



广东省血液微生物 cfDNA 宏基因组高通量测序室间  
质量评价预研活动结果报告

# 广东省血液微生物 cfDNA 宏基因组高通量测序室间质量评价预研活动结果报告

血浆游离 DNA（cfDNA）宏基因组高通量测序（mNGS）可为多种类型血流感染病例的临床诊断提供重要的病原学依据。然而 mNGS 检测流程非常复杂，从核酸提取、文库制备到生物信息分析，任一环节的差异都可能显著影响最终结果的敏感性与特异性。不同实验室间的检测结果差异较大。为了解广东省内 mNGS 实验室检测血浆微生物 cfDNA 的现状，广东省临床检验中心开展了血液微生物 cfDNA 宏基因组高通量测序室间质量评价预研活动，要求各实验室使用日常所用试剂和流程进行检测并回报检测结果。本次活动的总结如下：

## 一、预期结果

### （一）样本信息

本次预研活动共发放 7 个模拟血浆样本（mNGS20250201-mNGS20250207）和 1 个阴性质控(02NC)，02NC 仅用于与其他样本做配对分析，无需报告结果，各样本组分见表 1。样本规格和检出要求见表 2。

表 1 样本预期结果（单位：copies/mL）

	mNGS20250201	mNGS20250202	mNGS20250203	mNGS20250204	mNGS20250205	mNGS20250206	mNGS20250207
金黄色葡萄球菌	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	/	/	/	/	/
结核分枝杆菌	/	/	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	/
大肠埃希氏菌	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	/	/	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	/
铜绿假单胞菌	/	/	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	/	/	/
光滑念珠菌	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	/	/	/
白色念珠菌	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	/	/	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	/
腺病毒 C 型	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	/	/	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	/
乙型肝炎病毒	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	/	/	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	/
人疱疹病毒 5 型（CMV）	/	/	/	/	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
人源 DNA	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>

表 2 样本信息及检测要求

编号	样本类型	样本体积	检测报告要求
mNGS20250201- mNGS20250206	模拟血浆样本	1 mL	报告检测到的所有微生物
mNGS20250207	模拟血浆样本 (含病例 case1)	1 mL	报告所有微生物并区分疑似病原体
02NC	模拟血浆样本	1 mL	无需报告

## 二、评价方法

### (一) 评价标准

**1. 假阳性结果：**预期结果外的微生物报告判断为假阳性结果。检出 1 个假阳性结果扣 2 分，每个样本最多扣 8 分，7 个样本累计最多扣 45 分。样本中所有微生物的种类见表 3（注意：对人乳头瘤病毒不予评价）。

表 3 各样本应检出的微生物

样本	应检出的微生物
mNGS20250201	金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、光滑念珠菌、白色念珠菌、腺病毒 C 型、乙型肝炎病毒
mNGS20250202	金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、光滑念珠菌、白色念珠菌、腺病毒 C 型、乙型肝炎病毒
mNGS20250203	结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌、光滑念珠菌
mNGS20250204	结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌、光滑念珠菌
mNGS20250205	结核分枝杆菌、大肠埃希氏菌、白色念珠菌、腺病毒 C 型、乙型肝炎病毒、人疱疹病毒 5 型（CMV）
mNGS20250206	结核分枝杆菌、大肠埃希氏菌、白色念珠菌、腺病毒 C 型、乙型肝炎病毒、人疱疹病毒 5 型（CMV）
mNGS20250207	人疱疹病毒 5 型（CMV）

**2. 假阴性结果：**预期结果内的微生物均要求正确报告，未报告即为假阴性结果。报告 1 个假阴性结果扣 2 分，每个样本最多扣 8 分，7 个样本累计最多扣 45 分。

**3. 重复性结果：**mNGS20250201 和 mNGS20250202 是病原体靶标和浓度、以及人源核酸浓度均相同的一组样本，要求上述样本中各微生物的 RPM 比值范围在 0.5-2 之间，不在此比值范围内为不符合结果。RPM 浓度梯度比值共 1 组样本(6 个结果)共计 3 分。1 个不符合结果扣 1 分，此组样本最多扣 3 分。

