓度、文库浓度、片段大小和分布、Q30、簇密度、簇通过率等进行规定。

8.7.5 稳定性确认

8.7.5.1.1 标本稳定性：将弱阳性标本和阴性标本在常温、4℃、-20℃和-80℃分别保存 0、4、7 天之后进行检测。

8.7.5.1.2 试剂稳定性：参考试剂说明书要求，将同批次试剂组份反复冻融、长期保存到试剂说明书声称的次数或时间，之后对弱阳性标本和阴性标本进行检测。

8.7.5.1.3 可接受标准：符合率 ≥90%。

8.7.6 临床准确性评估

8.7.6.1.1 阴性符合率：检测临床已证实为阴性的标本不少于 150 例，不宜采用健康人采集的标本。

8.7.6.1.2 阳性符合率：检测临床标本，检出 tNGS 检测范围内细菌（包括分枝杆菌、非典型病原体）、真菌和病毒每类病原体阳性标本例数不少于 50 例。

8.7.6.1.3 参比方法：综合培养、PCR、影像学等多种方法，临床病例最终病原学诊断结果为依据计算阴性符合率和阳性符合率。

8.7.6.1.4 可接受标准：符合率 $\geq 90\%$ 。

9 检验前过程

9.1 标本采集、保存与转运

9.1.1 基本要求

采集过程中应尽可能减少其他污染并及时送检。标本的采集、保存与转运应按WS/T 640相关要求进行操作，以避免因标本采集或转运不合适，导致检测结果假阳性或假阴性。

9.1.2 采样时机

标本采集尽量抗生素使用前、病症明显时采集，无菌操作。

9.1.3 标本信息

向第三方检测机构送检标本应附有填写完整的检测申请单，医院检验科等可以通过申请单或院内查询等方式获得下列信息（包括但不限于以下信息）：受检者姓名、年龄、性别、送检医院、标本类型、标本采集时间、标本送检时间、临床初步诊断、重点关注病原微生物、近期抗感染治疗方案等，申请单参考模板见附录A。

9.1.4 标本转运

标本转运要求如下：

- a) 标本采集后，应减少运送环节，在规定时间内运达实验室，并尽可能缩短转运时间。
- b) 宜冷藏或冷冻保存（ -70°C 以下最佳，避免反复冻融）。

9.2 检验前过程室内质控

检验前过程室内质控涉及标本采集和送检流程，标本前处理流程，试剂耗材的批次、分装、储存时间以及设备的维护等环节，可通过以下措施对相关质控点进行监控：

- a) 各实验室应建立标本采集与送检流程以明确标本选择、采集时机和方式、耗材、标本量、送检单填写规则、运送保存条件、拒收标准等，以减少环境和人体定植微生物或其核酸污染；
- b) 应考虑标本保存运输的稳定性；
- c) 应建立临床标本的标准化前处理程序，对标本性状和运输容器/时长/温度等建立明确的接收和拒收标准，不同的标本类型选择对应的前处理方式；
- d) 应建立试剂、耗材的批次、分装、储存时间以及设备的维护等流程质控标准，以保障关键试剂和关键设备的稳定性和有效性。

10 检验过程

10.1 方案选择

10.1.1 使用商品化试剂盒

检验过程中当使用商品试剂盒时，应遵循相关检测标准及制造商的使用说明。

10.1.2 使用实验室自建程序

- a) 如果在商品化试剂盒的基础上开发新的方法具有新的用途，经确认符合用户自定义的用途，应制定说明并遵守。
- b) 如果实验使用不同于商品试剂盒的自建程序，则应确认它符合目的，应编写说明并遵守。使用不同制造商的产品可能影响结果，产品可能不兼容。只有在组件经过配套测试并经过确认令人满意时，它们才宜应用于诊断测试。

10.2 标本处理

10.2.1 进行均质化

拭子标本宜采取振荡等方式，将菌体从纤维丝上释放出来。黏稠的标本（黏稠痰或BALF）可进行相应的液化处理，用消化液分散黏液成分；液化方法有DTT法、蛋白酶法、NaOH法等，可选择合适的方法进行液化。

10.2.2 破壁处理

对核酸提取过程中破壁困难的微生物应进行特殊破壁处理（常见于下呼吸道标本）。机械研磨、超声破碎、酶裂解等方法均能提高胞内菌和真菌细胞壁的裂解效率，更多释放胞内菌及真菌的核酸，提高其检出率。可根据情况选择合适的破壁方法进行核酸提取。

