

· 标准与规范 ·

# 靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识

中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会

通信作者:王辉,北京大学人民医院检验科,北京 100044, Email:whuibj@163.com;  
曹彬,中日友好医院呼吸与危重症医学科,北京 100029, Email:caobin\_ben@163.com

**【摘要】** 靶向高通量测序(tNGS)技术通过设计特异性引物或捕获探针,靶向检测临床标本中的病原体及其耐药基因,为感染性疾病的诊疗、监测提供证据。然而当前tNGS和宏基因组高通量测序(mNGS)临床应用场景不明确,且不同厂家tNGS技术体系差异大,结果良莠不齐,在临床适应证、实验流程、质量控制、性能验证和报告解读等方面缺乏共识和标准。为了更好地指导我国tNGS的临床实践,中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会邀请微生物学、感染病学、呼吸病学、流行病学等领域的专家共同研讨和参与制订《靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识》。本指南系统归纳了国内外tNGS在感染性疾病中的研究,提出符合我国临床实践的推荐意见,主要包括:共识制订过程、临床适应证、技术要点、湿实验与干实验、报告发放与解读和报告模板,以期规范tNGS在感染性疾病中的应用和实践。

**【关键词】** 感染; 靶向高通量测序; 病原检测; 耐药检测; 病原监测

**基金项目:**国家自然科学基金(82341107);国家重点研发计划(2022YFA1304300)

**实践指南注册:**国际实践指南注册与透明化平台(PREPARE-2024CN1020)

## Expert consensus on the application and practice of targeted next-generation sequencing in infectious diseases

Society of Clinical Microbiology of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare

Corresponding authors: Wang Hui, Department of Clinical Laboratory, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China, Email: whuibj@163.com; Cao Bin, Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China, Email: caobin\_ben@163.com

**【Abstract】** Targeted next-generation sequencing (tNGS) technology focuses on detecting pathogenic microorganisms and drug-resistant genes in clinical samples by designing specific primers or capture probes, providing evidence for the diagnosis, treatment and surveillance of infectious diseases. However, the current clinical application scenarios of tNGS and metagenomic next-generation sequencing (mNGS) are not clearly defined, and the tNGS systems from different manufacturers vary significantly in quality and results. There is an urgent need for consensus and standards regarding the clinical indications, laboratory processes, quality control, performance validation and interpretation of reports for this technology. In order to standardize the application and practice of tNGS in infectious diseases, experts in the fields of microbiology, infectious disease, respiratory disease, epidemiology and other fields from the Society of Clinical Microbiology of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare discussed the above problems, wrote the expert consensus on the application and practice of tNGS in infectious diseases.

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20240927-02208

收稿日期 2024-09-27 本文编辑 管文敏、吕相征

引用本文:中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会. 靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识[J]. 中华医学杂志, 2024, 104(48): 4375-4383. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20240927-02208.



中华医学会杂志社  
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



This consensus summarizes the research on tNGS in infectious diseases, and proposes recommendations that are in line with clinical practice in China, so as to standardize the application and practice of tNGS in infectious diseases. The main contents include: consensus formulation process, clinical indications, technical points, wet and dry experiments, report and interpretation, and report template.

**【Key words】** Infection; Targeted next-generation sequencing; Pathogen detection; Anti-microbial resistance detection; Pathogen surveillance

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82341107); National Key Research and Development Program of China (2022YFA1304300)

**Practice guideline registration:** Practice Guideline REgistration for TransPAREncy (PREPARE-2024CN1020)

高通量测序(NGS)技术为临床感染性疾病提供了高通量检测技术手段,主要包括宏基因组高通量测序(mNGS)、靶向高通量测序(tNGS)和全基因组测序(WGS)。tNGS和mNGS通量高,可一次性检测百种以上病原<sup>[1-3]</sup>。两者不同之处在于,mNGS为鸟枪法测序,无需预设待检病原,但易受人源背景干扰。而tNGS通过特异性引物扩增或者杂交捕获的方式靶向富集目标病原体或基因,测序量仅为mNGS百分之一,成本低且同一流程可检测DNA和RNA病原。

tNGS按照技术路线可分为多重PCR扩增法和探针捕获法。多重PCR扩增法通过设计特异性引物进行超多重PCR扩增富集目标病原体的靶核苷酸序列,而探针捕获法则通过探针杂交捕获的方式进行富集。多重PCR扩增法比探针捕获法成本更低且速度更快,工作流程更简单,起始量要求更少,但覆盖的靶病原体不如探针捕获法多。探针捕获的靶区范围更广,使用随机打断的文库构建方式使文库片段多样性比多重PCR扩增法更高,显著减少PCR冗余扩增导致的完全重复序列<sup>[4]</sup>。尽管tNGS已用于病原检测,但临床适应证不明确,检测质量参差不齐,检测报告不规范,临床解读困难。因此,制订旨在规范临床适应证、送检要求、tNGS检测流程、报告发放和结果判读的共识,可为感染性疾病的病原学诊断提供重要依据。为此,中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会邀请微生物学检验、感染病学、呼吸病学、流行病学等领域的专家共同参与制订本共识,以助力tNGS的规范化应用。tNGS与mNGS在术语、检测流程等一致之处,本共识不再赘述,具体可参考mNGS相关团体标准和专家共识<sup>[2,5-8]</sup>。

