



广东省 2025 年下呼吸道感染病原体宏基因组高通量测序室间质量评价预研活动报告

广东省 2025 年下呼吸道感染病原体宏基因组高通量测序室 间质量评价预研活动报告

下呼吸道感染是我国常见的感染性疾病，病原体构成复杂，包括细菌、病毒、真菌及非典型病原体等。传统微生物学检测方法在敏感性、时效性和检测范围上存在局限。宏基因组高通量测序（mNGS）技术能够无偏性地检测临床样本中的各类微生物核酸，为下呼吸道感染的病原学诊断提供了强大工具。然而，mNGS 检测流程复杂，从样本前处理、核酸提取、建库测序到生物信息学分析和临床解读，各个环节均可能影响结果的准确性。特别是下呼吸道样本（如痰液、支气管肺泡灌洗液）常存在宿主背景核酸含量高、定植菌干扰大等问题，对实验室的技术能力和结果解读水平提出了更高要求。

为全面评估我省临床实验室应用 mNGS 技术检测下呼吸道感染病原体的能力，发现检测流程中存在的共性问题 and 薄弱环节，促进实验室检测质量的标准化与规范化，广东省临床检验中心特组织开展本次室间质量评价预研活动。通过对各参评实验室回报结果的分析，旨在为未来建立正式的室间质量评价计划奠定基础，并为本省相关技术规范的制定提供数据支持。

一、 预期结果

本次预研活动共发放 7 个模拟呼吸道样本（mNGS20250101 - mNGS20250107）和 1 个阴性质控样本（01NC）。阴性质控样本仅用于实验室监控实验背景，无需报告结果。各样本中预设的微生物种类、理论浓度（copies/mL）及人源细胞背景见表 1。

表 1 样本预期结果（单位：copies/mL）

	mNGS20250101	mNGS20250102	mNGS20250103	mNGS20250104	mNGS20250105	mNGS20250106	mNGS20250107
金黄色葡萄球菌	/	/	10 ⁴	10 ⁵	/	/	/
表皮葡萄球菌	10 ⁵	10 ⁵	/	/	10 ⁵	10 ⁵	/
肺炎链球菌	/	/	/	/	/	/	10 ⁶
嗜肺军团菌	/	/	/	/	10 ⁴	10 ⁴	/
类肺炎克雷伯菌	10 ⁴	10 ⁴	/	/	/	/	/
结核分枝杆菌	/	/	10 ³	10 ⁴	/	/	/
黄曲霉	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	/	/	/
人类疱疹病毒 4	/	/	/	/	10 ⁴	10 ⁴	/

型（EBV）							
人类疱疹病毒 1 型（HSV1）	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	/	/	/
腺病毒	/	/	10 ³	10 ⁴	/	/	/
肺炎支原体	/	/	/	/	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
呼吸道合胞病毒	/	/	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	/
副流感病毒 3 型	10 ⁵	10 ⁵	/	/	/	/	/
人偏肺病毒	10 ⁵	10 ⁵	/	/	/	/	/
甲型流感病毒	/	/	/	/	10 ⁶	10 ⁶	/
人源细胞	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵

二、 评分方法

（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 2（注意：对人乳头瘤病毒不予评价）。

表 2 各样本应检出的微生物

样本	应检出的微生物
mNGS20250101	表皮葡萄球菌、类肺炎克雷伯菌、黄曲霉、人类疱疹病毒 1 型（HSV1）、副流感病毒 3 型、人偏肺病毒
mNGS20250102	表皮葡萄球菌、类肺炎克雷伯菌、黄曲霉、人类疱疹病毒 1 型（HSV1）、副流感病毒 3 型、人偏肺病毒
mNGS20250103	金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、黄曲霉、人类疱疹病毒 1 型（HSV1）、腺病毒、呼吸道合胞病毒
mNGS20250104	金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、黄曲霉、人类疱疹病毒 1 型（HSV1）、腺病毒、呼吸道合胞病毒
mNGS20250105	表皮葡萄球菌、嗜肺军团菌、人类疱疹病毒 4 型（EBV）、肺炎支原体、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒
mNGS20250106	表皮葡萄球菌、嗜肺军团菌、人类疱疹病毒 4 型（EBV）、肺炎支原体、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒
mNGS20250107	肺炎链球菌、肺炎支原体

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：mNGS20250101 和 mNGS20250102 是病原体靶标和浓度、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(7 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：mNGS20250104/mNGS20250103 分别为病原体浓度 10 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 mNGS20250104/mNGS20250103 比值在 5-20 倍之间，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(7 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 mNGS20250107 用于评估实验室结合临床信息的病原体鉴别与报告能力。此样本仅作临床解读能力评估与反馈，不计入本次评分。

