ICS 11.020
CCS C 50

T/WJWCHCA

中 国 医 药 卫 生 文 化 协 会 团 体 标 准

T/WJWCHCA 001—2024

基于多重 PCR 的呼吸道感染病原体靶向二代测序检测技术规范

Technical specification for targeted next-generation sequencing detection of respiratory infection pathogens based on multiplex PCR

（发布稿）

2024 - 12 - 02 发布　　2024 - 12 - 02 实施

中国医药卫生文化协会　　发 布

目　　次

前　言

本标准参照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。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由中国医药卫生文化协会提出并归口。

本标准起草单位：广州金域医学检验集团股份有限公司、北京友谊医院、中南大学湘雅二医院、长沙金域医学检验实验室有限公司、武汉儿童医院、重庆医科大学附属第二医院、江苏省人民医院、广州医科大学附属第一医院、广州金域医学检验中心有限公司、广州国家实验室、广东省呼吸与健康学会。

本标准主要起草人：余艳、赵晓涛、胡敏、李培、陆小霞、胡鹏、张磊、姚欣、关文达、李慧源、梁萍、马常钧。

引　言

随着新发和再发病原体的不断涌现、耐药性问题日益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。其中，呼吸道感染是临床上最常见的感染性疾病，可分为上呼吸道感染和下呼吸道感染。病原学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显微镜检查、培养、血清学试验、传统分子生物学方法（如PCR）等，但这些方法存在诸多局限性。近年来，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）是一种基于多重PCR特异扩增或探针捕获等方法富集后，检测标本中特定靶标核酸的技术。在病原学检测领域，tNGS技术能够一次性检测标本中特定的几十至几千上万种特定病原体及其毒力基因和/或耐药基因。与直接从临床标本中提取核酸进行测序分析、一次性覆盖检测病毒、细菌、真菌和寄生虫等多种病原体的宏基因组二代测序（metagenomic next-generation sequencing，mNGS）相比，tNGS具有灵敏度受宿主核酸影响较小、性价比高等特点。

目前，市场上已有众多医疗机构提供病原体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，给报告单解读和临床应用带来了不小的挑战。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，参考国内外相关标准、指南与专家共识，结合tNGS检测技术特点，就病原体tNGS技术要求和操作规范达成共识，指导和规范tNGS在呼吸道感染病原体检测中的应用。

基于多重PCR的呼吸道感染病原体靶向二代测序检测技术规范

1 范围

本标准规定了采用基于多重PCR的靶向二代测序技术进行呼吸道临床标本病原体检测(包括分析前、分析中和分析后)的方法和程序，以及性能验证或性能确认和质量控制等。

本标准适用于采用基于多重PCR的靶向二代测序技术进行呼吸道临床标本病原体检测的医疗机构。

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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 22576.1 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 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 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 39367.1 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

WS/T 640 临床微生物学检验样本标本的采集和转运

WS/T 805 临床微生物检验基本技术标准

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标准。

3.1

呼吸道感染 respiratory infection

由病毒、细菌、真菌、寄生虫、支原体、衣原体等病原体引起的呼吸道的感染。

注：可分为上呼吸道感染与下呼吸道感染。上呼吸道感染指累及鼻腔、咽/喉部等的感染，多由病毒引起；下呼吸道感染指累及肺组织或喉以下的气管支气管的感染，常由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，病毒、细菌、真菌等都可引起下呼吸道感染。

3.2

病原体 pathogens

能引起人或动物感染疾病的微生物。

注：包括病毒、细菌、真菌、寄生虫、支原体、衣原体等。

[来源：SN/T 2028-2015，6.7，有修改]

3.3

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction；PCR

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；NGS

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，有修改]

3.6

宏基因组二代测序 metagenomic next-generation sequencing；mNGS

利用二代测序（本标准第3.5条）技术无预设地、不依赖于培养地，直接针对临床标本中提取的所有核酸进行无偏性测序和生信分析，一次性覆盖检测病毒、细菌、真菌、寄生虫、支原体、衣原体等多种病原体的测序技术。

[来源：ISO/TS 24420-2023，3.23，有修改]

3.7

靶向二代测序 targeted next-generation sequencing；tNGS

一种通过多重PCR（本标准第3.4条）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（本标准第3.5条）、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。