### 一、共识制订过程

以“targeted next-generation sequencing”  
“metagenomic next-generation sequencing”

“infection” “molecular diagnostic technology” “molecular antimicrobial susceptibility testing”为关键词,检索PubMed、Web of Science检索平台、MedRxiv、中国知网、万方数据知识服务平台和维普数据库自建库至2024年9月的中、英文文献,经去重和同类文献优选等处理,最终纳入符合本共识主题的文献31篇。

本共识由执笔小组撰写初稿,专家组对推荐意见进行首轮讨论、修改和评议,再由执笔小组进行多轮修改,形成修改稿,并进行两次专家评议会,对推荐意见进行现场/远程投票,形成终稿。

第一轮评议专家22位,其中临床专业(包括感染、呼吸、重症专业)8位,微生物学专业9位,其他专业(包括基础医学、公共卫生、生命科学、生物信息专业)5位。初稿推荐共识条目38条。删除12条争议比较大的共识条目。

第二轮评议专家31位,其中临床专业(包括感染、呼吸、重症专业)15位,微生物学专业11位,其他专业(包括基础医学、公共卫生、生命科学、生物信息专业)5位。评议选项包括:同意、不同意、弃权。规则:90%以上评议专家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%以下同意则不纳入共识。

### 二、tNGS应用于感染性疾病诊断的临床适应证

目前,tNGS可用于如下3类场景:感染性疾病病原体检测、耐药基因检测、公共卫生流行病学病原监测。

#### (一)病原诊断适应证

临床应充分了解并选用合理设计的tNGS技术,不同类型感染,例如呼吸道感染、中枢神经系统感染等常见病原谱不同,因此tNGS微生物靶标设计应充分考虑感染性疾病症候群的流行病学数据,涵盖该症候群临床常见病原体,不建议纳入某症候



群中无临床意义的微生物。目前,tNGS可以作为重要的辅助诊断手段,但不能单独作为确诊或排除的证据。

**共识 1:**tNGS的应用场景应与 mNGS有所区别和侧重。对于非重症患者,传统微生物学检测阴性时,考虑送检 tNGS;病情危重或新发突发传染病时,考虑送检 mNGS。

对于有创手段获得的标本,tNGS可作为补充手段,提高病原诊断阳性率。此外,临床高度怀疑感染而传统方法难以获得病原学证据时,或已有病原证据疗效不佳疑似发生混合感染或继发其他感染时,可选用 tNGS作补充方法(图 1)。tNGS相比 PCR方法靶标范围更广<sup>[9]</sup>。肺部感染的患者中,tNGS相比传统检测方法具有更高的阳性率(96.7%比 36.8%)<sup>[10]</sup>。

**共识 2:**针对不同的感染部位,建议覆盖相应病原谱的 tNGS,比如肺部感染组套、中枢神经系统感染组套等。靶向病原谱应包括该症候群难培养、罕见的病原,不宜纳入该部位无临床意义的微生物。

一项纳入 177 名受试者 201 份支气管肺泡灌洗液(BALF)标本的研究显示,同临床复合标准相比,tNGS和 mNGS表现相当,一致率分别为 65.6%和

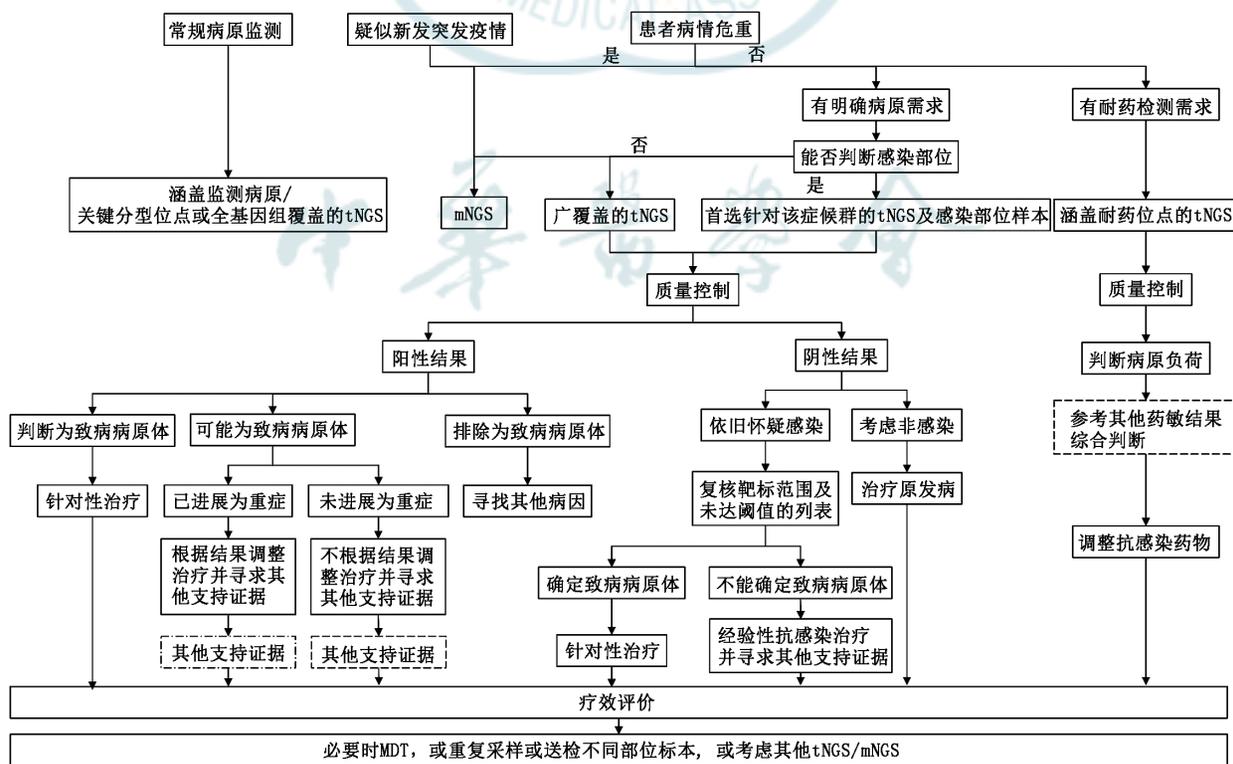
67.1%<sup>[11]</sup>。此外,102 例肺部感染患者的痰液和 BALF 的研究中,tNGS(82.2%,106/129)与 mNGS 阳性率(86.5%,109/126)相当( $P=0.41$ )<sup>[12]</sup>。47 份临床疑似泌尿系统感染的尿液标本结果显示,培养、PCR和 tNGS分别鉴定出 13、19 和 62 种微生物,这提示 tNGS 比常规检测方法检出了更多病原<sup>[13]</sup>。