（二）成绩计算

满分 100 分，得分 ≥ 80 分则为合格；成绩 < 80 分为不合格。

三、 参评实验室概况与总体成绩

本次接受报名的实验室 33 家，实际收到 31 家有效回报结果。如图 1 所示，基于评分方法，31 家实验室所得成绩分布如下：90~99 分（含 90 分）的实验室 19 家，80~89 分（含 80 分）的实验室 8 家，低于 80 分（不含 80 分）的实验室 4 家。按照 ≥ 80 分为合格的标准，合格率为 87.0%（27/31）。

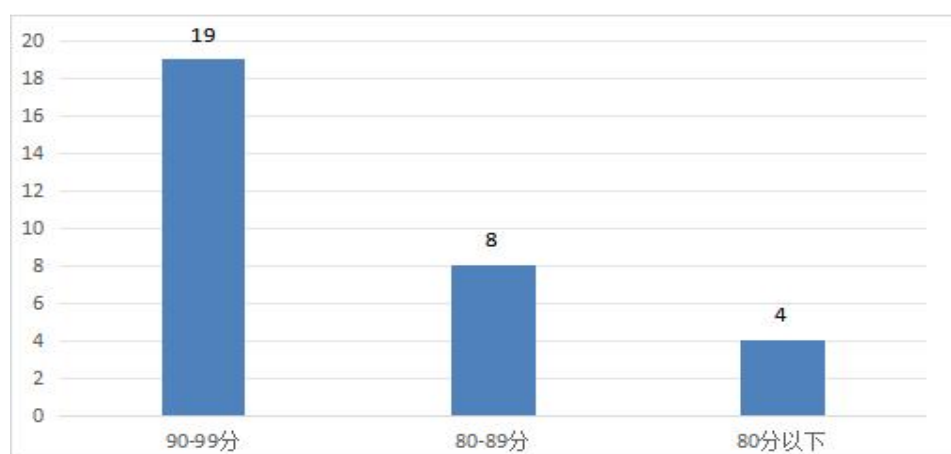


图 1. 实验室成绩分布

四、 实验室检测流程信息调研与分析

根据回报的结果可以看出各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。

表 3. 各实验室检测流程汇总

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		Human GRCh38/hg38	15
自动化提取	24	T2T-CHM13v2.0	13
手工提取	7	Human Other/v2.0	6
2.提取试剂盒类型		YH2.0	4
柱提法	1	Human GRCh37/hg19	2
磁珠法	30	nt 库 human 序列	2
3.提取试剂盒厂家		HDB V2.0.2	1
自建	20	其他	1
BGI	8	10.比对微生物序列软件	
诺唯赞	2	bwa	20
达安基因	1	kraken	9
4.测序平台		kraken2	4
BGI	19	bowtie2	3
真迈	4	samtools	2
illumina	2	BLAST	2
贝瑞和康	2	UnitStat_task.py	1
达瑞	1	minimap2	1
迪飞	1	11.微生物序列数据库	
金圻睿	1	NCBI RefSeq database	26
臻熙	1	FDA- ARGOS	23
5.是否单端测序		Genome Taxonomy Database	21
是	30	NCBI nt database	17
否	1	DDBJ	7
6.测序读长		Eupathdb	7

方法学变异	实验室数目	方法学变异	实验室数目
50 bp	12	JDI	7
60 bp	8	FDA Reference Viral Database	4
75 bp	3	NCBI GenBank database	4
100 bp	2	IDseqDB v3.0.0	2
150 bp	1	Integrated Microbial Genome	1
其他	5	micro_db v3.0.0	1
7.数据质控软件		PIDB_v1.3.0_rc5	1
fastp	19	sunngs_mngs_dna.fasta:V4.08.02	1
get_umhost_IC_qc	7	tNGS 专用数据库，版本号 V24.12.01	1
fliter	1	NCBI Assembly	1
guppy	1	DMPD V2.1	1
PRINSEQ-lite	1	常见致病菌和定值菌基因组数据	1
prinseq-lite.pl	1	12.使用阳性质控	
low_complexity_filter.py	1	是	15
8.比对人源序列软件		否	16
Bowtie2	13	13.使用阴性质控	
get_umhost_IC_qc	8	是	27
bwa	5	否	4
samtools	2	14.使用内参	
snap-aligner	2	是	27
kraken2	1	否	4
minimap2	1	15.样本周转时间	
rm_host	1	12h 至 24h	11
其他	1	24h 以上	1
9.人源序列数据库		4h 及以内	10
CHM13	2	4h 至 12 小时	8
GRCh38.p13	2	其他	1