**4. 稳健性结果：**mNGS20250204/mNGS20250203 分别为病原体浓度 10 倍倍比稀释样本，要求上述样本中各微生物的 RPM 比值呈相应浓度梯度，即 mNGS20250204/mNGS20250203 比值在 5-20 倍之间，不在此范围内为不符合结果。RPM 浓度梯度比值共 1 组样本(3 个结果)，共计 3 分。1 个不符合结果扣 1 分，此组样本最多扣 3 分。

**5. 评价结果报告能力：**样本 mNGS20250207 均要求在正确检出的基础上，准确报告病原体：人疱疹病毒 5 型（CMV）；如其中任何病原体未准确报告（含多报、错报和未报），扣 4 分。

## **（二）EQA 成绩计算**

满分 100 分，得分 $\geq 80$ 分则为合格；成绩 $< 80$ 分为不合格。

## **三、成绩分布**

本次接受报名的实验室共 32 家，实际收到 30 家有效回报结果。如图 1 所示，基于评分方法，30 家实验室所得成绩分布如下：100 分的实验室 1 家，90~99 分（含 90 分）的实验室 10 家，90~80 实验室有 13 家，低于 80 分的实验室共 6 家。按照 $\geq 80$ 分为合格的标准，合格率为 80%（24/30）。

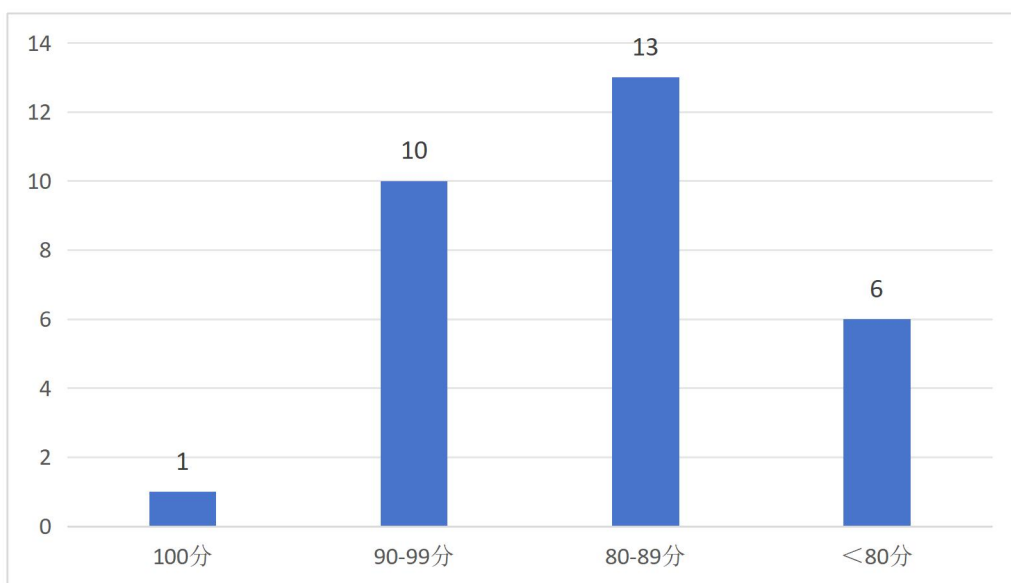


图 1 实验室成绩分布

#### 四、实验室检测流程信息

实验室的检测方法之间存在较大差异，各实验室检测流程见表 3。

方法学变异	实验室数目	方法学变异	实验室数目
1.核酸提取方式		Snap-aligner	2
自动化提取	24	Kraken 2	1
手工提取	6	Other/custom	2
2.DNA 提取试剂盒类型		9. 人源序列数据库 #	
柱提法	1	Human GRCh38/hg38	16
磁珠法	29	T2T-CHM13	11
3.DNA 提取试剂盒厂家		Human GRCh37/hg19	2
自建	26	YH-2.0	1
Vazyme	2	10. 比对微生物序列软件#	
Others	2	BWA	14
4.测序平台		Kraken	9
MGI	20	Kraken 2	4
Gene Mind	4	minimap	1
illumina	2	samtools	1
DGENSEE	1	Unitstat	1
Dinfectome	1	11. 微生物序列数据库#	
Si Kun	1	NCBI RefSeq database	26
TARRY	1	Genome Taxonomy Database	22
5. 是否单端测序		FDA-ARGOS	23