注：相关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。

10.2.3 加入内参

可加入外源内参（推荐远源的微生物等）用于识别分析失败或者异常的标本。

10.3 核酸提取

10.3.1 应防止外界环境（如灰尘、气溶胶、RNA 酶等）对核酸提取的污染，以及病原微生物本身及实验过程中的废弃物、废弃液等对环境的污染。

10.3.2 在整个实验操作过程中应采用安全有效的防护措施。

10.3.3 应保证核酸一级结构的完整性，保证下游检测流程顺利进行。

10.3.4 提取后应对核酸质量进行检测，验证指标至少应包括核酸浓度，还可以进行纯度和完整性评估。

10.4 文库构建

10.4.1 基于多重 PCR 反应一次性扩增多个目标区域序列，并将二代测序所需的接头序列引入到扩增子产物的两侧得到测序文库。

10.4.2 如 tNGS 检测范围内未包含 RNA 病毒，可不进行反转录扩增。

10.4.3 完成文库构建后应对构建的文库进行质量评估。主要的文库质控指标为文库片段大小和文库浓度评估，除此之外还可包括文库转化率、文库复杂度等。

10.5 二代测序

进行二代测序时，应注意选择合格的文库和二代测序试剂，具体可根据二代测序仪厂商提供的标准测序流程进行测序操作。

10.6 生物信息分析

10.6.1 基本原则

本文件推荐生物信息分析需遵循以下原则：

- 充分了解公开数据库储量及质量，采用临床应用级微生物数据库。
- 生物信息分析人员应遵循 tNGS 数据分析流程，从原始序列到非人源高质量序列的获得以及物种注释需要经过标签识别、测序数据质量和测序深度评估、低质量序列过滤、去人源核酸序列、高质量序列比对等环节，每一步需严格遵循流程及具体要求。报告要规范，结果解释应结合临床。
- 实验室应具备生物信息学分析的软硬件条件，服务器容量应满足大样本同时下机的数据处理。生物信息人员熟悉各种软件使用方法及功能，掌握物种基因组信息收集、整理、分类、更新及建库方法和软件使用。识别因标本污染、序列质量、测序深度不足及比对错误等产生的异常测序结果，并熟练应用报告生成的信息系统。

10.6.2 数据质控

测序完成后，在对测序结果进行生物信息分析之前，应对下机数据先进行质量评估，以保证测序结果的可用性。质控指标包括Q20、Q30、内参数据量等。

10.6.3 序列比对

本文件推荐采取以下措施进行序列比对：

- 测序序列与病原微生物数据库中的参考序列进行比对，推荐引用临床应用级微生物数据库，数据库宜全面、准确涵盖待测病原微生物的基因组信息，且确保每条收录的序列数据准确完整，尽可能排除多重比对的情况。
- 确认病原微生物检出真实性时应查看扩增子覆盖情况，扩增子覆盖越多真实性越高。
- 确定序列比对特异时，应排除生物信息非特异比对情况（因与其他物种同源性较高导致的假阳性）。

10.7 检验过程室内质控

10.7.1 检验过程室内质控涉及核酸提取、文库构建、二代测序、生物信息分析等环节。涉及的质控点如下：

- 核酸浓度、纯度、完整性等；建库前核酸投入量下限与上限、文库核酸浓度、片段大小分布等。
- 文库有效数据量、Q30 值、接头比例、内参序列等。

注：内参通常包括外源内参和人内参，外源内参（如远源的微生物）用于识别分析失败或者异常的标本检出等，人内参基因（如管家基因ACTB）用于监控标本采集过程。

10.7.2 针对以上质控点，可采取以下过程进行控制：

- tNGS 相较传统 PCR 有更大的病原微生物覆盖范围和更高的防污染要求，在保证实验质量的前提下应优先采用经性能确认的封闭式自动化设备代替部分人工操作，以避免实验过程中来自操作人员和实验室环境中的微生物或其核酸造成的污染。
- 每次测序应包括阴性和阳性质控品，明确阴性、阳性质控品的在控和失控标准。

