

《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》编制说明

一、编制背景、目的和意义

1.1 项目背景

1.1.1 呼吸系统感染性疾病高发，且病原组成复杂，标本类型多样，给诊断造成较大困难

感染性疾病一直备受临床关注，随着新发病原微生物的出现、耐药病原微生物的增多以及免疫抑制宿主的增加，感染的发病率和死亡率仍居高不下。其中，呼吸系统感染是造成全球死亡人数最多的一类感染。2019 年世界疾病负担研究学会的数据显示，下呼吸道感染（LRTIs）发病率和病死率在成人和儿童中位居第 4 位，2019 年死亡人数达 260 万。此外，据相关文献报道，15%~25%的肺炎都无法明确病原，医疗机构只能凭经验选择抗生素，这也带来了一个全球性难题——抗生素滥用。快速、准确的病原学诊断，能使临床尽早选择敏感的抗感染药物或采取有效、具有针对性的防控措施，是感染性疾病精准化防治的核心。然而，呼吸系统感染具有一定的特殊性：病原组成复杂、标本类型选择多样、存在感染与定植、不同标本类型结果解读原则不尽相同等，这些特点导致病原诊断困难，只有通过快速精准的病原微生物判断，并进行针对性的抗感染治疗，才能达到最佳的临床预后。

1.1.2 有效响应和落实《“十四五”生物经济发展规划》中关于加

快发展高通量基因测序技术的有关要求

在新冠肺炎疫情的冲击和影响下，全球主要国家纷纷加大了对生命科学和生物医药等领域的支持力度，围绕基因组学、精准医疗、生物医药、生物安全等领域的投入不断加大。我国《“十四五”生物经济发展规划》提出，“开展前沿生物技术创新。加快发展高通量基因测序技术，推动以单分子测序为标志的新一代测序技术创新，不断提高基因测序效率、降低测序成本。加强微流控、高灵敏等生物检测技术研发”。明确提出将不断布局和优化具有重大应用前景的前沿生物技术研究。目前我国在生物经济创新发展取得显著成就，技术突破不断涌现，在基因检测已经有了一定优势，但仍然面临不少挑战。

1.1.3 相比传统检测手段，NGS 技术可实现精准快速病原学诊断

传统的病原诊断主要通过形态学、病原培养、血清学、核酸检测等方法，但传统检测方法灵敏性低、耗时长、覆盖致病菌种类少，而随着分子诊断技术发展迅速，特别是二代测序（NGS）技术发展迅猛，将有力推动感染性疾病精准医学发展。近年来，很多独立实验室已广泛开展 NGS 的病原学检测实验，NGS 技术应用的成功案例，对部分感染性疾病的诊断起到决定性作用。尤其对于一些危重症患者、罕见病原微生物感染的患者，NGS 可以快速明确感染病原微生物，帮助医生做到精准诊断，进而精准治疗，减少抗生素的滥用。

1.1.4 靶向二代测序（tNGS）发展较快，但缺乏统一标准

二代测序在感染性疾病上的诊断应用主要为病原宏基因组测序（metagenomics next generation sequencing, mNGS）与靶向二代测序

(targeted next generation sequencing, tNGS)。tNGS 通过结合超多重 PCR 扩增与二代测序两种技术,能够对待测样本中几十种至几百种已知病原微生物及其毒力和/或耐药基因进行检测。采用超多重 PCR 正向富集目标病原,提升检测灵敏度,同时可以排除宿主核酸干扰,经测序和生信分析可实现不同症候群、感染脏器、患者类型等多种临床场景的核心病原鉴定。tNGS 较 mNGS 极大提高了检测敏感性,且可以同时兼顾 DNA 和 RNA 流程,并极大缩短了检测时间,具有性价比高、可定制化的特点,是一个可应用于多场景的技术平台。tNGS 填补了传统病原检测方法和 mNGS 之间的断层,提高感染病原微生物 NGS 检测的可及性和普适性,在临床检验领域正受到越来越多的关注,为病原学诊断提供了一个符合临床思维的新选择方向。

1.2 目的和意义

1.2.1 为快速发展的市场制定统一的参考和指引

目前市场上已有超过 10 家独立实验室提供 tNGS 相关检测服务,市场前景广阔,还有很多独立实验室正在研发计划开展 tNGS 相关检测项目。不同检测机构的术语定义、检测范围、检测流程、检测性能、报告解读上存在较大差异。目前并没有相关的政策与标准来规范检测流程,因此制订标准具有迫切性与必要性。