是	29	NCBI nt database	16
否	1	NCBI GenBank database	7
6.测序读长		Eupathdb	5
50 bp	13	DDBJ	5
60 bp	9	FDA Reference Viral Database	2
75 bp	3	NCBI nr database	1
100 bp	1	Other/custom	8
150 bp	1	12. 使用阳性质控	
20 bp	1	是	14
Other	2	否	16
7. 数据质控软件#		13.使用阴性质控	
fastp	19	是	28
get_umhost_IC_qc	8	否	2
PRINSEQ-lite	1	14.使用内参	
guppy	1	是	26
filter	1	否	4
8. 比对人源序列软件 #		15.样本周转时间	
Bowtie2	12	~12h	11
get_umhost_IC_qc	8	12~24h	18
BWA	5	24h~	1

## 五、实验室检测情况

### （一）实验室检测结果的假阴性情况

本次预研活动考察了各实验室对 7 个样本中 25 个 cfDNA 浓度达  $1.5 \times 10^3$  copies/mL 及以上的细菌、真菌和 DNA 病毒的检出情况，评价了实验室检测结果的假阴性。11 家（36.67%）实验室能全部检出这 25 个微生物，12 家（40%）实验室有 5 个以内（包含 5 个）的假阴性结果，7 家（23.33%）实验室有 5 个以上的假阴性结果（图 2）。18 家实验室共计产生了 98 个假阴性结果（图 3）其中，漏检最多的是光滑奈卡菌（41 个）、结核分枝杆菌复合群（34 个）和铜绿假单胞菌（10 个）。