3.8

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。

3.9

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=－10lg 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，有修改]

3.10

序列数 reads

匹配到该病原体（本标准第3.2条）基因组的序列数目。

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

3.11

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]

3.12

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]

3.13

内参 internal control

分为外源性内参和内源性内参。外源性内参指在同一反应管中与靶序列共同扩增的一段非靶序列非人源基因分子，其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；内源性内参指在标本中固有的人细胞中的管家基因，其目的是监测采样过程以及检测的全流程。

[来源：YY/T 1182—2010，3.14，有修改]

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准（按照字母顺序列出）。

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

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*）

cDNA：互补脱氧核糖核酸（complementary DNA）
DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）
DTT：二硫苏糖醇（dithiothreitol）
MRSA：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin resistant *Staphylococcus aureus*）
mNGS：宏基因组二代测序（metagenomic next-generation sequencing）
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

传统病原学检测、tNGS、mNGS在呼吸道感染中的应用不同，具体应用场景详见图1。

5.1.1 传统病原学检测

常见病原体引起的非重症感染宜送检传统病原学检测（如培养、镜检、PCR、血清学检测）。

5.1.2 tNGS

以下应用场景宜送检tNGS检测（同时做传统病原学检测）：

a) 常见病原体引起的危急重症；
b) 非重症患者传统病原学检测阴性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）；
c) 呼吸道常见病原体混合感染；
d) 特定病原体产生耐药时（耐药/毒力基因在 tNGS 检测范围内），如肺炎支原体、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌等。