五、实验室检测情况详细分析

1. 假阴性结果分析

本次预研活动考察了各实验室对 7 个样本中的 38 个不同浓度的微生物（包括细菌、真菌、DNA 病毒、RNA 病毒、和支原体）检出情况，评价了实验室检测结果的假阴性。10 家(32.2%)实验室能全部检出这 38 个微生物，14 家（45.1%）实验室有 5 个以内（包含 5 个）的假阴性结果，7 家（22.5%）实验室有 5 个以上的假阴性结果（图 2）。各实验室的假阴性结果主要来源于对真菌和 RNA 的漏检（图 3），其中漏检最多的是黄曲霉（39 个）、结核分枝杆菌（27 个）和表皮葡萄球菌（12 个）。

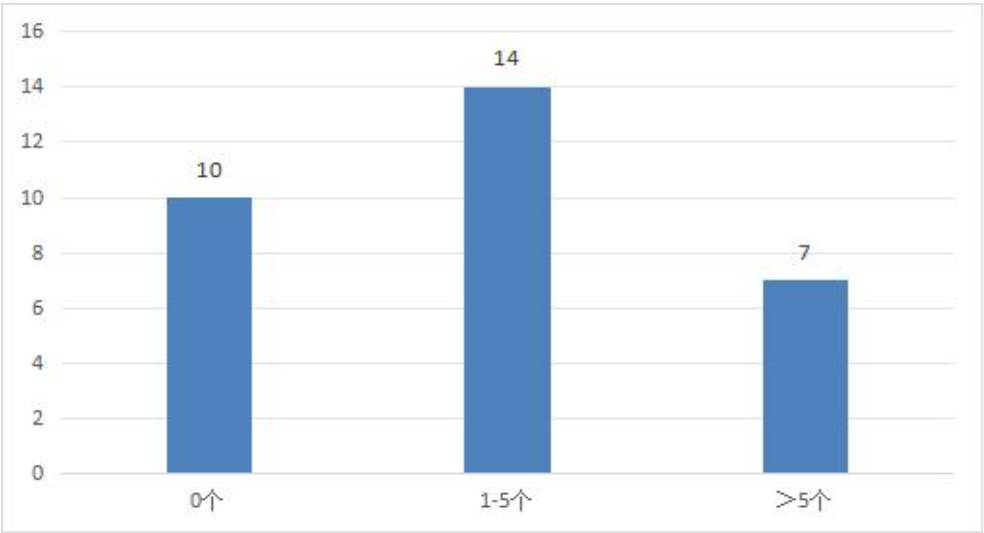


图 2. 假阴性微生物检出情况

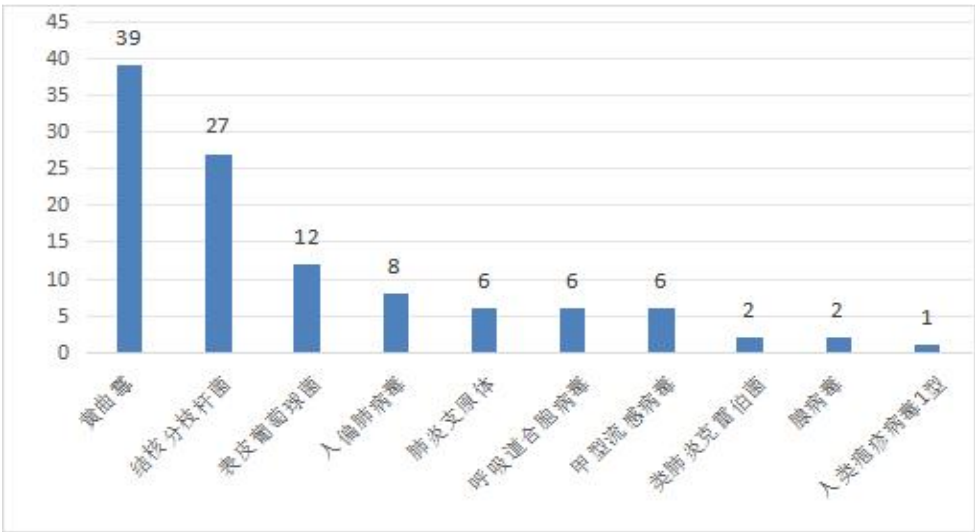


图 3. 假阴性微生物个数

2. 假阳性结果分析

对本次活动中的 7 个样本中的假阳性结果进行分析，结果显示 14 家（45.2%）实验室未报告假阳性微生物，17 家（54.8%）实验室共报告了 32 个假阳性微生物，其中，1 家（3.2%）实验室报告了 4 个假阳性结果，12 家（38.7%）实验室报告了 2 个假阳性结果，4 家（12.9%）实验室报告了 1 个假阳性微生物（图 4）。