



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

中枢神经系统感染病原体宏基因组测序 技术要求

Technical requirements for metagenomic next-generation sequencing of pathogens
associated with central nervous system infection

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前 言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 要求	4
5 试验方法	7

前 言

本标准按照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》的规定起草。

本标准的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由医用高通量测序标准化技术归口单位归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院

本标准主要起草人：

中枢神经系统感染病原体宏基因组测序技术要求

1 范围

本文件规定了中枢神经系统感染病原体宏基因组测序方法的要求，并描述了相关的试验方法。

本文件适用于对脑脊液样本中的中枢神经系统感染病原体的宏基因组测序，测序原理包括可逆末端终止测序和联合探针锚定聚合测序等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 40664-2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求

WS/T 640-2018 临床微生物学检验标本的采集和转运

GB/T 40974-2021 核酸样本质量评价方法

GB/T 37875-2019 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

YY/T 1725-2020 细菌和真菌感染多重核酸检测试剂盒

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 35890-2018

3 术语和定义

以下术语与定义适用于本文件。

3.1

中枢神经系统感染 central nervous system infection; CNS infection

指各种病原微生物侵犯中枢神经系统实质、被膜及血管等引起的急性或慢性炎症性疾病，主要包括脑炎、脑膜炎、脑膜脑炎、脊髓炎和脑脓肿等。

3.2

病原体 pathogens

指引起宿主疾病的致病性微生物。

注：病原体包括某些病毒、类病毒、朊病毒、细菌、真菌或寄生虫。

[来源：GB/T 44586.1-2024/ISO 21474-1:2020, 3.27]

3.3

脑脊液 cerebrospinal fluid; CSF

指存在于脑室及蛛网膜下腔的一种无色透明的液体。脑脊液包围并支持着整个脑及脊髓，起到保护作用。在清除代谢产物及炎性渗出物方面，起着身体其它部位淋巴液所起的作用。

3.4

核酸 nucleic acid

由核苷酸或脱氧核苷酸通过 3', 5'-磷酸二酯键连接而成的一类生物大分子。具有非常重要的生物功能，主要是贮存遗传信息和传递遗传信息。包括核糖核酸（RNA）和脱氧核糖核酸（DNA）两类。

[来源：GB/T 40974-2021, 3.2]

3.5

病原宏基因组高通量测序 metagenomic next generation sequencing; mNGS

利用下一代高通量测序技术对直接从临床标本中提取的遗传物质，进行测序并分析，一次性覆盖检测病毒、细菌、真菌和寄生虫等多种病原微生物的测序技术。

[来源：GB/T 在修订中]

3.6

文库 library

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术等所得到的一个重建分子群，如基因组文库、互补 DNA 文库、噬菌体展示肽文库等。

[来源：GB/T 30989-2014, 3.5]

3.7

生物信息学 bioinformatics

应用信息科学及相关学科的方法和技术，研究和分析生物体系和生物过程中信息存储、处理和传递的一门交叉学科。

[来源：GB/T 29859-2013, 2.1.1]

4 要求

4.1 样本

应对样本的采集、包装、运送、储存和前处理方式（包括研磨、去宿主等）等进行验证。

4.2 核酸提取及纯化

核酸提取及纯化性能应符合如下要求：

a) 包含核酸提取及纯化组分的试剂盒，制造商对核酸提取及纯化功能，如效率、纯度、完整性等，分别进行验证；

b) 不包含核酸提取组分的试剂盒，制造商说明或指定提取试剂盒，并对核酸提取及纯化功能进行验证。

4.3 核酸质量控制

a) 应对核酸浓度的测定方法进行验证；

b) 宜对核酸纯度的测定方法进行验证（可选）；

c) 宜对核酸片段分析方法进行验证（可选）。

4.4 文库制备

测序文库制备主要包括提取的核酸片段化和末端修复加A，连接特定接头序列及扩增等步骤。根据选择的文库制备流程，宜对测序文库片段长度分布、纯度及浓度等进行验证。

4.5 文库质量控制

对测序文库进行质量控制，宜包括文库片段长度、产物纯化效率及浓度等。

4.6 测序

对测序文库进行测序，测序方法包括可逆末端终止测序和联合探针锚定聚合测序等。应对测序方法进行验证。

4.7 测序数据质量控制

对测序文库的测序数据量和数据质量指标（包括但不限于碱基识别质量、接头污染比例及有效序列长度）进行验证。在规定的测序读长模式下，测序有效数据量和数据质量指标应符合实验室用户规定的要求。

4.8 宿主比对过滤

将质量控制后的测序数据与宿主基因组数据库进行比对过滤，宿主基因组序列去除效果应符合实验室用户规定的要求。

4.9 病原比对鉴定

病原比对鉴定的质量指标，包括但不限于唯一比对序列数、数据有效比对率及序列相似度，应符合实验室用户规定的要求。

4.10 分析性能

4.10.1 内标或对照

制造商应对检测试剂的检测结果建立质量控制程序，宜根据其产品工艺特点，在反应体系中设置内标和(或)对照，内标和(或)对照宜与样本同等对待。

4.10.2 阳性参考品符合率

对阳性参考品进行检测，在检测试剂验证范围内病原体均应检出，且与已知型别相符。

阳性参考品设置宜参考如下要求：

- a) 包含全部代表性病原体，可以是独立或混合样本；
- b) 可以每种代表性病原体只选择常见的菌株或型别；
- c) 对于难以获得标准株或临床分离株的病原体可以使用模拟样本。