1.2.2 拟解决的问题

通过本项目的开展,通过联合合作单位制订宣贯 tNGS 的标准,规范检测流程与应用,将有效贯彻落实相关政策规划,有效推动测序技术广泛应用于医学领域,推动生物经济高质量发展,助力我国抢占

战略性新兴产业技术制高点。

二、任务来源

本标准制定项目由广州金域医学检验集团股份有限公司牵头，通过中国医药卫生文化协会实验诊断与社会化服务分会提出申请，在2022年12月通过了协会组织的立项评审，于2023年2月正式立项，项目制定周期18个月。

三、标准编制过程

3.1 标准编制工作组的成立

标准立项后，金域医学即联合业内上下游单位组建了标准编制工作组，召集了内外部多学科、专业的专家共同参与，包括但不限于测序技术、检验、临床等多个方向，分别从技术角度、检验角度、儿科呼吸角度、成人呼吸角度、感染科角度等为标准进行指导。参与人员均来自相关领域资深专家，深耕技术与临床多年，有丰富的标准化工作经验或科研项目工作经验，为该标准的普适性与科学性提供保障，工作组成员及分工见表1。

表1 标准项目编制组成员及分工

序号	姓名	性别	职称/职务	工作单位	工作分工
1	余艳	女	中级检验师/宏基因技术组主任	长沙金域医学检验实验室有限公司	负责项目整体统筹推进
2	李培	女	副主任医师/感染疾病线总监	广州金域医学检验集团股份有限公司	负责标准的方向与内容规划，指导标准的起草(临床应用角度)
3	赵晓涛	女	主任医师、教授/检验科副主任	北京大学人民医院	指导检验过程标准化与结果解读等(检验角度)

序号	姓名	性别	职称/职务	工作单位	工作分工
4	胡敏	女	主任技师/检验科主任	中南大学湘雅二医院	指导检验过程标准化与结果解读等(检验角度)
5	陆小霞	女	主任医师/副院长	武汉儿童医院	指导确认病原微生物范围与结果解读等(儿科呼吸角度)
6	姚欣	男	教授、主任医师/呼吸与危重症医学科主任	江苏省人民医院	指导确认病原微生物范围与结果解读等(成人呼吸角度)
7	胡鹏	男	主任医师/感染科副主任/副院长	重庆医科大学附属第二医院	指导确认病原微生物范围与结果解读等(感染科角度)
8	梁萍	女	成果转化部副部长	广州国家实验室	促进标准在业内实际应用(应用角度)
9	马常钧	男	学会秘书长	广东省呼吸与健康学会	推动标准在业内推广普及(宣传角度)
10	关文达	男	科管部主任	广州呼吸健康研究院	指导确认病原微生物范围与结果解读等(科研角度)
11	李慧源	男	副主任技师/集团副总裁	广州金域医学检验集团股份有限公司	资源协调、标准技术内容审核等(行业角度)
12	张磊	女	主管检验师/微生物学科技术负责人	广州金域医学检验集团股份有限公司	标准内容起草、修改完善及审核(微生物学角度)

3.2 资料的搜集、整理和调研情况

一是搜集国内现行有关基因测序方面的国家标准、行业标准和有关团体标准，作为参考素材；二是整理了业内的相关专家指南/共识。三是以金域医学内部已形成的规范性文件（SOP）作为标准草案撰写依据。综上所述，通过以上工作，完成了前期各项资料和信息搜集整理，为标准的起草奠定了基础。

3.3 标准草案的形成

2022 年 12 月份，草案以金域医学内部已形成的《呼吸道多种病

原微生物靶向测序标准操作流程》与《呼吸道病原微生物多重联合检测数据解读指引》为主要参考，确定了 tNGS 技术的全流程，包括样本核酸提取、建库上机、生信分析、报告解读等检测所有流程步骤，形成了标准草案。

在 2022 年 12 月 22 日、2023 年 6 月 8 日、2023 年 8 月 6 日，三次共组织内外部近 20 名技术专家进行了讨论，收集到相关意见 33 条以上，其中采纳 33 条、部分采纳 0 条、不采纳 0 条，持续优化完善了标准草案。

3.4 标准讨论稿

为进一步优化标准草案的科学性、严谨性，在 2024 年 1 月 11 日、2024 年 5 月 21 日，金域医学组织标准编制工作组专家召开了研讨会，先后邀请了赵晓涛、胡敏、陆小霞、胡鹏、关文达、冯珍如、王雅杰、王艳、赵秀英、胡云建等 14 名专家进行了讨论。通过本次研讨会，共收集到相关意见 91 条以上，其中采纳 82 条、部分采纳 6 条、不采纳 4 条，项目组将相关意见整理成《标准讨论稿反馈意见汇总处理表》，见附件 1。并将标准讨论稿修改完善后，形成了标准征求意见稿，报中国医药卫生文化协会进行审查。