**共识 3:**tNGS结果阴性而临床仍高度怀疑感染时,考虑送检 mNGS。

tNGS相比 mNGS,检测靶标覆盖范围有限,且其检测性能受到引物和探针特异性、扩增和捕获效率的影响。目前各厂家 tNGS 性能良莠不齐。临床医师要充分了解每家产品的靶标覆盖、检测性能等。tNGS 阴性,可能是由于靶标不够或性能不佳。

**共识 4:**建议根据临床需求和医疗花费选择不同 tNGS 方法。多重 PCR 扩增 tNGS 方法靶标少,花费较低,而探针捕获 tNGS 方法覆盖病原谱广,花费较高。

多重 PCR 扩增 tNGS 方法通常基于临床已知致病病原序列设计,且相比于探针捕获法,实验流程相对简单,对于临床常见病原感染的判定来说更具经济性。而探针捕获 tNGS 方法的优势在于能够覆盖的基因组范围更大,污染少且容错性更好,如要求更广的病原谱检测和分析或避免因污染导致的



注:tNGS为靶向高通量测序;mNGS为宏基因组高通量测序;MDT为多学科诊疗

图 1 tNGS/mNGS 选择及 tNGS 临床解读处置流程

假阳性,可考虑优选探针捕获法。

**共识 5:** 临床高度怀疑结核分枝杆菌感染或抗酸染色阳性需鉴别非结核分枝杆菌(NTM)感染时,考虑选用包括结核分枝杆菌复合群及致病性 NTM 的 tNGS。

在鉴别诊断方面,利用 tNGS 方法及时鉴别结核与其他病原体感染,对于结核患者的早期发现和分诊具有重要的临床和流行病学意义<sup>[14]</sup>。tNGS 有助于从(亚)种或复合群水平区分结核分枝杆菌和 NTM。一项纳入 370 株分离株、73 个种/复合群的研究显示,tNGS 与基于表型、rpoB 和(或)16S rDNA 一代测序的复合参比方法相比,292 株结果在(亚)种或复合群水平完全一致。在 10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> 和 10<sup>1</sup> 基因组拷贝的梯度稀释条件下,tNGS 成功鉴定结核分枝杆菌的比例分别为 16/16、13/16 和 0/16,成功鉴定胞内分枝杆菌的比例为 3/3、3/3 和 2/3<sup>[15]</sup>。

## (二)微生物耐药适应证

mNGS 常规数据量对耐药基因检测存在局限性,随机测序的方案仅在高浓度时可稳定检出耐药基因,尤其对于水解酶等耐药机制,mNGS 的读长和测序深度难以分析亚型,因此不建议 mNGS 常规用于耐药基因检测。而 tNGS 检测的靶标相对确定,可将水解酶亚型特定区段作为富集靶标,且相比 mNGS 的耐药基因检测限更低。使用临床标本进行 tNGS 耐药基因检测能获得相对更可靠的耐药结果。

**共识 6:** 结核分枝杆菌培养和药敏试验时间长,建议 tNGS 用于呼吸道标本的结核分枝杆菌鉴定、耐药基因及其突变位点的检测。

2024 年,WHO 推荐 tNGS 用于结核分枝杆菌分子药敏检测<sup>[16]</sup>。经细菌学确诊的肺结核患者,可在呼吸道标本(痰液、BALF 等)中使用 tNGS 技术检测利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺和氟喹诺酮类的耐药性;相关药物的耐药基因靶点应至少包括第一级耐药基因(如 rpoB、inhA、katG、embA、embB、pncA、gyrA、gyrB 等),可参考 WHO 指南推荐<sup>[17]</sup>。经细菌学确诊的利福平耐药肺结核患者,可在呼吸道标本(痰液、BALF 等)中使用 tNGS 技术检测异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、氟喹诺酮类、贝达喹啉、利奈唑胺、氯法齐明、阿米卡星和链霉素的耐药性<sup>[16]</sup>。