5.1.3 mNGS

以下应用场景宜送检mNGS检测（同时做传统病原学检测）：

a) 危急重症感染；
b) 疑难罕见感染；
c) 聚集性呼吸道传播性感染；
d) 新发突发传染病；
e) 临床排除感染。

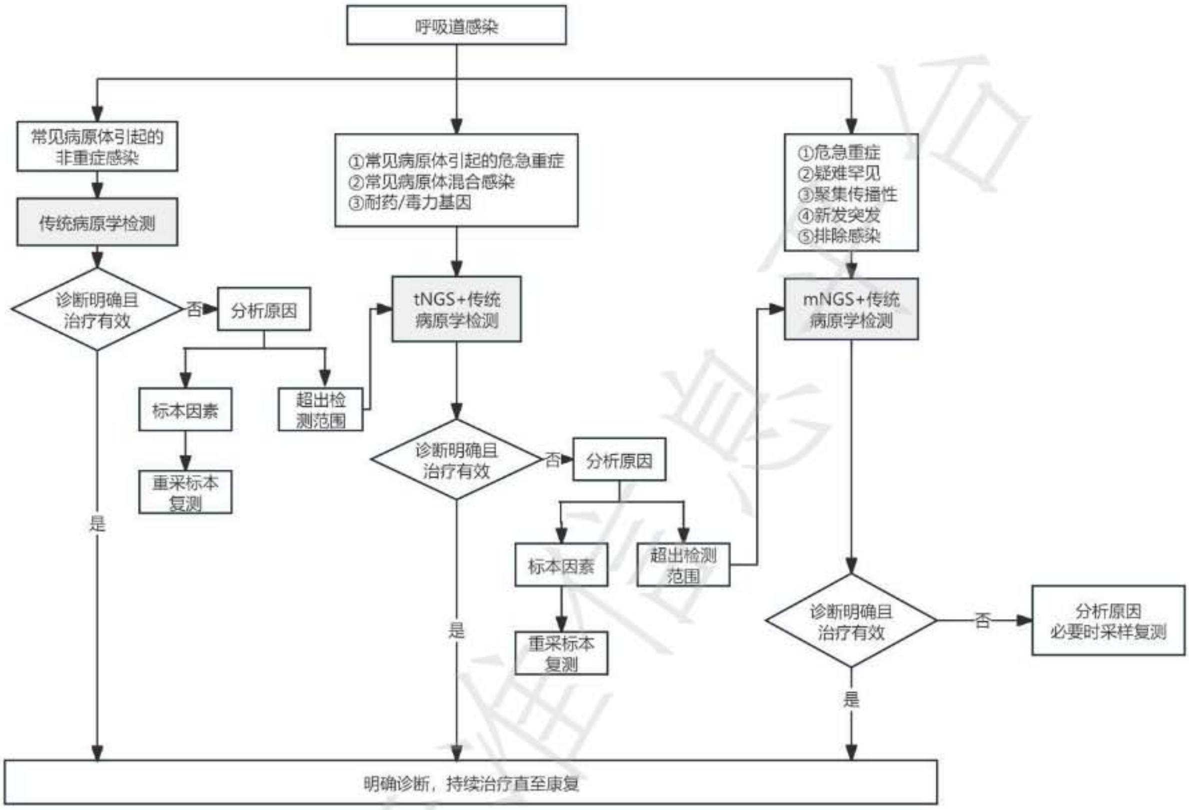

图 1　呼吸道感染 tNGS 检测应用场景

5.2　检测范围

5.2.1　上呼吸道感染 tNGS 检测宜纳入的病原体和耐药基因

上呼吸道感染tNGS检测宜纳入的病原体和耐药基因见表1。

表 1　上呼吸道感染 tNGS 检测宜纳入的病原体和耐药基因

分类	上呼吸道感染tNGS检测宜纳入的病原体和耐药基因
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
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、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
注1：上、下呼吸道标本均适用于肺炎支原体、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。 注2：上呼吸道标本通常不适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，检测结果应结合患者临床症状、影像学特征等信息进行综合判断。 注3：由于不同文献资料中病原体名称有差异，表1中病原体名称主要参考《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）》。 注4：本表中的病原体参考了国内外专家共识及最新的流行病学调查数据，考虑到临床医学诊断技术的不断发展以及疾病谱和病原谱可能发生变化，宜根据实际情况进行调整。	

5.2.2　下呼吸道感染 tNGS 检测宜纳入的病原体和耐药基因

下呼吸道感染tNGS检测宜纳入的病原体和耐药基因见表2。

表 2　下呼吸道感染 tNGS 检测宜纳入的病原体和耐药基因

分类	下呼吸道感染tNGS检测宜纳入的病原体和耐药基因
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
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目细菌（CRE）、耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌（CRAB）和耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌（CRPA）等有关的耐药基因

注1：由于不同文献资料中病原体名称有差异，表2中病原体名称主要参考《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）》。

注2：抗菌药物的不合理使用引发的细菌耐药性已成为威胁人类健康的主要问题之一。为了有效避免抗菌药物不合理使用和遏制细菌耐药性的扩散，关键在于对感染性疾病病原体的早期、快速和精准诊断。tNGS检测能够实现耐药基因的早期、快速鉴定，然而，耐药基因与耐药表型之间的关联性仍需进一步深入研究，目前，尚缺乏足够的循证医学证据来支持tNGS检测耐药基因能够直接影响临床用药决策。因此，本表给出的耐药基因检测范围仅供参考，不能作为临床用药的唯一依据。

注3：本表中的病原体参考了国内外专家共识及最新的流行病学调查数据，考虑到临床医学诊断技术的不断发展，疾病谱和病原谱可能发生相应的变化，应根据实际情况进行调整。

5.3　标本选择

5.3.1　基本要求

选择标本应考虑患者症状、患者免疫状态、疾病严重程度、有创检查的风险、流行病学特点、可疑病原体的特性、播散能力以及受累器官和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检测可采集标本包括口咽拭子、鼻咽拭子、鼻咽吸取物等。

注1：一般情况下，不单独采用口咽拭子标本诊断上呼吸道感染，宜与鼻咽拭子或鼻咽吸取物联合检验，以提高呼吸道感染的病原检出率。鼻咽拭子的病原检出率较口咽拭子高，采集时，鼻咽拭子与口咽拭子可各采集一根，放到同一个采集管中。

注2：采集鼻咽吸取物时，将无菌吸痰管与无菌收集器相连，再将吸痰管送入患儿鼻咽部至产生抵抗，稍回抽，利用负压吸取鼻咽部分泌物1mL～2 mL至无菌收集器中。

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、下呼吸道组织等。

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，BALF更适合作为下呼吸道感染的检测标本。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。