四、编制原则

本文件按 GB/T 20004.1-2016《团体标准化 第 1 部分：良好行为指南》和 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》给出的规则起草。并重点参考 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》、WS/T 640

《临床微生物学检验样本的采集和转运》、WS/T 805《临床微生物检验基本技术标准》等现行国家标准和行业标准。

五、国内外标准情况

国际标准化组织 ISO 对于核酸多重分子检测有相关标准发布,如核酸质量评价的术语和一般要求 (ISO 21474-1:2020)、验证与确认 (ISO 21474-2:2022), 测序相关技术规范有核酸和文库制备 (ISO 20397-1:2022)、测序数据的质量评估 (ISO 20397-2:2021), 基因组信息学方面有 DNA 测序的质量控制指标 (ISO/TS 22692:2020) 和二代测序临床基因组学数据共享规范 (ISO/TS 23357:2023)。

国内高通量测序 (也称为二代测序) 查询到现行 9 项国标, 其中样本前处理有 GB/T 33681.1-2017《高通量基因测序样本预处理方法 第 1 部分: 动物组织样本预处理》, 核酸提取技术规范有 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》, 核酸类样本质量控制通用要求有 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》, 测序技术规程有 GB/T 30989-2014《高通量基因测序技术规程》, 测序结果评价要求有 GB/T 35537-2017《高通量基因测序结果评价要求》, 数据序列格式规范有 GB/T 35890-2018《高通量测序数据序列格式规范》。与宏基因有关的有 GB/T 40226-2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》。微生物高通量方面深圳市生命科技产学研资联盟基于高通量测序的环境微生物检测发布一系列标准。多重核酸检测无医学相关现行国标, 在医药领域现行的行标有 YY/T 1836-2021《呼吸道病毒多重核酸检测试

剂盒》和 YY/T 1725-2020《细菌和真菌感染多重核酸检测试剂盒》。

总体来看，目前在高通量测序方面，国标与团标集中在环境微生物以及粪便微生物检测上，暂未涉及呼吸系统感染样本中检测病原微生物；且检测方法多为宏基因组高通量测序，基于多重 PCR 的靶向二代测序无相关标准发布。

六、标准主要内容

6.1 范围

本标准规定了采用基于多重PCR的靶向二代测序进行呼吸系统临床样本病原微生物检测（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。适用于采用基于多重PCR的靶向二代测序进行呼吸系统临床样本病原微生物检测的医疗卫生机构。

6.2 规范性引用文件

本标准的规范性引用文件有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》、WS/T 640《临床微生物学检验样本的采集和转运》、WS/T 805《临床微生物检验基本技术标准》等。

6.3 术语和定义

本章节对“呼吸系统感染”、“病原微生物”、“多重PCR”、“二代测序”、“靶向二代测序”等12个术语进行定义，其中靶向二代测序(tNGS)为首次在标准中进行定义的术语。

6.4 缩略语

本章节对文中出现的缩略语进行了介绍。

6.5 技术应用

本章节对应用场景、检测范围（分为上呼吸道和下呼吸道）、标本选择进行了介绍。产品的合理应用有助于临床的精准诊断。

6.6 实验原理

本章节对tNGS实验流程中的关键实验技术进行了原理介绍。

6.7 实验室分区、仪器设备及试剂

本章节对实验室的分区原则，仪器设备、试剂进行了规范。

6.8 性能确认

本章节对性能确认时机、参数、生物信息分析流程的性能确认、参考品制备、全流程性能确认等方面进行了建议。

6.9 检验前过程

本章节对呼吸系统tNGS的标本选择、标本采集、保存与转运、检验前过程室内质控进行了规范。标本类型合理的选择和采集有助于检测和诊断的精准性。

6.10 检验过程

本章节对标本处理、核酸提取、文库构建、二代测序、生物信息分析、检验过程室内质控等检验关键流程进行了技术规范。

6.11 检验后

本章节对病原微生物报告流程、结果报告发布、假阴性与假阳性结果处理、临床样本的储存、保留和处置、检验后过程室内质控等进行了规范。

6.12 室间质评

本章节对室间质量评价进行了规范。

七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本文件与相关法律、法规、规章及相关标准协调一致，没有冲突。

八、标准创新点

目前 tNGS 在临床感染诊断中的应用越来越广泛，但并没有针对 tNGS 相关的共识、指南与标准，需要尽快规范该领域标准要求，制定出与市场需求相适应的团体标准，促进技术革新、规范市场秩序、引领行业发展。本标准参考和结合既往指南或专家共识对 tNGS 进行技术规范，具体创新性表现在：