此外,当患者体内存在异质性耐药时,研究发现 tNGS 技术通过扩增靶标基因可量化所有结核分枝杆菌中的少量耐药菌。而在耐药菌占比少的情况下,基于扩增曲线的 PCR 技术难以报出耐药性,

且其涵盖耐药靶点有限,导致假敏感<sup>[18-19]</sup>。因此 tNGS 的使用对于早期识别潜在耐药结核、预警临床抗结核治疗失败至关重要。但应注意,tNGS 的耐药检出能力和标本中细菌载量相关<sup>[15]</sup>。

**共识 7:** 临床怀疑特定耐药菌感染,并且耐药基因与耐药表型关联性较强时,可考虑送检 tNGS,作为常规方法的补充。重点关注碳青霉烯酶、超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、万古霉素耐药肠球菌(VRE)等耐药基因和病原体。

美国临床和实验室标准协会(CLSI)M100 文件推荐部分微生物中对以下位点可进行分子检测<sup>[20]</sup>,但 tNGS 需要积累更多证据,且应尽可能明确耐药基因和病原微生物的对应关系。临床重要的耐药基因包括碳青霉烯酶基因(*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>、*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>IMP</sub> 等)、MRSA 耐药基因(*mecA*、*mecC*)、VRE 耐药基因(*vanA*、*vanB* 等)、ESBLs (*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>TEM</sub> 等)。对于基因亚型可导致不同药敏谱的基因,例如检测 *bla*<sub>TEM</sub> 需要能够区分广谱 β-内酰胺酶和 ESBLs,检测 *bla*<sub>KPC</sub> 需要区分普通型(对碳青霉烯耐药,头孢他啶-阿维巴坦敏感)和酶抑制剂耐药型(对头孢他啶-阿维巴坦耐药)等,建议选用可区分酶亚型的 tNGS 方案。一项小样本量研究发现 tNGS 耐药结果和表型药敏在部分标本中一致<sup>[11]</sup>,但实际临床应用尚需更多医学证据的积累和探索。

## (三)流行病学和病原监测适应证

**共识 8:** 进行新型冠状病毒、流感病毒等病毒变异监测时,可考虑选择覆盖基因组全长的 tNGS。

新型冠状病毒疫情推动了 tNGS 应用于人类样本或污水样本新冠病毒谱系变异<sup>[21]</sup>或丰度监测<sup>[22]</sup>、溯源<sup>[23]</sup>和个体治疗监测<sup>[24]</sup>,后逐渐扩展至人感染相关的其他病原<sup>[25]</sup>及环境样本的监测<sup>[26-27]</sup>。上述 tNGS 的主要目的是病原变异监测,因此其探针或引物设计覆盖病原全长,或至少覆盖区分毒株的关键位点。

## 三、tNGS 技术要点

### (一)引物/探针设计

**共识 9:** 建议 tNGS 引物或探针设计遵循特异、保守、碱基均匀的原则,引物/探针及目的片段大小应控制在适当的范围,如扩增子长度宜在 200 bp 内,探针长度宜介于 80~120 bp。引物和探针需完成干实验和湿实验的性能评价。

引物/探针的数量及组合,应考虑但不限于病原鉴定的特异性、敏感性、包容性等。引物/探针的

序列应能够特异性识别目标病原体微生物的基因组序列。靶标区域选择目标病原体所在种或属内保守,但在不同种或属间具有特异性的区域。优选指南、共识或文献中推荐的基因区、多拷贝区域。引物/探针序列中的 ATCG 碱基应均匀分布,GC 含量为 40%~60%,避免出现连续重复序列和严重的二级结构<sup>[14]</sup>,引物和探针的长度越长,特异性越好,但过长的引物和探针容易形成二级结构。

引物和探针的性能评价需通过生物信息分析如采用 Primer BLAST 等软件或者数字参考品进行干实验验证。此外也需要使用标准菌株和临床标本评价引物/探针设计的有效性。

## (二)防污染措施

### 1. 实验室防污染措施

**共识 10:** tNGS 实验过程中靶标被极大富集,核酸污染风险大,建议对实验室环境、试剂、实验操作、废弃物处理等制定严格的防污染制度和预案,并定期监测实验室核酸污染。

场地要求建议参考已发表的专家共识和团体标准中的 mNGS 检测病原微生物的实验室要求<sup>[8,28]</sup>,tNGS 的实验室建设要求和检测流程的质量控制要求可参考已发表的高通量测序专家共识<sup>[29]</sup>。

### 2. 生物信息降噪措施

**共识 11:** 试剂工程菌、背景环境菌、环境中的气溶胶可能导致假阳性结果。建议通过生物信息分析建立试剂和环境的基线数据库,以提高检测准确性和可靠性。

基线数据库主要包括阴性对照基线和历史检测基线两类。阴性对照基线是基于当批阴性质量控制(质控)样本检测到微生物数据建立同批次对照基线。历史检测基线是基于实验室过往积累阴性样本的检出分布数据建立的对照基线。与基线数据比较,进一步确认检测结果的可靠性,并定期总结本实验室常见环境背景菌、试剂工程菌数据库等。

