

SZTT/SZGIA

深圳市团体标准

SZTT/SZGIA 1.4-2017

基于高通量测序的环境微生物检测

第4部分：临床样本病原微生物检测

Detection of environmental microorganisms based on high-throughput sequencing

Part 4: Methodology of detecting clinical pathogenic microorganism

2017-05-27 发布

2017-05-28 实施

深圳基因产学研资联盟 发布

前 言

本部分编写格式遵循了 GB/T 1.1-2009 给出的规则编写。

SZTT/SZGIA 1《基于高通量测序的环境微生物检测》分为四个部分：

——第1部分：基本规程

——第2部分：人粪便微生物宏基因组检测方法

——第3部分：人粪便微生物16S rRNA基因检测法

——第4部分：临床样本病原微生物检测

本部分为SZTT/SZGIA 1的第4部分。

本部分由深圳基因产学研资联盟提出并归口。

本部分负责起草单位：深圳华大基因股份有限公司、蓝色彩虹（深圳）科技有限公司、深圳华大基因科技有限公司、深圳市第二人民医院、深圳龙岗区妇幼保健院、深圳南山区妇幼保健院、深圳市谱元基因研究院、深圳弘睿康生物科技有限公司、华大精准营养（深圳）科技有限公司、深圳市微健康基因研究院。

本部分主要起草人：翁星、李永军、李陶莎、李倩一、杜佳婷、程奇、李岱怡、谢强、刘靓、刘文兰、魏凤香、张静、覃俊杰、胡鹏、朱立、刘晓璐、戴文魁。

本部分为首次发布。

基于高通量测序的环境微生物检测

第 4 部分：临床样本病原微生物检测

1 范围

本部分规定了采用高通量测序技术进行临床样本病原微生物检测的方法，包括样本的采集、保存，实验室工作条件，样本处理程序、质量控制及关键分析步骤。

本部分适用于利用靶向测序或宏基因组学方法进行临床感染样品中病原微生物检测的机构。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

SZTT/SZGIA 1.1-2016 基于高通量测序的环境微生物检测 第1部分：基本规程

SZTT/SZGIA 1.2-2016 基于高通量测序的环境微生物检测 第2部分：人粪便微生物宏基因组检测方法

ISO15189-2011 医学实验室标本采集手册

3 术语和定义

下列定义适用于本文件。

3.1

宏基因组学 (Metagenomics)

又称环境微生物基因组学、元基因组学。以直接从环境样品中提取全部微生物的DNA为研究对象，揭示环境样品所包含的全部微生物的遗传组成及其群落功能。

3.2

靶向测序 (target sequencing)

预先知道目标核酸序列，对其进行预先扩增后再进行高通量测序。

3.3

错误率 (error rate)

基于高通量测序的特征，其输出的结果可能存在错误。错误率即表示测序结果中某一碱基可能被测错的概率。

3.4

检测限 (detection limit)

本标准中定义为在给定的可靠程度内，可从样品中检测到目标物质（物种或序列）的最小测序数据量。

4 缩略语

下列缩略语适合于本文件。

DNA——脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

PCR——聚合酶链式反应（Polymerase Chain reaction）

5 检测工作程序

5.1 原理

基于高通量测序平台产品的序列数据，通过微生物专用数据库进行比对分析，经过智能化算法获得疑似致病微生物的种属信息，并提供相应的耐药性和毒力标志物信息。

5.2 检测对象

存在于临床疑似感染样本中的微生物。

5.3 适用的临床症候

——疑难危重感染

——发热待查超过两周或反复发热

——血流感染、中枢神经系统感染、呼吸系统感染、胸腔及腹腔感染

5.4 样品采集

5.4.1 样本类型

血浆、痰液、肺泡灌洗液、脑脊液以及其他无菌体液。

5.4.2 样本采集标准

——样品采集应经过伦理审查和生物安全评价审查。

——操作应遵循GB 19489-2008 第十二章 微生物标本的采集及运送

表1 样本采集要求

样本类型	体积	采集管
静脉血	1.5 mL 以上	Streck 管
脑脊液	1 mL 以上	无菌螺口管
肺泡灌洗液	3 mL 以上	无菌、干燥洁净冻存管
痰液（晨痰、深部痰）		
其他无菌体液		