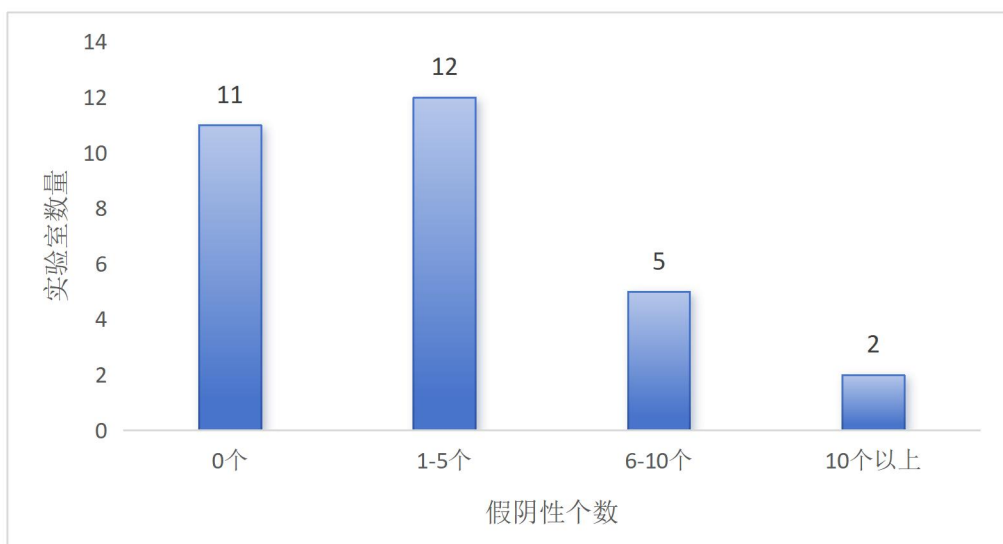


图 2 假阴性微生物检出情况

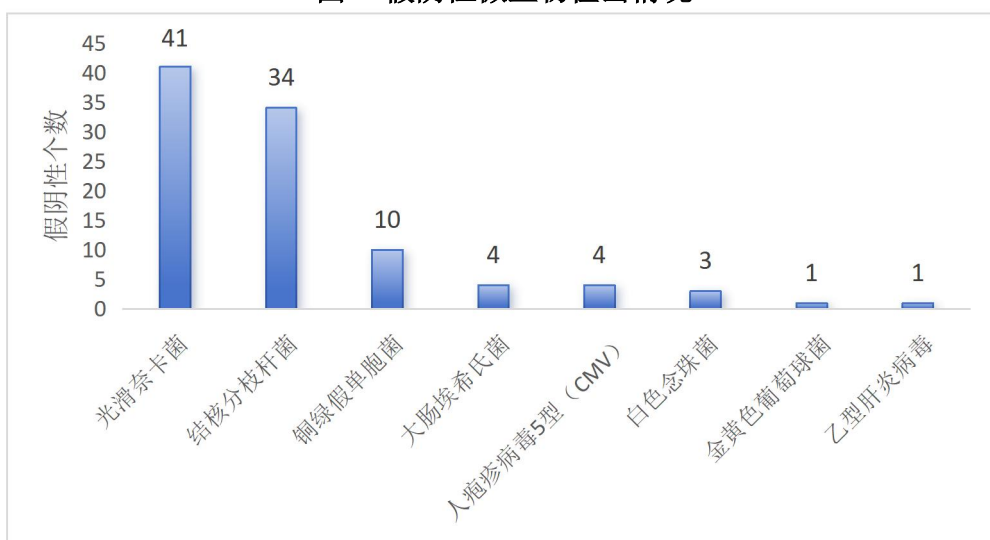


图 3 假阴性微生物个数

## (二) 实验室检测结果的假阳性情况

对本次活动中的 7 个样本的假阳性结果进行分析，结果显示 4 家（13.33%）实验室未报告假阳性微生物，26 家（86.67%）实验室共报告了 126 个假阳性微生物。其中，18 家（60%）实验室报告了 1-5 个假阳性微生物，6 家（20%）实验室报告了 6-10 个假阳性微生物，有 2 家（6.67%）实验室报告了 10 个以上的假阳性结果(图 4)。在 7 个样本中，实验室检测 cfDNA 混合物样本(mNGS20250206)报告的假阳性数最少，累计报告了 9 个假阳性结果；低微生物 cfDNA 浓度样本（mNGS20250204）报告的假阳性数最多，共报告了 30 个假阳性结果。在报告的假阳性微生物中出现频率最高的是人类疱疹病毒 6A 型（51 次）、乙型肝炎病毒（38 次）和嗜麦芽窄食单胞菌（26 次）。