注：阴性质控物为不含病原微生物核酸的标本，用于识别外部污染、试剂和标本间交叉污染。阳性质控物为含有一种或多种病原微生物核酸的标本，用于监测检验过程是否工作。

11 检验后过程

11.1 病原微生物报告流程

测序数据下机、生物信息分析完成后，报告解读人员进行病原微生物解读，报告流程可参考图2。

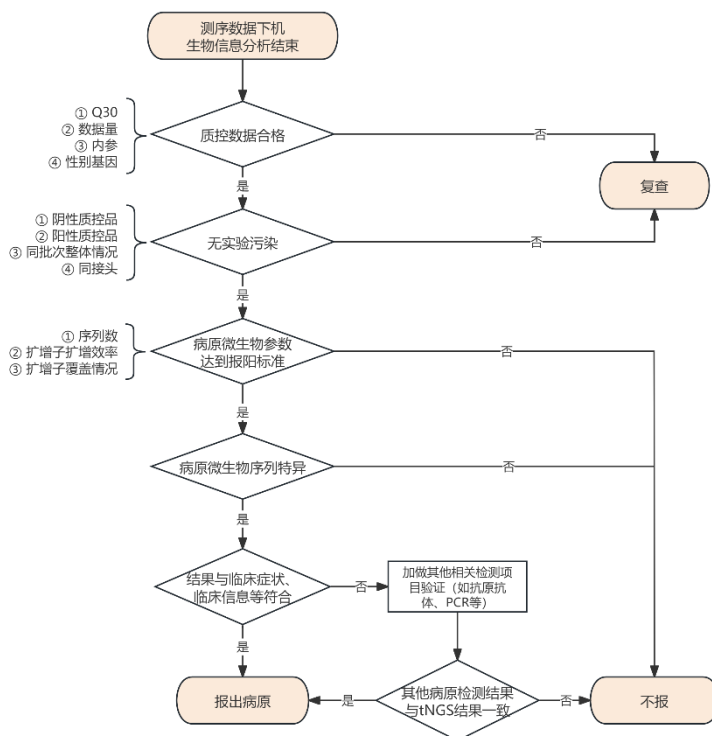


图2 tNGS 病原微生物报告流程

11.1.1.1 查看质控参数：明确 Q30、数据量、内参等质控合格，性别基因分析符合临床信息，再进行下一步解读。

11.1.1.2 可通过阴、阳性质控品检测结果是否符合预期以及分析同批次检测结果、同接头残留污染情况以及试剂环境污染情况来排查标本处理到测序数据产生的整个过程中是否存在污染，排除污染的情况下可进行下一步病原微生物检出判断。

11.1.1.3 查看病原微生物参数：阳性病原微生物真实性的确定不依赖于某个单一的指标，包括但不限于序列数、扩增子扩增效率、扩增子覆盖情况等。

11.1.1.4 查看病原微生物序列特异性：同源性较高的病原微生物（如肺炎链球菌与其他链球菌等）应从序列特异性上进行确认。

11.1.1.5 结合临床信息：密切关注临床其他相关检测结果综合分析，如血常规、培养、病毒抗体等。

11.1.1.6 加做其他项目进行验证：必要时可以加做其他相关检测项目进行确认。对于临床关注度高且核酸提取困难的病原微生物（如结核分枝杆菌复合群、嗜肺军团菌等）如果检出低序列不易进行判断时，可加做 qPCR 或抗原抗体进行验证。

11.2 结果报告发布

核对患者信息与报告单，准确无误后发布报告单。结果报告除满足 GB/T 22576.1—2018《医学实验室 质量和能力的要求 第1部分：通用要求》中 5.8.3 的要求外，报告还应包括以下内容（报告模板见附录 B）：

- 检测到的病原微生物物种（包括属和种）、耐药基因、检出序列数。
- 质控信息（总序列数、Q30 等）。
- 该检测方法的检测范围及检测技术说明。
- 对相关术语进行说明，并注明检测方法的检测灵敏性等。