注2：咳痰、诱导痰或经上呼吸道吸痰标本可作为下呼吸道感染检测的一种替代标本，但痰液质量应合格，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。有条件的实验室应进行显微镜下检查：合格痰标本应鳞状上皮细胞＜10个/低倍视野，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) 标本保存液应首选经国家行政部门批准的商业化病毒标本保存液，因标本用于核酸检测以及其他分子生物学检测和研究，可选择含核酸保护剂的标本保存液；
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、结果解读等。必要时标本应经过均质化、破壁等处理裂解细胞以促进释放核酸，通过纯化步骤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，并获得标本核酸。然后通过RNA反转录、一轮或两轮PCR、核酸纯化等步骤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测序文库。最后，对测序文库进行二代测序并进行生物信息分析，比对测序序列识别病原体，解读结果并生成结果报告。

7 实验室分区、仪器设备及试剂

7.1 实验室分区

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》（卫办医政发〔2010〕194号）。

tNGS实验室分区不少于：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

宜包含以下仪器设备和试剂：

a) 仪器设备：
   1) 医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；
   2) 超净工作台；
   3) 微量移液器；
   4) 旋涡混匀器；
   5) 微型掌上离心机。

b) 试剂：
   以下提到的试剂宜在试剂准备区长期保存。

7.2.2 样品处理区

宜包含以下仪器设备和试剂：

a) 仪器设备：
   1) 医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；
   2) 生物安全柜（Ⅱ级或Ⅲ级）；
   3) 微量移液器；
   4) 旋涡混匀器；
   5) 微型掌上离心机；

6） 冷冻离心机（最大离心力 12000 g 以上）；
7） 破碎仪（匀浆仪、均质器）；
8） 自动核酸提取仪。

b） 试剂：
1） 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。

2） 核酸提取试剂。

7.2.3 文库构建区

宜包含以下仪器设备和试剂：

a） 仪器设备：
1） 医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；
2） 生物安全柜（Ⅱ级或Ⅲ级）；
3） 微量移液器；
4） 旋涡混匀器；
5） 微型掌上离心机；
6） PCR 仪；
7） 自动纯化仪。

b） 试剂：
1） 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。

2） 靶向扩增引物。

注1：引物设计时根据目标病原体核酸序列，从公共数据库中选择已收录的病原体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体的靶标基因，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。

7.2.4 上机测序区

宜包含以下仪器设备和试剂：

a） 仪器设备：
1） 医用冰箱（4℃、-20℃低温、-80℃超低温）；
2） 生物安全柜（Ⅱ级或Ⅲ级）；
3） 微量移液器；
4） 旋涡混匀器；
5） 微型掌上离心机；
6） 荧光定量仪；
7） 全自动核酸蛋白分析仪；
8） 二代测序仪；
9） 服务器。

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。

7.3 人员资质

实验应由具备分子生物学检验专业技能的人员进行操作，需获得国家要求的相应资质；生物信息分析应配备生物信息研发及管理人员，负责分析流程的运行、维护和更新；结果审核应由具备临床感染病学、高通量测序相关背景知识的专业技术人员进行。所有相关人员须通过岗位相关的培训和考核，以确保其具备上岗资格，并定期接受能力评估，以维持和提升专业技能水平。

8 性能验证或性能确认

8.1 方案选择

临床实验室可参考CNAS-CL02《医学实验室质量和能力认可准则》选择性能验证方案或性能确认方案。

8.2 性能验证

按照相关标准、制造商说明书规定的方法对实验方法进行验证。tNGS（属于定性检测）选择验证的性能指标宜包括一致性，适用时，还应包括检出限、重复性等。

8.3 性能确认

8.3.1 性能确认时机

检测方案在投入使用前及关键实验环节发生改变时应进行性能确认：

a) 影响检测性能的关键检测设备（如提取仪、PCR 仪、二代测序仪等）搬迁、仪器更新升级，应重新进行确认；
b) 改变操作流程及试剂方案包括但不限于核酸提取、PCR 产物纯化、文库构建、二代测序等时，应重新进行确认；
c) 升级生物信息分析流程后应重新进行确认，包括但不限于数据库更新、生物信息分析流程变动。