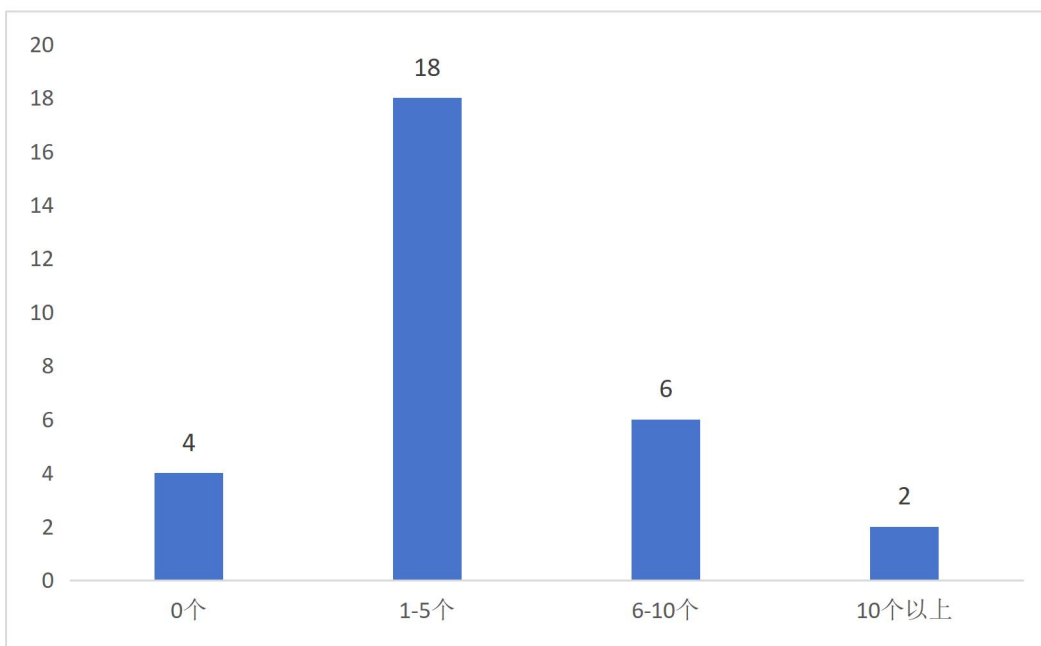


图 4 假阳性微生物检出情况

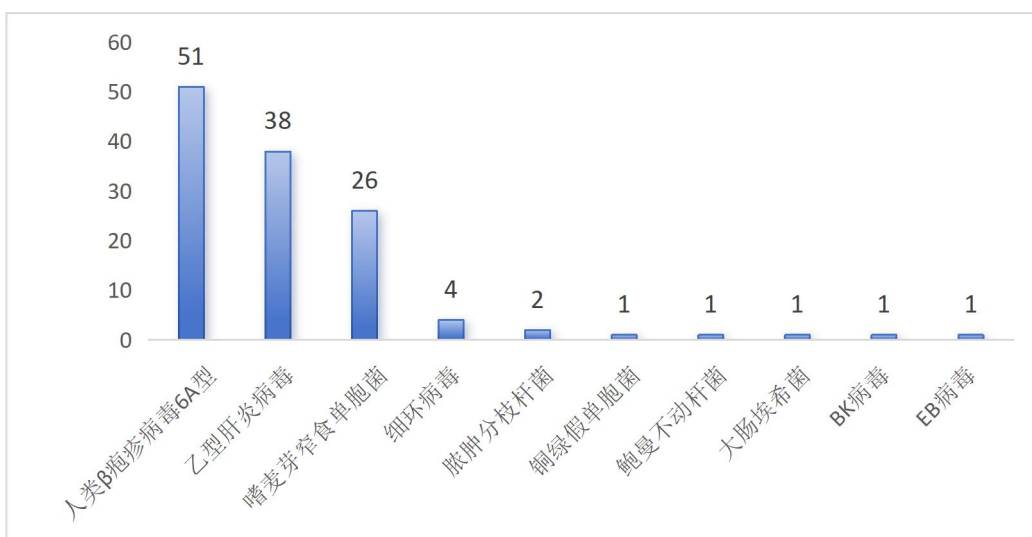


图 5 假阳性微生物微生物个数

### (三) 实验室的结果解读能力

本次预研活动设置了 1 个感染病例来评价各实验室依据所给患者的临床信息，结合 mNGS 检测结果，准确报告病原体的能力。mNGS20250207 样本为人类疱疹病毒 5 型（CMV），22 家（93.33%）家实验室准确报告，仅 1 家（3.33%）实验室报告了 EB 病毒，7 家（23.34%）实验室同时报告了人类疱疹病毒 6A 型，2 家（6.67%）实验室同时报告了嗜麦芽窄食单胞菌，1 家（3.33%）实验室同时报告了乙型肝炎病毒。



#### （四）实验室检测的重复性与稳健性

mNGS20250201 与 mNGS20250202 样本中含有相同类型的微生物，微生物浓度相同，在合格的 24 家实验室中，18 家（75%）实验室重复性较好，mNGS20250202/mNGS20250201 RPM 比值均在 0.5-2 之间。5 家实验室部分结果比值大于 2。

mNGS20250203 与 mNGS20250204 样本中含有相同类型的微生物，微生物浓度呈 10 倍。从同种病原体来看，检测到病原体的实验室数量基本上随着病原体浓度的增加而增加（图 7）。在合格的 24 家实验室中，8 家（33.3%）实验室稳健性较好，mNGS20250204/mNGS20250203 RPM 比值在 5-20 倍之间，4 家实验室部分结果比值小于 5。