11.3 假阴性与假阳性结果处理

当 tNGS 检测结果与临床诊断以及其他检测结果差异较大时，需要排查是否存在假阴性与假阳性情况，处理流程见图 3。

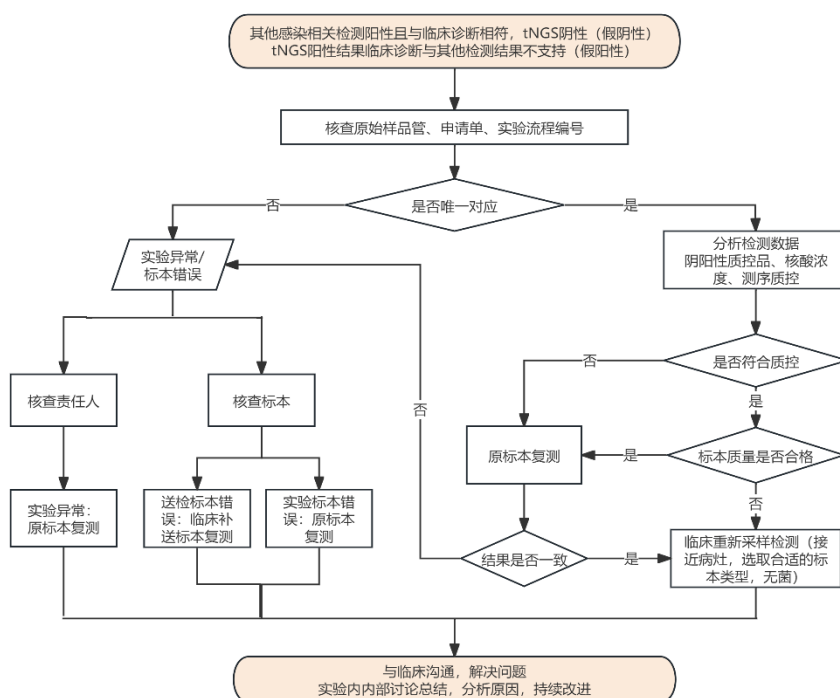


图3 假阴性与假阳性处理流程图

11.3.1 假阴性结果处理

当出现其他感染相关检测阳性且与临床诊断相符而tNGS阴性时，可能出现了假阴性结果。

- a) 核查原始样品管、申请单、实验流程编号，确认全流程是否唯一对应。
- b) 实验流程编号等不是唯一对应，通过核查责任人以及标本来排查是实验异常还是标本错误。如果是实验过程中出现异常或实验标本错误需要对原标本进行复测；如果是临床送检标本错误需要临床补送标本后进行复测。
- c) 如实验流程编号等是唯一对应，需要分析当批次阴阳性质控、测序质控以及样本核酸浓度等是否在控，不符合质控需要对原标本进行复测；符合质控的情况进一步排查标本质量是否合格：可以通过显微镜检查、人内参等指标以及询问临床医生采样过程来判断采样是否合格，如标本质量合格建议进行原标本复测，原标本复测后如果结果一致建议重新采样，结果不一致可能是实验异常或者标本错误导致，需要进行回顾性分析与总结。标本质量不合格建议临床老师重新采样复测，注意接近病灶采样，选取合适的标本类型。
- d) 梳理整个流程的问题，明确导致假阴性的原因，与临床进行沟通，处理后续正确报告单发布问题，安抚临床医生与患者情绪。实验室内部针对性进行整改，持续改进。

11.3.2 假阳性结果处理

基本处理流程与“11.4.1假阴性结果处理”一致，需要注意以下问题：

- a) 排查是否符合质控时需要重点注意排查实验过程中是否有其他来源的阳性污染。
- b) BALF 标本排查标本质量是否合格过程中需要向临床了解支气管镜取样过程中是否存在污染或洗消不彻底导致支气管镜仍然残留病原微生物核酸片段。
- c) 重新采样一定要注意消杀以及无菌操作。

11.4 临床标本的储存、保留和处置

原始标本、核酸和核酸扩增产物应根据实验室要求规定保存期限，便于复查和追加其他检测。为便于追溯，测序原始数据以及分析结果也应同时进行保存。

11.5 检验后过程室内质控

检验后过程室内控制涉及报告周转时间、阳性率/阴性率、室内质控失败率、报告修改率，以及与临床诊断的一致率、复测率、取消测试数等数据的记录、统计和分析等，应对异常记录提供纠正措施以不断改进和优化流程，并审查所有与检测相关的文档。

12 室间质评

12.1 参加国家级、省级室间质量评价。

12.2 当无实验室室间质评项目可利用时，可通过与其他实验室比对（即室间比对）的方式确定检验结果的可接受性。

12.3 实验室应规定比对实验室的选择原则（如已获认可的实验室、使用相同检测方法的实验室）、样品数量（应包括正常和异常水平）、频率、判定标准等。

12.4 实验室负责人或指定人员应监控室间比对活动及其结果，并在结果报告上签字。

附录 A

(资料性)

呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序申请单模板

表A.1给出了呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序申请单模板，可不限于下列形式。

表A.1 呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序申请单

*受检者信息	*姓名： *联系电话：	*性别： *门诊/住院号：	*年龄： *民族：	*民族： *床号：
*标本信息	<input type="checkbox"/> BALF <input type="checkbox"/> 痰液 <input type="checkbox"/> 气管吸引物 <input type="checkbox"/> 鼻咽拭子 <input type="checkbox"/> 口咽拭子 <input type="checkbox"/> 呼吸道感染病灶组织 <input type="checkbox"/> 其他： 标本体积： *采样时间： 年 月 日 *送检时间： 年 月 日			
送检单位信息	送检医生姓名： 科室： 医院名称： 医生电话：			
临床信息(可附病历)	疾病信息 初步诊断： 现病史： 既往史： 流行病学史： 重点关注病原微生物： <input type="checkbox"/> 细菌 <input type="checkbox"/> 真菌 <input type="checkbox"/> 支原体/衣原体 <input type="checkbox"/> 病毒 <input type="checkbox"/> 分枝杆菌			
	辅助检查 体温： 血常规： 白细胞（绝对值和百分比）： 淋巴细胞（绝对值和百分比）： CRP (mg/L)： 病原学检查： 镜检/培养结果（请标注标本类型）： 结核相关检查： γ 干扰素释放试验： <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 阳性 分子生物学检测： <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 阳性 真菌相关检查：G试验： <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 阳性 GM试验： <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 阳性 隐球菌抗原： <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 阳性 病毒相关检查： 病理结果： 影像学检查： 其他：			
	近期用药 抗感染治疗方案： 疗程： 日			
补充信息	暴露情况： <input type="checkbox"/> 疫区/国外旅行经历： <input type="checkbox"/> 饲养动物： <input type="checkbox"/> 外伤 <input type="checkbox"/> 插管 免疫相关情况： <input type="checkbox"/> 口服或注射免疫抑制剂 <input type="checkbox"/> 接受放疗/化疗 <input type="checkbox"/> 长期使用糖皮质激素 <input type="checkbox"/> 先天/后天获得性免疫缺陷 <input type="checkbox"/> 其他：			
注：标注星号(*)的为必填项。				

附录 B

(资料性)

呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序检测报告模板

表B.1给出了呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序检测报告模板,可不限于下列形式。

表B.1 呼吸系统感染病原微生物靶向二代测序申请单

标本信息					
受检者信息	姓名:	性别:	年龄:		
	住院号/门诊号:	床号:			
标本信息	标本条码:	实验编号:	标本类型		
	采样日期:	接收日期:	报告日期:		
送检方信息	送检医院:				
	送检科室:		送检医生:		
临床信息					
病原微生物检测结果					
分类	属名	种名	均一化序列数 ^a		
**	**	**	**		
耐药基因检测结果					
病原微生物解释					
检测质控					
总序列数	Q30比率 (%) ^b	内参检测结果	阳性对照	NTC结果	
合格	合格	合格	合格	合格	
主检单位信息					
主检人	审核人	批准人	主检实验室	地址	联系方式
**	**	**	**	**	**
检测说明					
<p>1. 本检测结合多重靶向扩增和二代测序技术 (targeted Next-Generation Sequencing, tNGS) 对常见病原微生物进行平行检测, 通过生物信息技术分析鉴定标本中可疑致病病原微生物, 辅助临床医生进行综合分析判断和制定个体化精准治疗方案。</p> <p>2. 本检测耐药基因包含: ***等相关基因检测。耐药基因与表型之间存在差异, 检测结果仅供临床医生参考。</p> <p>3. 本检测最低检测限为: ***copies/ml, 低于检测限的病原微生物可能无法检出。</p> <p>4. 本报告仅对本次送检标本负责, 无检测人、无审核人签字, 涂改以及内容缺损无效。</p> <p>5. 本次检出的病原微生物可能与感染有关, 病原微生物检测结果详细列表见附表。建议临床综合患者症状/体征、病史、其他实验室诊断结果等情况进行分析考虑。不作为患者临床诊治或管理的唯一依据, 不代表最终诊断结果, 分析结果请咨询专科医生。</p> <p>6. 本实验室保留对上述结果的最终解释权, 如有疑义请在收到报告后7个工作日与我们联系。</p>					
检测范围					
细菌	**				
真菌	**				
病毒	**				
耐药基因	**				
注: 以上检测质控信息说明此次检测测序数据质量合格, 结果可信。					
^a 每 100K 的原始序列中含有该病原微生物的序列数, 均一化序列数数值越高, 则反映该病原微生物的检测信号越强。 ^b Q30 表示错误识别的概率是 0.1%, 即正确率是 99.9%, Q30 比率是指正确率超过 99.9%的碱基占比。					