8.1 首次规定了 tNGS 的定义

tNGS 技术将多重 PCR 技术与 NGS 相结合，广泛应用于遗传、肿瘤、感染等领域。然而，目前对于 tNGS 技术尚缺乏统一的术语定义，这对于该领域的发展和标准化构成了一定的挑战。因此，该标准对 tNGS 技术进行了详尽的定义和规范，促进该技术在临床和研究领域的准确应用。

8.2 弥补 tNGS 在呼吸系统感染检测中的标准空缺

tNGS 技术在呼吸系统临床样本中病原微生物的检测方面得到了广泛应用，该技术可以显著提高病原微生物检测的敏感性，且检测用时短，有助于更快速、准确地诊断呼吸系统感染。然而，虽然 tNGS 技术在这一领域表现出巨大潜力，但目前缺乏相关的规范标准、指南和共识。因此，该标准填补了这一空白，为 tNGS 在呼吸系统感染领域的应用提供了必要的指导和规范。

8.3 覆盖检测全过程

该标准对 tNGS 检验的全流程进行了技术规范，包括检验前、检验中和检验后的各个环节。此外，标准还包括性能确认和质量控制的步骤，确保呼吸系统病原微生物检测的准确性和可靠性。这一全面的操作规程和质量保障为 tNGS 技术在呼吸系统感染领域的应用提供了可靠的指导和保障，有助于提高检测结果的准确性和可靠性。

8.4 技术内容适用性强

该标准的技术内容具有广泛的适用性，适用于所有使用基于多重 PCR 技术的靶向二代测序进行呼吸系统病原检测的医疗卫生机构。通过标准化实验室操作，该标准有助于确保不同实验室之间检测结果的一致性和可靠性，促进了呼吸系统病原微生物检测的统一标准和质量保障。这样的标准化措施有助于提高医疗卫生机构内部以及不同机构之间的检测结果的可比性和可靠性。

8.5 对所纳入的病原微生物检测范围有明确建议

目前各医疗机构采用的 tNGS 检测产品在病原微生物检测范围上存在差异，尤其呼吸系统 tNGS 产品的应用最为广泛。该标准根据上、下呼吸道对不同 tNGS 产品纳入病原微生物的检测范围进行了建议，有助于不同医疗机构建立更科学的病原微生物检测体系。这样的建议可以帮助医疗机构选择适合其实际需求的 tNGS 产品，从而更有效地应对呼吸系统疾病的检测和治疗。同时，通过该建议可以降低不同医疗机构使用不同 tNGS 产品所带来的病原微生物检测结果的差异性，增强医疗机构之间的协作和信息共享。

九、重大分歧意见的处理和依据

在标准正文“5.2.1 上呼吸道感染建议纳入病原微生物”部分，有专家认为上呼吸道标本无法获得良好的细菌诊断证据，不建议上呼吸道感染检测范围中纳入细菌。制定工作小组根据参考相关文献如《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)》、《儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识》、《The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease》和《Nasopharyngeal polymicrobial colonization during health, viral upper respiratory infection and upper respiratory bacterial infection》，认为上呼吸道标本通常不推荐用于细菌核酸扩增检测，但也有特殊情况，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；且 tNGS 检测作为分子检测，不作为临床诊断依据，检测结果需要结合临床症状、影像学等进行综合判断。制定工作小组综合考虑后，还是将部分重要细菌纳入到上呼吸道感染建议纳入病原微生物列表中。

在标准正文“8.1.3 下呼吸道感染”部分，有专家认为下呼吸道感染对于咳痰等应该慎重选择，以目前的研究积累，咳痰的细菌、真菌难以获得充分的病原证据。制定工作小组根据参考相关文献如《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》、《中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)》等，认为收集 BALF 需进行有创的纤维支气管镜检查，需考虑患者耐受情况，咳痰、诱导痰或经上呼吸道吸痰标本可作为一种替代标本。

十、涉及专利的有关说明

本标准未涉及有关专利。

十一、标准名称变更

本标准最初拟定的名称为《呼吸系统感染常见病原体靶向二代测序检测方法》，于 2023 年 2 月立项，随后制定组开展了一系列工作。首先通过文献研究、专家调研等共同拟定了《呼吸系统感染常见病原体靶向二代测序检测方法》标准草案，在开展专家研讨会形成标准讨论稿的过程中，根据专家的意见，将本标准的名称由原来的《呼吸系统感染常见病原体靶向二代测序检测方法》更正为《基于多重 PCR 的靶向二代测序检测技术：呼吸系统感染病原微生物检测》来明确技术方法，经过相关专业专家及制定工作小组讨论决定，采纳该意见。