8.3.2 性能确认参数

实验室tNGS检测系统应对重复性、一致性、检出限、分析特异性、稳定性等性能参数进行确认。

8.3.3 生物信息分析流程的性能确认

8.3.3.1 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。

8.3.3.2 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）。

8.3.3.3 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。

8.3.4 性能确认标本的制备

8.3.4.1 临床标本

选择呼吸道临床标本（BALF、鼻咽拭子、痰液等），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。

8.3.4.2 参考物质

可选用商品化参考物质或自制参考物质。参考物质制备应遵循以下原则：

a) 代表性：参考物质纳入的病原体应覆盖呼吸道常见病原体检出率的80%-90%，涵盖不同类型病原体，包括革兰阴性菌、革兰阳性菌、真菌、DNA 病毒、RNA 病毒、支原体/衣原体；
b) 均匀性和稳定性：参考物质应进行均匀性和稳定性评估，具体方法应符合 CNAS-CL04《标准物质/标准样品生产者能力认可准则》的要求；
c) 定值：参考物质应模拟临床标本并选择合适的策略来进行定值，如经过至少 3 家具备相应技术能力的医疗机构采用两种或两种以上的检测方法证明其一致性，具体方法应符合 CNAS-CL04《标准物质/标准样品生产者能力认可准则》的要求。

8.3.5 全流程性能确认

8.3.5.1 重复性

对同一批样品在同一条件下（相同的环境、操作人员及仪器）3 天内应至少进行 3 次以上检测，评价重复性。可选择高、低 2 个不同梯度的参考物质进行确认，重复性应≥95%。

8.3.5.2 一致性

可选择以下两种不同类型的标本来进行一致性确认（例数应具有统计学意义）：

a) 使用临床标本：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体），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一致性，一致率应≥95%；

b) 使用参考物质：高、中、低三个浓度的一致率应≥95%。

8.3.6 检出限（LoD）

应选择含有代表物种的混合参考物质，梯度稀释至厂家声明的检出限浓度，并对该浓度进行20次以上重复。如果是20次检测，必须检出至少19次靶核酸（≥95%）。实验室应建立不同标本类型、不同代表物种（如革兰阴性菌选择鲍曼不动杆菌，革兰阳性菌选择金黄色葡萄球菌等）的LoD。

8.3.7 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的病原体核酸是否会产生影响，宜在病原体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、1∶3、3∶1 的浓度比例进行混合后测序，应至少重复检测 3 次。若验证病原体均在项目检测范围内，其比值与理论值相差应在两倍以内；若验证病原体仅有 1 种在检测范围内，则该同源性的病原体不应检出，且不改变验证病原体的检出；

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≥95%。

8.3.8 稳定性

分为标本稳定性和试剂稳定性，符合率应为100%，具体操作如下：

a) 标本稳定性：将弱阳性标本和阴性标本保存在不同温度（如常温、4℃、-20℃和-80℃）、不同时长（如 1、3、7 天）、不同冻融次数（如 1 次、2 次、3 次）的条件下进行检测；

b) 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。

9 分析前

9.1 标本采集、保存与转运基本要求

标本尽可能在首次抗菌药物使用或更改治疗方案前进行采集;采集过程中宜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 临床微生物学检验标本的采集和转运相关要求进行操作，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。

9.2 标本信息

送检方宜提供以下信息：受检者姓名、年龄、性别、标本类型、采样时间、送检时间、初步诊断、重点关注病原体、近期抗感染治疗方案等。申请单模板见附录A。

9.3 标本转运

标本转运要求如下：

a) 标本采集后，宜尽快送到实验室，不宜超过 2 h；

b) 无法及时送达或待处理标本应置于 4℃冰箱保存，不宜超过 24 h，冷藏运输；

c) 若标本采集时间与检测时间间隔＞24 h,应保存在-20℃或-80℃冰箱，干冰运输。

10 分析中

10.1 方案选择

10.1.1 使用商品化试剂盒

使用商品化试剂盒时，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

根据是否使用商品化试剂盒的自建程序分为以下情况：

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化试剂盒的自建程序，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检测性能要求时，它们才宜应用于诊断测试。

10.2 标本处理

10.2.1 均质化处理

宜采取以下措施进行均质化处理：

a) 标本检测前宜混匀；

b) 黏稠的标本（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，释放更多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。

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 内参添加

宜加入外源性内参用于检测过程的监控（通过监测内参的指标可以判断测序过程是否稳定，是否存在偏差或错误）等。

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，同时避免病原体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 验证指标至少应包括核酸浓度等，提取后应对核酸质量进行检测，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