参 考 文 献

- [1] GB/T 29791.1—2013 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第1部分:术语、定义和通用要求.
- [2] GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程.
- [3] GB/T 39367.1—2020 体外诊断检验系统病原微生物检测和鉴定用核酸定性体外检验程序第1部分:通用要求、术语和定义.
- [4] GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法.
- [5] GB/T 40458—2021 用于病原微生物高通量检测的核酸提取技术规范.
- [6] GB/T 40664—2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求.
- [7] GB/T 42066—2022 急性病毒性感染呼吸道样本采集.
- [8] WS/T 499—2017 下呼吸道感染细菌培养操作指南.
- [9] WS/T 807—2022 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性能验证.
- [10] YY/T 1182—2010 核酸扩增检测用试剂(盒).
- [11] YY/T 1725—2020 细菌和真菌感染多重核酸检测试剂盒.
- [12] CNAS—GL050: 医学实验室分子诊断领域认可指南.
- [13] CNAS—GL039: 分子诊断检验程序性能验证指南.
- [14] T/GDPMAA 0012—2023: 高通量基因测序项目分类.
- [15] 中国研究型医院学会呼吸病学专业委员会,成人呼吸系统感染性疾病病原学诊断专家意见编写组.成人呼吸系统感染性疾病病原学诊断专家意见[J].中华结核和呼吸杂志 2020年43卷9期, 757-764页, MEDLINE ISTIC PKU CSCD, 2020. DOI:10.3760/cma.j.cn112147-20200212-00081.
- [16] 邹晓辉,曹彬.呼吸道感染病原学诊断年度进展2021[J].中华结核和呼吸杂志, 2022, 45(1):5. DOI:10.3760/cma.j.cn112147-20211116-00809.
- [17] 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):5. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.02.005.
- [18] 中国药师协会,中华医学会细菌感染与耐药防治分会,国家卫生健康委临床抗微生物药物敏感性折点研究和标准制定专家委员会.病原宏基因组高通量测序临床本地化检测规范专家共识[J].中华预防医学杂志, 2024, 58(00):1-12. DOI:10.3760/cma.j.cn112150-20230720-00019.
- [19] 徐英春,瞿介明,中华检验医学培训工程专家委员会等.成人呼吸道感染病原诊断核酸检测技术临床应用专家共识(2023)[J/OL].协和医学杂志:1-23[2023-09-25].
- [20] 张海邻,陈小芳.儿童呼吸道感染微生物检验标本采集转运与检测建议(病毒篇)[J].中国实用儿科杂志, 2018, 33(9):6. DOI:CNKI:SUN:ZSEK.0.2018-09-001.
- [21] 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.
- [22] 谢正德,邓继岩,任丽丽,等.儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识[J].中华实用儿科杂志. 2022, 37(5):321-332. DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20211222-01490.
- [23] 林立,刘彩霞.儿童呼吸道感染微生物检验标本采集转运与检测建议(细菌篇)[J].中国实用儿科杂志, 2018, 33(9):7. DOI:CNKI:SUN:ZSEK.0.2018-09-003.
- [24] 瞿介明,施毅.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)的更新与解读[J].中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4):3. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2018.04.002.
- [25] 中华医学会呼吸病学分会.中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016年版)[J].中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4):253-279. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2016.04.005.
- [26] Charlton C L, Babady E, Ginocchio C C, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 32(1). DOI:10.1128/CMR.00042-18.

- [27] 中华医学会呼吸病学分会. 下呼吸道感染宏基因组二代测序报告临床解读路径专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2023, 46(4):14. DOI:10.3760/cma.j.cn112147-20220701-00553.
- [28] 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. DOI:10.7507/1671-6205.201804048.
- [29] 中华医学会检验医学分会. 宏基因组测序病原微生物检测生物信息学分析规范化管理专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(9):9. DOI:10.3760/cma.j.cn114452-20210322-00178.
- [30] 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]. 感染、炎症、修复, 2020(002):021.
- [31] 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):15. DOI:10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704.
- [32] 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):4. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.12.007.
- [33] 张栋, 张京家, 杜娟, 尚雪松, 陈雨, 吴洁, 伊洁, 杨卓, 徐英春, 杨启文. 病原宏基因组高通量测序性能确认方案[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(9):899-905. DOI:10.3760/cma.j.cn114452-20220721-00426.
- [34] Boolchandani M, D'Souza, Alaric W, Dantas G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance[J]. Nature Reviews Genetics, 2019. DOI:10.1038/s41576-019-0108-4.
- [35] 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发〔2010〕194号).
-