## (三)性能确认

**共识 12:** tNGS 检测中引物/探针、酶等关键原材料或检测流程中关键参数的调整可能影响检测性能。建议每次优化后的试剂和流程进行性能确认。

tNGS 的引物/探针序列和混合比例、酶、磁珠、扩增反应体系各组分比例、标本前处理方法、提取试剂、测序试剂等发生变化都会影响 tNGS 检测结果。确认满足预期技术要求和临床需求的检测试剂和流程不应轻易改变。一旦改变,应在性能满足

预期技术要求和充分的临床验证后方可使用。

性能确认时应选用各种类型的代表性物种进行实验,至少应覆盖 DNA 病毒、RNA 病毒、细菌、真菌等,使用混合病原、同属干扰微生物、不同浓度梯度的人源细胞和病原等确认干扰因素。

## (四)质控

**共识 13:** 建议进行全流程质控,包含阴性对照、阳性对照、内参、数据量、数据质量等,且在临床报告中体现质控结果。

设立质控指标时需要尽可能覆盖临床应用的各种情况,如标本中存在干扰物、仪器效率下降、试剂失效、操作失误等。

## 四、湿实验与干实验

临床标本规范采集的要求与 mNGS 无差异,可参考已有专家共识和行业标准<sup>[2,30]</sup>。

### (一)核酸提取

**共识 14:** 核酸提取试剂盒应兼顾不同病原类型的提取效率,试剂工程菌不应涵盖在靶标范围内。

标本前处理要求和核酸提取注意事项与 mNGS 无差异,建议参考已发表的专家共识<sup>[5]</sup>。

### (二)建库和测序

**共识 15:** 根据不同症候群、靶标范围、扩增富集效率等因素确定文库长度和最低测序数据量;测序平台的选择还应考虑测序准确性、稳定性、测序时间和成本等因素。

不同建库方式获得的文库片段长度不同,测序读长也可能不同。结合文库特点制定合适的读长和数据量是保证分析结果准确的关键。长读长(如 $\geq 100$  bp)对病原微生物鉴定特异性更高,能提高比对的准确性。测序数据量根据不同症候群、扩增或捕获效率等研究确定,至少应满足宣称最低检测限 95% 检出率所需要的最低序列数。

### (三)生物信息学分析

**共识 16:** 为确保数据质量可满足后续分析要求,建议实验室对原始测序数据进行质控和过滤,建立生物信息学数据库和分析流程,并针对此部分进行性能确认与验证。

除常用的生物信息数据过滤软件及流程以外,tNGS 应根据自身的方法学特征(如常见的引物、探针的二级结构)识别或去除人源序列。此外,基于多重 PCR 的 tNGS,应建立引物二聚体数据库,进行引物剪切,以避免非特异扩增导致的假阳性。生物信息分析流程应选择合适比对工具、高质量比对数



数据库以及阳性判断阈值建立和验证<sup>[14]</sup>。

**共识 17:** 建议实验室在国际/国内公认的公共数据库的基础上筛选高质量序列,建立本地化比对参考数据库,可包括耐药基因和毒力基因。tNGS 数据库还应关注引物扩增区域以及探针捕获区域的序列特征,用于病原分型及耐药基因突变位点检测。

数据库建立可参考团体标准和专家共识<sup>[5,8]</sup>。在比对分析时,应关注富集区段的单核苷酸多态性(SNP)变化,这些区段可能包含病原分型的特定区域(如流感病毒的HA基因,NTM的rpoB,hsp65基因)。

#### (四)阳性判断值确定

**共识 18:** 实验室综合考虑标本类型、靶标类型、富集效率等因素,设立不同病原体的阳性判断值,并基于其他实验室检测结果、影像学 and 临床诊断等复合标准优化和确认该阳性判断值。

阳性判断值的确定应包括以下步骤,(1)检出病原二次验证,明确该病原体是否在标本中真实存在:对于常见的病原体,宜选择对应标本类型的体外诊断试剂盒进行验证。对于相对少见、罕见的病原体,可选用一代测序等分子生物学方法进行验证。若临床其他常规检测已有阳性结果,可不作进一步验证。(2)阳性判断值建立:考虑到tNGS方法学靶标较多(通常超过100种)且覆盖较多的罕见病原,对每种病原(特别是罕见)建立阳性判断值较为困难。可根据病原类型、检出效率或同源的引物/探针进行整合。综合临床常规检测结果和二次验证结果,进行受试者工作特征(ROC)曲线分析以确定阳性判断值和分析性能<sup>[14]</sup>。(3)结合影像学、病理学和临床诊断等复合标准,综合判断该病原的致病可能,确定其临床诊断性能。

**共识 19:** 实验室应建立用于监测和管理生物信息学分析程序、流程及数据库的版本号,并记录版本日志,以保证报告的可复现性和可信度。

**共识 20:** 实验室应对生物信息分析的结果进行解释和验证,包括解释检出的微生物物种、基因以及突变位点的生物学和生物信息学的意义。

**共识 21:** 测序数据可考虑以fastq或bam格式双份存储于不同的储存介质,同时做好软件账户的访问权限控制。为保证数据安全,推荐部署本地服务器,并与外部网络物理隔离。

#### 五、报告发放与解读

tNGS的报告发放和解读团队包括微生物实验室技师/医师和临床医师。相比mNGS,在报告发放

和解读的过程中应额外考虑tNGS的病原覆盖范围是否已涵盖临床关注的病原体、预设病原靶标的覆盖度等。

报告发放与解读的关键步骤包括:基于质控信息判定结果可靠程度、病原微生物注解致病性分级、责任病原体临床判读、阴性结果临床判读、耐药基因信息判读、多学科会诊和总结(必要时)。