这些样本中出现的假阳性微生物分别是表皮葡萄球菌（21 个）、肺炎克雷伯菌（8 个）、土曲霉（2 个）和铜绿假单胞菌（1 个）（图 5）。

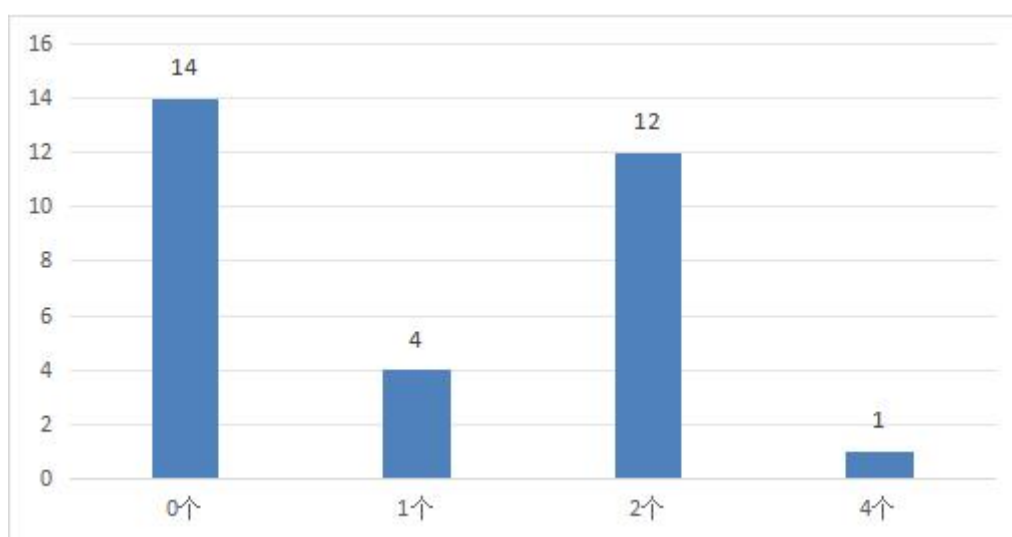


图 4. 假阳性微生物检出情况

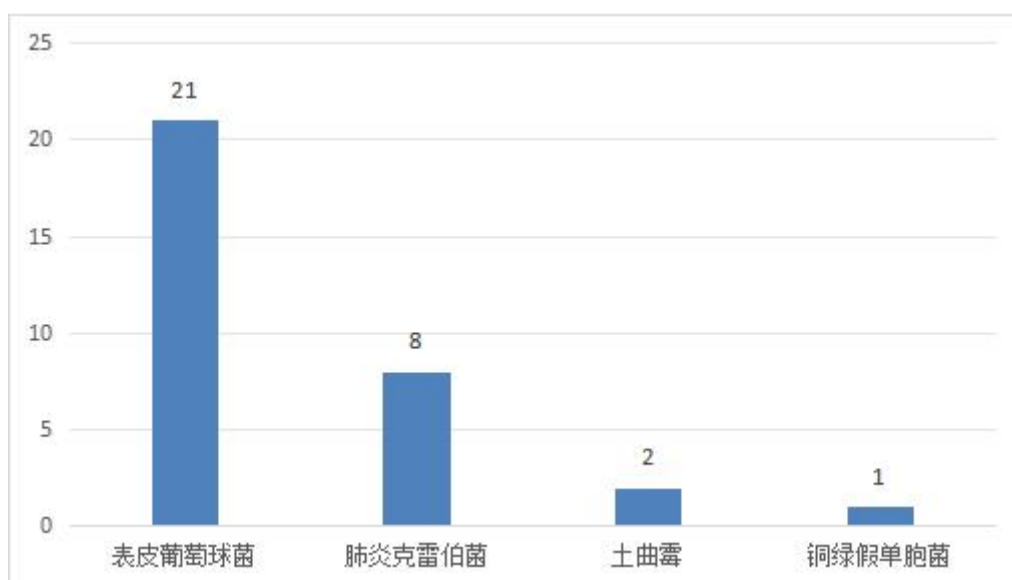


图 5 假阳性微生物个数

3. 重复性与稳健性分析:

mNGS20250101 和 mNGS20250102 是病原体靶标和浓度、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。在所有实验室中，14 家（45.1%）实验室的重复性较好，RPM 比值均在 0.5-2 之间。

mNGS20250104/mNGS20250103 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 mNGS20250104/mNGS20250103 比值在 5-20 倍之间。在所有实验室种，9 家（29.0%）实验室的稳健性较好，RPM 比值在 5-20 之间。