生物信息分析应遵循以下原则：

a) 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；

b) 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应经过标签识别、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，每一步应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；

c) 实验室应具备生物信息学分析的软件和硬件条件，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，并熟练使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

宜采取以下措施进行序列比对：

a) 测序序列与病原体数据库中的参考序列进行比对，应引用临床应用级微生物数据库，数据库宜全面、准确涵盖待测病原体的基因组信息，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；

b) 确认病原体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；

c) 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）。

11 分析后

11.1 病原体报告流程

测序数据下机、生物信息分析完成后，报告解读人员进行测序数据解读，报告流程如下：

a) 质控检查：首先确认质控参数如 Q30 值、数据量、内参等是否合格，以确保后续分析的可靠性；

b) 污染排查：通过分析阴、阳性质控品的检测结果是否符合预期、批次病原体检出率、接头残留污染情况以及试剂环境污染情况，来排查整个标本处理到测序数据产生的过程中是否存在污染。只有在排除污染的情况下，才能进行下一步病原体的检出判断；

c) 病原体参数评估：阳性病原体真实性的确定不应依赖于某个单一的指标，而应综合考虑序列数、扩增子扩增效率、扩增子覆盖情况等多个参数进行综合判定；

d) 序列特异性确认：对于同源性较高的病原体（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，以确保结果的准确性；

e) 临床信息结合：应密切关注临床其他相关检测结果，如血常规、培养、病毒抗体等，进行综合分析，以提供更全面的诊断信息；

f) 验证性检测：必要时可加做其他相关检测项目进行验证。对于临床关注度高且核酸提取困难的病原体（如结核分枝杆菌复合群、嗜肺军团菌等），如果检出低序列可加做 qPCR 或抗原抗体检测进行验证，以提高诊断的准确性。

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》中第5.8.3条的要求外，报告还应包括以下内容（报告模板见附录B）：

——检测到的病原体物种（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；
——对相关的专业术语进行说明，并注明检测方法的检出限等。

11.3　假阴性与假阳性结果处理

11.3.1　假阴性结果处理

当tNGS检测结果为阴性，而其他感染相关检测阳性且与临床诊断相符时，可能出现了假阴性结果。由此，可采取以下措施：

a）核查原始样品管、申请单、实验流程编号，确认全流程的唯一对应性。排查是否存在实验异常或标本错误；
b）实验和标本无异常的情况下，可能存在该标本病原体载量低于检出限等情况，临床医生或护士宜重新采样并送检，注意选择合适的标本类型，靠近病灶采样；
c）梳理整个检测流程，明确导致假阴性的原因，与临床进行沟通。同时实验室内部应针对问题进行整改，持续改进检测流程。

11.3.2　假阳性结果处理

处理流程参考本标准第11.3.1条的规定，同时应关注以下几点：

a）严格排查实验过程中是否存在其他来源的阳性污染，确保检测结果的准确性；
b）对于送检的 BALF 标本，必要时应向临床咨询了解支气管镜取样过程中是否存在污染或洗消不彻底的情况，以避免支气管镜残留病原体核酸片段影响检测结果；
c）如需重新采样送检，务必注意进行彻底的消杀和无菌操作，以防止标本污染。

11.4　临床标本的储存、保留和处置

原始标本、核酸及其核酸扩增产物应根据实验室的要求规定保存期限，以便于复查和必要时加做其他检测。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。

12　质量控制

12.1　分析前质量控制

分析前质量控制包含标本采集、送检流程及标本前处理流程等关键环节，可采取以下措施监控相关检测点：

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、申请单填写规则、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、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。

12.2　分析中质量控制

12.2.1　室内质量控制

12.2.1.1　分析中质量控制涉及核酸提取、文库构建、二代测序、生物信息分析等环节。关键质控点包括：

a）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；
b）文库有效数据量、Q30 值、接头比例、内参序列等。

12.2.1.2　针对以上质控点，可采取以下措施进行质量控制：

a) tNGS 相较传统 PCR 有更广的病原体覆盖范围和更高的灵敏度，因此应制定更高的防污染要求，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；

b) 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体核酸的标本，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体核酸的标本，用于监测检验过程是否工作。