#### (一)报告发放

1. 基于质控信息判定结果可靠程度:报告发放应充分考虑检测质控的关键指标参数,包括测序质量(Q30等)、测序数据量、内参、序列特异性、覆盖度、覆盖随机性、阳性判断值等。

#### 2. 病原微生物注解致病性分级

**共识 22:** 建议对报出的微生物致病性给出初步注解,分为致病性微生物、条件致病微生物或定植微生物。

3. 其他报告发放注意事项包括:报告发放人员应熟悉病原微生物的生物学特性,可检索与患者感染相关的信息,结合病原解析库发放报告,及时与临床医师沟通讨论,建立快速便捷反馈通道。

#### (二)责任病原体临床判读和处置

#### 1. 责任病原体临床判读

**共识 23:** 建议结合标本类型、病原种类、均一化序列数等指标进行报告解读,在临床信息基础上判断该病原的致病等级。

理论上,针对不同症候群的tNGS在设计时已排除不相关的微生物,但仍有部分靶标微生物检出不一定致病,需要综合临床信息判断。如遇罕见/少见病原,可查询文献、CAP-CHINA等网站,寻找文献支持;并及时与临床沟通,询问相关接触史、旅行史等信息。

对于高致病性或常规方法检测困难的微生物,如结核分枝杆菌、诺卡菌属、隐球菌属、毛霉菌等,检出序列数较低,也需要考虑其为致病微生物的可能性,必要时可寻求其他临床证据。应注意,不同标本的tNGS序列数不具有可比性,不能仅依靠序列数判断感染状态。

#### 2. 责任病原体临床处置

如确定为致病微生物,根据tNGS报告的结果进行针对性治疗。

如判断为可能致病微生物,对于危重症患者,结合临床特征调整治疗方案,同时寻求其他支持证据;对于非危重症患者,可先寻求其他支持证据,再调整治疗方案。

应密切关注患者治疗效果,如已采取针对性治疗但临床治疗无效,可再次积极与其他病因相鉴别,重复采样、或送检不同部位标本、或更换其他 NGS 方案进行复测。

### (三)阴性结果临床判读和决策

**共识 24:** 阴性结果不建议单独作为排除依据,应结合 tNGS 的靶标覆盖范围、标本类型和其他临床辅助检查进行综合判断。

假阴性结果常见于:(1)设计问题导致:tNGS 靶标未覆盖该微生物;(2)湿实验技术问题导致:破壁困难导致核酸未彻底释放、微生物含量过低、标本采样不规范、存储或运输不当等;(3)干实验问题导致:微生物序列的不完整性、比对数据库未纳入等。

经临床判读后仍高度怀疑感染性疾病,应及时确认 tNGS 靶标覆盖范围、查看 tNGS 原始检出病原列表。可在经验性治疗的同时完善其他检查,必要时重复采样、或送检不同部位标本、或更换其他 NGS 方案进行复测(图 1)。

### (四)耐药基因判读

**共识 25:** 建议结合相对应的病原微生物均一化序列数、耐药机制、tNGS 的探针/引物设计靶标范围综合解读耐药基因检测结果。

对于结核分枝杆菌耐药检测,耐药结果显示阳性可作为耐药或异质性耐药参考依据,但耐药结果显示阴性应考虑结核分枝杆菌的载量,评判是否因检测序列数过少导致的假敏感,并参考其他分子或表型药敏结果。

对于其他细菌耐药结果,应考虑耐药机制,例如检测到耐药基因并不能直接确定该基因是否表达,无法得出药敏表型;需要区分亚型的水解酶等耐药机制,需要参考序列数和覆盖度等指标进行置信度评估。

### 六、报告模板

**共识 26:** tNGS 报告单建议标注使用的 tNGS 方法(探针捕获/多重 PCR 扩增),并可考虑分为以下主要部分:临床诊断、标本信息、病原微生物检测结果、耐药/毒力基因检测结果和病原致病性。

多重 PCR 扩增 tNGS 方法,建议报告:病原类型、中英文名称、耐药基因、毒力基因、均一化序列数、扩增的引物数/靶标预设的引物数、阳性判断值、特异性序列长度和致病性(扫描本文首页二维码可浏览附录 1:多重 PCR 扩增 tNGS 报告单模板),并在报告附录中明确覆盖的病原体及耐药基因列表。

探针捕获 tNGS 方法,建议报告:病原类型、中英文名称、耐药基因、毒力基因、均一化序列数、阳性阈值、覆盖度(基因组覆盖度或探针富集区域的覆盖度)、特异性序列长度和致病性(扫描本文首页二维码可浏览附录 2:探针捕获 tNGS 报告单模板)。

耐药基因检测结果应列明基因名称、疑似关联微生物、关联药物。单碱基突变导致的耐药应标注基因突变位点信息。其余可选内容包括:序列数、置信度、突变类型、突变频率、提示临床关注的重点耐药情况,如碳青霉烯酶等。

质控信息等关键性的参数信息也应展示在报告单中。应对关键参数,如均一化序列数、丰度、覆盖度、置信度等的计算方法或报告规则,以及检测方法的覆盖范围和局限性等进行说明和描述。