六、总结

本次预研活动从检测分析敏感性、特异性、重复性及稳健性等多个方面考核了省内临床实验室应用 mNGS 技术检测下呼吸道标本中病原微生物的能力。总体而言，各实验室的检测流程差异显著，对多数常见病原体的检测能力较好，但对特殊结构微生物的检出能力、生信分析精准度及流程稳定性仍需重点提升。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

各实验室自建的 mNGS 方法在核酸提取方式、测序平台、生物信息学分析流程等关键环节存在较大差异。本次数据显示，采用磁珠法提取的实验室占 96.8%（30/31），但提取试剂盒厂家以自建为主（64.5%，20/31）；测序平台选择上，使用 BGI 平台的实验室（61.3%，19/31）数量超过使用 Illumina 等其他平台实验室的总和。在生物信息学分析环节，微生物序列数据库和比对软件的使用呈现多样化，尚未形成明显共识。这种技术路径的多样性直接影响检测结果的标准化与可比性。

尽管参与实验室均具备相应的检测资质，但在日常检测及本次质评的质量控制实践中仍显不足。数据显示，51.6%（16/31）的实验室在检测本次样本时未使用阳性质控品，12.9%（4/31）的实验室未使用阴性参考品，12.9%（4/31）的实验室未使用内参。实验室在检测过程中必须设置并有效利用阳性质控品、阴性质控品及内参，全面把控检测质量。

（二）假阴性和假阳性问题

假阴性结果主要集中在具有特殊细胞壁结构的病原体。黄曲霉和结核分枝杆菌的假阴性率分别高达 31.5%（39/124）和 43.5%（27/62），其根本原因在于常规的核酸提取方法难以有效破碎真菌的几丁质胞壁和分枝杆菌的蜡质样厚壁，导致核酸释放不足。此外，人偏肺病毒的漏检率（12.9%，8/62）也高于其他 RNA 病毒，提示对 RNA 病毒的检测可能存在优化空间。

假阳性问题则暴露出在污染物控制和物种鉴定精度上的不足。一方面，表皮葡萄球菌作为常见的皮肤定植菌，被 14 家实验室共误报 21 次，成为最高发的假阳性。另一方面，3 家实验室出现了系统性的物种鉴定错误，将“类肺炎克雷伯菌”误报为“肺炎克雷伯菌”（合计 6 次），这直接反映了部分实验室所使用的微生物参考数据库在种水平分辨率不足，或生信分析阈值设置不精准。所有报告假阳性的实验室均应建立或完善实验室特异的背景微生物数据库，并严格分析阴性质控结果，以有效识别和扣除来自环境、试剂或交叉污染的序列。

（三）检测流程的重复性与稳健性

在检测重复性（相同样本 mNGS20250101/mNGS20250102）评价中，仅 45.2%（14/31）的实验室所有目标病原体的 RPM 比值完全在 0.5-2.0 的预期范围内。

在检测稳健性（倍比稀释样本 mNGS20250104/mNGS20250103）评价中，仅 29.0%（9/31）的实验室所有目标的 RPM 比值能稳定落在 5-20 倍的预期梯度范围内。这表明多数实验室的检测方法在面对相同样本时的一致性，以及对不同浓度病原体的线性响应能力仍有较大提升空间。

七、 成绩合格的实验室名单

按单位名称拼音排序，公布本次预研活动中成绩合格的实验室名单。

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

广东省中医院病理科

广州达安临床检验中心

广州迪安医学检验实验室有限公司

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
广州金域医学检验中心有限公司
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
广州永诺医学检验所
广州医科大学附属第一医院检验科
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
江门市中心医院检验科
南京迪飞医学检验实验室
深圳华大医学检验实验室
深圳市第三人民医院肝病研究所
深圳市第二人民医院检验科
天津金匙医学检验实验室
中山大学孙逸仙纪念医院深汕中心医院检验科
中山大学附属第五医院检验科
中山大学附属第三医院检验科