12.2.2 室间质量评价

12.2.2.1 实验室应制定相应的政策和措施，有计划地参加外部质量控制活动，包括国内外实验室认可机构组织的能力验证活动，实验室主管机构组织的比对活动，国际间、国内同行间的实验室比对试验等。改进质量管理，提高检测结果的准确度。

12.2.2.2 实验室完成试验，及时递交试验结果和相关记录。

12.2.2.3 应根据外部评审、能力验证、考核、比对等结果来评估本实验室的工作质量并采取相应的改进措施。

12.2.3 结果可比性

进行实验室内部比对，主要包括实验室内部不同人员、设备的比对。

12.3 分析后质量控制

分析后质量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、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，针对异常记录，应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。

附　录　A
（资料性）
呼吸道感染病原体靶向二代测序申请单模板

表A.1给出了呼吸道感染病原体靶向二代测序申请单模板，可不限于下列形式。

表 A.1 呼吸道感染病原体靶向二代测序申请单模板

<table>
<tr><td colspan="2">*受检者信息</td><td>*姓名：　　　　*性别：　　　　*年龄：　　　　*发病时居住地：
*联系人电话：　　　　*门诊/住院号：　　　　*身份证号：</td></tr>
<tr><td colspan="2">*标本信息</td><td>*标本类型：☐BALF ☐痰液 ☐气管吸引物 ☐鼻咽拭子 ☐口咽拭子 ☐鼻咽吸取物 ☐组织 ☐其他：
*采样时间：　年　月　日　*送检时间：　年　月　日</td></tr>
<tr><td colspan="2">送检单位信息</td><td>医院名称：　　　　送检医生姓名：　　　　科室：　　　　医生电话：</td></tr>
<tr><td rowspan="3">临床信息（可附病历）</td><td>疾病信息</td><td>初步诊断：
现病史：
既往史：
流行病学史：
重点关注病原体：☐细菌　☐真菌　☐支原体/衣原体　☐病毒　☐分枝杆菌</td></tr>
<tr><td>辅助检查</td><td>体温：
血常规：
白细胞（绝对值和百分比）：　　　　中性粒细胞（绝对值和百分比）：
淋巴细胞（绝对值和百分比）：　　　　单核细胞（绝对值和百分比）：
CRP（mg/L）：　　　　PCT（ng/mL）：
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：☐阴性 ☐阳性　分子生物学检测：☐阴性 ☐阳性
真菌相关检查：G试验：☐阴性 ☐阳性　GM试验：☐阴性 ☐阳性　隐球菌抗原：☐阴性 ☐阳性
病毒相关检查：
病理结果：
影像学检查：
其他：</td></tr>
<tr><td>近期用药</td><td>抗感染治疗方案：　　　　疗程：　　日</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">补充信息</td><td>暴露情况：☐疫区/境外旅行经历　　☐饲养动物　　☐外伤　　☐插管</td></tr>
<tr><td>免疫相关情况：
☐口服或注射免疫抑制剂　☐接受放/化疗　☐长期使用糖皮质激素　☐先天/后天获得性免疫缺陷
☐其他：</td></tr>
<tr><td colspan="3">注：标注星号(*)的为必填项。</td></tr>
</table>