### 七、前景展望

随着技术的发展和临床经验的积累,tNGS 在感染性疾病诊断和管理中的应用将更加广泛和精准,通过深入研究、临床实践的累积、抑或与人工智能(AI)的结合,tNGS 将为我们提供更加精准和高效的感染性疾病管理策略。

在自动化方面,自动化仪器设备能够精确控制实验流程,不仅减少了实验人员的工作强度,缩短实验周期,提高实验效率,还能够避免人为因素带来的误差,提高实验结果的准确性。实时监测、控制实验过程,有效降低污染风险,保护实验人员的安全和环境的可持续性。

在 AI 方面,AI 技术有望提升感染性疾病的诊断、治疗和管理水平,使用机器学习算法分析 tNGS 数据,迅速识别和分类病原体;分析基因组数据,预测病原体的抗生素耐药性;对 tNGS 数据进行实时分析,帮助公共卫生机构监测疾病传播趋势,识别暴发点,并制定控制措施等<sup>[31]</sup>。

此共识旨在为 tNGS 技术在感染性疾病病原诊断、耐药基因检测和流行病学研究领域的应用提供指导和建议,将不断根据新的科研成果和技术进步进行更新和完善。

### 本共识制订专家组成员

**执笔者:** 陈宏斌(北京大学人民医院检验科);尹玉瑶(北京大学人民医院检验科);郭一凡(北京大学人民医院检验科)  
**共识编写组成员(按姓氏汉语拼音排序):** 曹彬(中日友好医院呼吸与危重症医学科);陈宏斌(北京大学人民医院检验科);陈衍(浙江大学附属邵逸夫医院肝病感染科);范红(四川大学华西医院呼吸与危重症医学科);谷丽(首都医科大学附属北京朝阳医院感染和临床微生物科);郭一凡(北京

大学人民医院检验科);李敏(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科);李明锐[中国科学院北京基因组研究所(国家生物信息中心)];李轶(河南省人民医院检验科);梁冠翔(清华大学医学院传染病研究中心);廖康(中山大学附属第一医院检验科);刘波(淮坊市人民医院呼吸与危重症医学科);刘东来(中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所);鲁炳怀(中日友好医院呼吸与危重症医学科);宁永忠(清华大学附属垂杨柳医院检验科);余丹阳(解放军总医院呼吸与危重症医学科);沈宁(北京大学第三医院感染疾病中心);苏欣(南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸与危重症医学科);王辉(北京大学人民医院检验科);王新宇(复旦大学附属华山医院感染科);王一民(中日友好医院呼吸与危重症医学科);王璋(华南师范大学生命科学学院);吴林寰(中国科学院微生物研究所);吴文娟(同济大学附属东方医院南院检验科);徐金富(复旦大学附属华东医院呼吸科);杨青(浙江大学医学院附属第一医院检验科);尹玉瑶(北京大学人民医院检验科);应斌武(四川大学华西医院检验科);余方友(同济大学附属上海市肺科医院检验科);曾吉(武汉市第四医院华中科技大学同济医学院附属普爱医院检验科);张嵘(浙江大学医学院附属第二医院检验科);张玉林(中日友好医院呼吸与危重症医学科);赵鸿(北京大学第一医院感染疾病科);赵慧颖(北京大学人民医院重症医学科);周海健(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所);周华(浙江大学医学院附属第一医院呼吸内科);卓超(广州医科大学附属第一医院感染内科)

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Reprint of "Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention"[J]. *J Biotechnol*, 2017, 250:2-10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.03.035.
- 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): 322-335. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20220701-00553.
- 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.
- Pei XM, Yeung M, Wong A, et al. Targeted sequencing approach and its clinical applications for the molecular diagnosis of human diseases[J]. *Cells*, 2023, 12(3): 493. DOI: 10.3390/cells12030493.
- 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.
- 中华医学会细菌感染与耐药防治分会. 呼吸系统感染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.
- 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): 799-807. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20210322-00178.
- 中华预防医学会. 基于高通量测序的病原体筛查通用准则(T/CPMA 010-2020)[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(6): 738-740. DOI: 10.13350/j.cjpb.210626.
- Almas S, Carpenter RE, Singh A, et al. Deciphering Microbiota of Acute Upper Respiratory Infections: A Comparative Analysis of PCR and mNGS Methods for Lower Respiratory Trafficking Potential[J]. *Adv Respir Med*, 2023, 91(1): 49-65. DOI: 10.3390/arm91010006.
- Deng Z, Li C, Wang Y, et al. Targeted next-generation sequencing for pulmonary infection diagnosis in patients unsuitable for bronchoalveolar lavage[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2023, 10: 1321515. DOI: 10.3389/fmed.2023.1321515.
- Gaston DC, Miller HB, Fissel JA, et al. Evaluation of Metagenomic and Targeted Next-Generation Sequencing Workflows for Detection of Respiratory Pathogens from Bronchoalveolar Lavage Fluid Specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2022, 60(7): e0052622. DOI: 10.1128/jcm.00526-22.
- Li S, Tong J, Liu Y, et al. Targeted next generation sequencing is comparable with metagenomic next generation sequencing in adults with pneumonia for pathogenic microorganism detection[J]. *J Infect*, 2022, 85(5): e127-e129. DOI: 10.1016/j.jinf.2022.08.022.
- Almas S, Carpenter RE, Rowan C, et al. Advantage of precision metagenomics for urinary tract infection diagnostics[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1221289. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1221289.
- Yin Y, Zhu P, Guo Y, et al. Enhancing lower respiratory tract infection diagnosis: implementation and clinical assessment of multiplex PCR-based and hybrid capture-based targeted next-generation sequencing[J]. *EBioMedicine*, 2024, 107: 105307. DOI: 10.1016/j.ebiom.2024.105307.
- Jouet A, Gaudin C, Badalato N, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs[J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(3): 2002338. DOI: 10.1183/13993003.02338-2020.
- World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 3: diagnosis-rapid diagnostics for tuberculosis detection, 3rd ed[EB/OL]. [2024-03-20]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240089488>.
- World Health Organization. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance: 2nd ed[EB/OL]. [2023-11-15]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.
- Ng K, Supply P, Cobelens F, et al. How Well Do Routine Molecular Diagnostics Detect Rifampin Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis? [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(11): e00717-00719. DOI: 10.1128/JCM.00717-19.
- Penn-Nicholson A, Georghiou SB, Ciobanu N, et al. Detection of isoniazid, fluoroquinolone, ethionamide, amikacin, kanamycin, and capreomycin resistance by the Xpert MTB/XDR assay: a cross-sectional multicentre diagnostic accuracy study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2022,