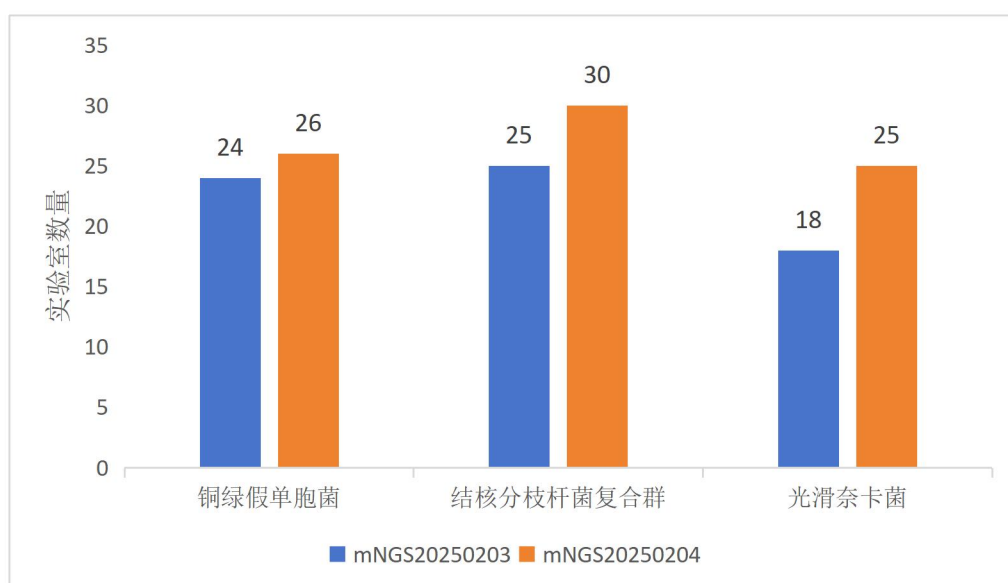


图 7 不同浓度微生物样本检出情况

## 六、总结

本次预研活动从检测结果的准确性、稳健性、重复性以及报告解读等多个方面考核了 mNGS 实验室检测血浆微生物 cfDNA 诊断感染性疾病的能力。各实验室的检测流程差异较大，整体检测能力较好，但不同实验室间差异能力较大，菌株鉴定能力仍需提高。通过对回报数据的分析，发现主要存在以下问题：

#### （一）检测流程差异大，质量保证不完善

各实验室自建的 mNGS 流程从样本前处理、核酸提取、建库测序、生信分析到结果解释等环节均存在较大差异。采用自建核酸提取试剂盒的实验室占 80% 以上，采用 MGI 测序平台的实验室数量远超使用 Illumina 测序平台的实验

室。参加本次预研活动的 30 家实验室均开展过性能确认研究，明确了其方法的检测性能，如分析敏感性（最低检测限）、精密度（重复性和再现性）、分析特异性、抗干扰能力、稳定性等。在检测本次 EQA 样本时，53.33%（16/30）的实验室未使用阳性质控，13.33%（4/30）的实验室未使用内参。实验室在检测过程中应设置合适的阳性质控品、阴性质控品及内参等进行质量控制。

## （二）假阴性和假阳性问题

尽管在乙型肝炎病毒在 mNGS20250201、mNGS20250202 样本中，腺病毒 C 型在 mNGS20250201、mNGS20250202、mNGS20250205、mNGS20250206 中微生物浓度较低，但大部分实验室能正确检出。本次预研活动有 26 家实验室报告了假阳性微生物，两家实验室的假阳性情况严重，分别报告了 20 个和 12 个假阳性结果，人类疱疹病毒 6A 型、乙型肝炎病毒、嗜麦芽窄食单胞菌假阳性率较高，原因包括湿实验环节引入、生信算法未严格区分同源序列等。假阳性情况严重的两家实验室没有建立背景微生物数据库，而且没有参考提供的阴性质控结果。相关实验室应首先明确污染微生物的来源，包括实验室污染、交叉污染以及生物信息学的序列错误比对等，进一步采取措施来减少污染，如严格执行实验室日常清洁工作、设计双端 barcode 避免交叉污染、定期更新微生物序列参考数据库以及重新设定阈值等。此外，18 家实验室共计产生了 98 个假阴性结果，原因包括载菌量较低、近缘物种的错误分类、湿实验环节丢失等。

## 七、成绩合格的实验室（按单位名称拼音排序）

北京大学深圳医院检验科

东莞兰卫医学检验实验室有限公司

佛山市南海区人民医院检验科

广州达安临床检验中心

广州华银康医学检验有限公司

广州华银医学检验中心有限公司

广州金匙医学检验有限公司

广州精微医学科技有限公司

广州凯普医学检验所

广州昇汇医学检验所有限公司

广州微远医学检验实验室  
广州医科大学附属第一医院检验科  
广州永诺医学检验所  
广州迪安医学检验实验室有限公司  
贵黔国际医院精准医学中心  
杭州杰毅医学检验实验室有限公司  
南京迪飞医学检验实验室  
深圳华大医学检验实验室  
深圳市第二人民医院检验科  
深圳市第三人民医院肝病研究所  
深圳市人民医院检验科  
天津金匙医学检验实验室  
武汉臻熙医学检验实验室有限公司  
中山大学孙逸仙纪念医院深汕中心医院检验科