附 录 B
（资料性）
呼吸道感染病原体靶向二代测序检测报告模板

表B.1给出了呼吸道感染病原体靶向二代测序检测报告模板,可不限于下列形式。

表 B.1 呼吸道感染病原体靶向二代测序检测报告模板

<table>
<tr><td colspan="60">标本信息</td></tr>
<tr><td colspan="15" rowspan="2">受检者信息</td><td colspan="15">姓名：</td><td colspan="15">性别：</td><td colspan="15">年龄：</td></tr>
<tr><td colspan="45">住院号/门诊号：</td></tr>
<tr><td colspan="15" rowspan="2">标本信息</td><td colspan="15">标本条码：</td><td colspan="15">实验编号：</td><td colspan="15">标本类型</td></tr>
<tr><td colspan="15">采样日期：</td><td colspan="15">接收日期：</td><td colspan="15">报告日期：</td></tr>
<tr><td colspan="15" rowspan="2">送检方信息</td><td colspan="45">送检医院：</td></tr>
<tr><td colspan="30">送检科室：</td><td colspan="15">送检医生：</td></tr>
<tr><td colspan="15">临床信息</td><td colspan="45"></td></tr>
<tr><td colspan="60">病原体检测结果</td></tr>
<tr><td colspan="15">分类</td><td colspan="15">属名</td><td colspan="15">种名</td><td colspan="15">均一化序列数[a]</td></tr>
<tr><td colspan="15">**</td><td colspan="15">**</td><td colspan="15">**</td><td colspan="15">**</td></tr>
<tr><td colspan="60">耐药基因检测结果</td></tr>
<tr><td colspan="60"></td></tr>
<tr><td colspan="60">病原体解释</td></tr>
<tr><td colspan="60"></td></tr>
<tr><td colspan="60">检测质控</td></tr>
<tr><td colspan="12">总序列数</td><td colspan="12">Q30比率（%）[b]</td><td colspan="12">内参检测结果</td><td colspan="12">阳性对照</td><td colspan="12">NTC结果</td></tr>
<tr><td colspan="12">合格</td><td colspan="12">合格</td><td colspan="12">合格</td><td colspan="12">合格</td><td colspan="12">合格</td></tr>
<tr><td colspan="60">主检单位信息</td></tr>
<tr><td colspan="10">主检人</td><td colspan="10">审核人</td><td colspan="10">批准人</td><td colspan="10">主检实验室</td><td colspan="10">地址</td><td colspan="10">联系方式</td></tr>
<tr><td colspan="10">**</td><td colspan="10">**</td><td colspan="10">**</td><td colspan="10">**</td><td colspan="10">**</td><td colspan="10">**</td></tr>
<tr><td colspan="60">检测说明</td></tr>
<tr><td colspan="60">1.本检测应用基于多重PCR的靶向二代测序技术（targeted next-generation sequencing,tNGS）对常见病原体进行检测，通过生物信息分析鉴定标本中病原体，辅助临床医生进行诊断和制定个体化精准治疗方案。
2.本检测病原体包含：（可单独列表）。范围外的病原体无法检测。
3.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。
4.本检测检出限为：***copies/mL，低于检出限的病原体可能无法检出。
5.本报告仅对本次送检标本负责，无检测人或审核人签字、涂改以及内容缺损无效。
6.临床医生应综合患者症状/体征、病史、其他实验室检测结果等情况进行诊断，本检测报告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。
7.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。</td></tr>
<tr><td colspan="60">检测范围</td></tr>
<tr><td colspan="15">细菌</td><td colspan="45">**</td></tr>
<tr><td colspan="15">真菌</td><td colspan="45">**</td></tr>
<tr><td colspan="15">病毒</td><td colspan="45">**</td></tr>
<tr><td colspan="15">耐药基因</td><td colspan="45">**</td></tr>
<tr><td colspan="60">[a] 均一化序列数指每***的原始序列中含有该病原体的序列数，均一化序列数数值越高，则反映该病原体的检测信号越强。
[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。</td></tr>
</table>

参 考 文 献

[1] GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法.

[2] 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.

[3] 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.

[4] GB/T 42066—2022 急性病毒性感染呼吸道样本采集.

[5] WS/T 499—2017 下呼吸道感染细菌培养操作指南.

[6] 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.

[7] YY/T 1182—2010 核酸扩增检测用试剂（盒）.

[8] YY/T 1725—2020 细菌和真菌感染多重核酸检测试剂盒.

[9] CNAS-CL02：医学实验室质量和能力认可准则.

[10] CNAS—GL050：医学实验室分子诊断领域认可指南.

[11] CNAS—GL039：分子诊断检验程序性能验证指南.

[12] CNAS-CL04：标准物质/标准样品生产者能力认可准则.

[13] T/GDPMAA 0012—2023：高通量基因测序项目分类.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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].

[19] 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.

[20] 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.

[21] 谢正德,邓继岿,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.

[22] 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.

[23] 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.

[24] 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.

[25] 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).

[26] 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.

[27] 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.

[28] 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.

[29] 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.

[30] 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.

[31] 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.

[32] 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.

[33] Boolchandani M ,D'Souza, Alaric W, Dantas G .Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance[J].Nature Reviews Genetics, 2019.