- 22(2):242-249. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00452-7.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 34th ed [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.
- [21] Viana R, Moyo S, Amoako DG, et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa[J]. Nature, 2022, 603(7902): 679-686. DOI: 10.1038/s41586-022-04411-y.
- [22] Baaijens JA, Zulli A, Ott IM, et al. Lineage abundance estimation for SARS-CoV-2 in wastewater using transcriptome quantification techniques[J]. Genome Biol, 2022, 23(1):236. DOI: 10.1186/s13059-022-02805-9.
- [23] Hoang VT, Assoumani L, Delerce J, et al. Introduction of the SARS-CoV-2 Beta variant from Comoros into the Marseille geographical area[J]. Travel Med Infect Dis, 2022, 46:102277. DOI: 10.1016/j.tmaid.2022.102277.
- [24] Gandhi S, Klein J, Robertson AJ, et al. De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1547. DOI: 10.1038/s41467-022-29104-y.
- [25] Lee M, Choi CH, Kim JW, et al. Prolonged viral shedding in an immunocompromised Korean patient infected with hMPXV, sub-lineage B.1.3, with acquired drug resistant mutations during tecovirimat treatment[J]. J Med Virol, 2024, 96(3):e29536. DOI: 10.1002/jmv.29536.
- [26] Harrington A, Vo V, Papp K, et al. Urban monitoring of antimicrobial resistance during a COVID-19 surge through wastewater surveillance[J]. Sci Total Environ, 2022, 853: 158577. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158577.
- [27] Kantor RS, Jiang M. Considerations and Opportunities for Probe Capture Enrichment Sequencing of Emerging Viruses from Wastewater[J]. Environ Sci Technol, 2024, 58(19):8161-8168. DOI: 10.1021/acs.est.4c02638.
- [28] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(12): 1181-1195. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704.
- [29] 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(4):454-465. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20230720-00019.
- [30] 北京大学人民医院, 中日友好医院, 安徽省立医院, 等. WS/T 640-2018 临床微生物学检验样本的采集和转运[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [31] 王成彬. 高通量测序技术在临床感染性疾病实验室诊断中的应用[J]. 中华医学杂志, 2023, 103(15):1087-1091. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20220915-01955.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中华医学杂志》“看图知病”栏目征稿

医学图像的解读在疾病诊断、疗效评估及预后判断中起着至关重要的作用,是临床医师需要掌握的核心技能。中华医学杂志特开辟“看图知病”栏目,征集对临床实践有重要借鉴意义的典型病例图像资料。

1. 病例选择:(1)特殊、少见病例的典型表现;(2)诊断明确,一般要求有病理诊断;(3)图像可为影像图、病理图、照片图等,对临床工作有实际借鉴价值。

2. 写作格式:(1)文题为“疾病或症状名称”,例如“声带息肉导致气道阻塞”“脂性渐进性坏死”等;(2)简明扼要介绍病例特征,正文字数控制在400~600字为宜(包括年龄、性别、就诊地点、相关体格检查和实验室检查结果、诊疗经过、治疗反应和随访结果等),文中需说明该图像最重要的特征;

(3)不进行讨论;(4)不标注参考文献;(5)不提供摘要;(6)图片数量如非必要不超过2幅,图片清晰、典型,无杂乱背景,图中有箭头或标注者需在文中注解;(7)图片可为jpg、tif、png等格式,原图作为附件上传(如有视频资料也可作为附件上传);(8)作者数量原则上1~2位,提供单位名称和Email。

3. 投稿方式:通过本刊官网(网址:<https://www.nmjcn.net>)或中华医学会杂志社学术期刊服务平台投稿(网址:<https://medpress.yiigle.com/>),投稿栏目选择“看图知病”。

4. 说明:本栏目稿件不收取审稿费及稿件处理费,将按快速通道流程处理,亦需通过内审、外审及定稿会等三审五定流程,编辑合格后尽快刊出。刊出后付作者稿酬50元/篇。