5.4.3 样品保存

-20℃保存不超过1周；-80℃长期保存；禁止反复冻融；禁止室温存放超过半小时。

5.4.4 样品运输

干冰条件下运输。

5.4.5 样本验收标准

可接受的样本条件：

样本温度：到样时干冰需有残留；

样品外观：样品保存管必须完好，无裂管、开盖等样本外溢的情况；

样品体积：样本体积需符合上述要求；

样品质量：样品无凝固、污染，严重溶血现象；

样品信息：要求样品有对应的填写完整的检测申请单、检测知情同意书等。样品信息必须包括：受检者姓名、年龄、性别、送检医院、检测内容等。

拒绝接受的样本条件（需重新送样）：

样本温度：到样时干冰已完全挥发；

样品外观：样品保存管出现裂管、开盖等样本外溢的情况；

样品体积：样本体积低于上述要求；

样品质量：样品出现凝固、污染，严重溶血现象；

样品信息：受检者姓名、年龄、性别、送检医院、检测内容等信息不全。

5.5 实验室工作程序

5.5.1 实验室条件及所需仪器设备

检测流程包括样本制备、文库构建及扩增产物纯化三个步骤，实验建设中按照需求需配备相应的独立实验室。本实验室的建设或改造是在标准PCR扩增实验室的基础上进行，每一区域的具体操作及要求都应符合GB 19489-2008以及 SZTT/SZGIA 1.1-2016 5.5.1。

所需仪器设备包括：冷冻离心机，核酸荧光定量设备，PCR仪，高通量DNA测序仪，分析电脑等。

5.5.2 测序样本处理

依据SZTT/SZGIA 1.1-2016 5.5.3，不同临床样本使用相应的有效提取方法，依据SZTT/SZGIA 1.2-2016 5.4.3，样品DNA质量应不少于10 ng，打断片段在220-280 bp。若是靶向测序，则需在建库前扩增目的基因序列。

5.5.3 高通量基因测序文库制备与上机测序

步骤参考SZTT/SZGIA 1.1-2016 附录A.3 高通量基因测序文库制备，注意在加标签序列时，需要和样本一一对应。每一例样本对应一个标签序列号，同一批样本不得使用相同标签序列号，切记加重，加反。文库构建后定量不少于160 ng。

5.5.4 数据分析

分析过程参见SZTT/SZGIA 1.1-2016。

数据量达到不低于5 M（M：兆数），人源比例为不高于99%。

5.5.5 质量要求

参考SZTT/SZGIA 1.2-2016 5.4.6.1。

5.6 数据分析

5.6.1 数据处理

——质量值：应达到相应高通量测序平台的要求，并由此计算有效的测序数据量，错误率高于1%的碱基比例应低于20%。

——建议使用监管级别的公共数据库（如FDA监管级别微生物序列数据库FDA-ARGOS – FDA dAtabase for Regulatory Grade micrObial Sequences (BioProject 231221)）。

5.6.2 微生物物种注释

对于已知物种，宜使用数据库中序列相似度应达到99%以上的序列物种信息进行注释。

5.6.3 检测报告

报告需将检出结果中的临床有意义的致病菌与环境菌分开列出，包含检出病原体的名称及其序列数。

5.6.4 最低检测限

针对靶向测序和宏基因组测序两种情况下最低检出限的确定方法不同。对于宏基因组测序，需要视具体情况来确定评估方法。对于靶向测序，最低检测限的确立通常是采用95%（样本量 ≥ 20 ）的阳性检出率作为最低检测限确定的标准。

5.6.5 方法局限性

由于目前技术手段的限制，基于高通量测序的临床样本病原微生物检测方法还存在技术上的局限。这些局限性包括但不限于：呼吸道样本的背景病原体对于辨别致病菌干扰大；测序引入的随机或系统性错误；注释使用的数据库不能包含所有的微生物物种。