十二、其他需要说明的事项

编制过程中，制定工作小组利用广州金域医学检验集团股份有限公司、长沙金域医学检验实验室有限公司等单位的技术平台，将现有的 tNGS 实验流程进行测试验证，与实验人员、生信团队以及报告解读人员不断沟通磨合，检验该团标的实用性与效果，促进该技术在临床和研究领域的准确应用。

附件：

1. 《标准讨论稿反馈意见汇总处理表》

附件 1：《标准讨论稿反馈意见汇总处理表》

序号	章条号	意见内容	提出人	提出单位	采纳情况	说明
1	标准名称	标准名称再确定一下范围，是检测还是应用。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经修改为“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”。
2	5.1 分区原则	分区需要参考核酸扩增实验室的要求，写原则就好，不用具体展开。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经添加相关描述“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》。”
3	5.2 仪器设备	进行分层:划分一下哪些是必须有，哪些是推荐有。 调整顺序:如核酸纯化仪要放在前面(需要有一定逻辑，比如按照实验室的分区)。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经按照实验室分区进行了划分。
4	5.3 试剂	写的更加详细一些，针对细菌、真菌、病毒进行进一步规定，按照实验过程再明确一下。关于试剂的质量要求，包括 DNA 提取的质量之类。	赵晓涛	北京大学人民医院	部分采纳	1) 已经按照实验流程的顺序对试剂进行了梳理。 2) 试剂部分未对细菌、真菌、病毒进行区分，因为检测前未知类型，tNGS 的检测范围包括细菌、真菌、病毒（包括 DNA 病毒和 RNA 病毒），在提取时采取的是 DNA 和 RNA 共提取的方案，未对试剂进行区分。
5	框架结构	实验原理应该写在最前面。性能验证、性能确认，是实验室建立的时候。逻辑关系，需要盘点和梳理，实验室建立和临床应用部分需要有区分。调整逻辑关系。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经将实验原理部分调整至前面“6 实验原理”。添加了“5 技术应用”。对全文的逻辑进行了梳理和修改。

序号	章条号	意见内容	提出人	提出单位	采纳情况	说明
6	6.3 引物设计	引物设计是试剂盒方面的写法，不是检测方法，因为在检测方法应用时，实际上已经有试剂盒了。不可能在做实验的时候，才去设计引物。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	引物设计部分属于试剂盒部分，该标准的侧重点在检测方面，所以删除了引物设计这一部分。
7	7.5 生信分析	生信数据的管理是否可以统一写在一起（后面 8 检验后也还有部分内容）。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经将生信数据管理部分进行了合并并在“10.6 生物信息分析”部分。
8	8.1.3 阳性病原微生物确认	阳性病原微生物确认再斟酌下里面的描述。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经将这一段内容整体进行修改。
9	8.1.5 临床样本的储存、保留和处置	补充一下追加实验的期限和实验后保存的期限。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已经添加相关描述。
10	9.2 仪器的性能确认	仪器的性能验证是厂家做的，实验室做的应该是整个检测系统的性能验证。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已将“仪器的性能验证”部分删除。
11	9.4.3 最低检测限	定原则，不要定量。数值一直会随着技术发展变化，定数值通常是试剂盒标准的写法。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	未进行定量。

序号	章条号	意见内容	提出人	提出单位	采纳情况	说明
12	10 质量控制	质量控制还要补充,除了室内质评外室内质控也是很重要的,包括采样管、保存液、提取等。阳性质控和阴性质控怎么做、频率、微生物等。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	新增了“室内质控”相关内容,样本采集容器、采样液、采样拭子等要求添加到“5.3.4 采样耗材”部分。
13	10 质量控制	文中防污染还是不够,需要重点去写。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	新增了相关内容。
14	附录 A	申请单,改变表述方式和内容。	赵晓涛	北京大学人民医院	采纳	已增加相关描述“第三方送检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)”。
15	6.1 应用场景	应用场景与检测范围保持一致性,有连贯性。	胡鹏	重庆医科大学附属第二医院	采纳	已经将应用场景分为上呼吸道和下呼吸道进行展开描述。
16	6.2 检测范围	表格中所纳入的病原的纳入原则要有明确的出处和依据。加一句话解释一下纳入病原的依据。	胡鹏	重庆医科大学附属第二医院	采纳	在原文中加入“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。”“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。”
17	3.6 文库	具体指什么?	陆小霞	武汉儿童医院	采纳	已经具体到“测序文库”,对“测序文库”进行了定义。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/758036041023006120>