4.10.3 阴性参考品符合率

对阴性参考品进行检测，不在检测试剂验证范围内病原体均不应检出。

阴性参考品设置宜参考如下要求：

- a) 包含一定数量的非验证范围内病原体，可以是独立或混合样本；
- b) 包含与验证范围内病原体种属相近、感染部位相同或感染症状相似的非验证范围内病原体。

4.10.4 检出限

对检出限参考品进行检测，终浓度为检测试剂宣称的最低检出限以上时，在检测试剂验证范围内病原体均应检出，且与已知型别相符。

制造商应规定并提供检测试剂对于每种验证范围内病原体的检出限。

4.10.5 重复性

对重复性参考品进行检测时，通过对同一个样本进行重复检测，在检测试剂验证范围内病原体均应检出，且与已知型别相符。

重复性参考品具体设置宜参考如下要求：

- a) 可以对包含验证范围内病原体的独立或混合样本进行验证，覆盖全部或有限数量的验证范围内病原体；
- b) 对于难以获得标准株或临床分离株的病原体可以使用模拟样本。

5 试验方法

5.1 样本

样本的采集、包装、运送和储存等应符合WS/T 640-2018的要求，样本前处理按照试剂说明书的方法进行试验。

5.2 核酸提取及纯化

按照提取试剂说明书的方法进行试验。

5.3 核酸质量控制

核酸的质量控制方法包括核酸浓度和纯度的测定及片段分析，具体如下：

- a) 核酸浓度的测定方法，应按照检测试剂说明书的方法步骤进行试验；
- b) 核酸纯度的测定方法，应按照检测试剂说明书的方法步骤进行试验（可选）；
- c) 核酸片段分析方法，应按照检测试剂说明书的方法步骤进行试验（可选）。

判定结果是否符合 4.3 的要求。

5.4 文库制备

按照文库制备说明书的方法进行试验。

5.5 文库质量控制

文库质控包括清晰标记添加的标签接头，检测文库浓度、检测文库片段大小等，应按照文库制备说明书中指定或推荐的方法进行试验。符合要求的文库产物进行均一化混合，浓度应依据测序试剂及测序仪器的要求。判定结果是否符合 4.5 的要求。

5.6 测序

测序方法包括可逆末端终止测序和联合探针锚定聚合测序等，按照测序试剂和测序仪器说明书的方法进行试验。

5.7 测序数据质量控制

测序数据质控包括去除低质量、低复杂度及接头污染序列等。测序完成后，应对数据质量指标进行分析 and 统计。判定结果是否符合 4.7 的要求。

5.8 宿主比对过滤

通过比对宿主数据库进行宿主序列比对过滤，评估宿主基因组序列去除效果。判定结果是否符合 4.8 的要求。

5.9 病原比对鉴定

基于mNGS病原比对鉴定软件根据算法有多种可选组合和参数，采用不同的生物信息算法对测序结果综合分析。判定结果是否符合 4.9 的要求。

5.10 分析性能

5.10.1 内标或对照

按照制造商提供的方法进行试验。

5.10.2 阳性参考品符合率

按照检测试剂说明书操作，对阳性参考品进行检测。判定结果是否符合 4.10.2 的要求。

5.10.3 阴性参考品符合率

按照检测试剂说明书操作，对阴性参考品进行检测。判定结果是否符合 4.10.3 的要求。

5.10.4 检出限

按照检测试剂说明书操作，对检出限参考品进行检测。判定结果是否符合 4.10.4 的要求。

5.10.5 重复性

按照检测试剂说明书操作，对重复性参考品进行重复检测。判定结果是否符合 4.10.5 的要求。

参 考 文 献

- [1]国家市场监督管理总局. 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求:GB/T 40664-2021[S]. 2021.
- [2]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 高通量基因测序技术规程:GB/T 30989-2014[S]. 2014.
- [3]中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床微生物学检验样本的采集和转运:WS/T640-2018 [S]. 2018.
- [4]国家市场监督管理总局. 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范:GB/T 37875-2019[S]. 2019.
- [5]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 生物信息学术语:GB/T 29859-2013[S]. 2013.
- [6]国家药品监督管理局. 细菌和真菌感染多重核酸检测试剂盒:YY/T 1725-2020[S]. 2020.
- [7]国家市场监督管理总局. 核酸样本质量评价方法:GB/T 40974-2021[S]. 2021.
- [8]国家市场监督管理总局. 体外诊断医疗器械 多重核酸分子检测 第1部分:核酸质量评价术语和通用要求:GB/T 44586.1-2024/ISO 21474-1:2020[S]. 2020.
- [9]国家市场监督管理总局 临床实验室检测和体外诊断系统 病原宏基因组高通量测序的性能确认:GB/T
- [10]中华医学会神经病学分会感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 中枢神经系统感染性疾病的脑脊液宏基因组学第二代测序应用专家共识 [J]. 中华神经科杂志, 2021, 54(12):1234-1240. DOI:10.3760/cma.j.cn113694-20210730-00532.
- [11]CNAS-GL039: 2019 分子诊断检验程序性能验证指南.
- [12]刘东来, 张春涛, 王佑春, 等. 病原宏基因组高通量测序技术质量控制与评价的挑战和思考[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12):12. DOI:10.13345/j.cjb.200377.