

# 中枢神经系统感染病原体核酸宏基因组测序技术要求

## 1 范围

本文件提供了基于宏基因组测序技术检测中枢神经系统感染病原体的性能要求、检测流程、质量控制和安全防护等方面的内容。

本文件适用于医疗机构、疾病预防控制机构和第三方实验室对中枢神经系统感染病原体诊断核酸高通量测序技术的应用。

## 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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

WS/T640-2018 临床微生物学检验样本的采集和转运

SN/T 2752.4 卫生检疫人员的自我防护规范 第4部分:实验室人员

## 3 术语及定义

### 3.1

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

是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

指致人类或动植物感染性疾病的生物总称，包括细菌、病毒、寄生虫、真菌等微生物或其他生物体。

[来源：T/CPMA 010-2020，3.3]

### 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

#### **高通量测序 Next-generation sequencing ; NGS**

也被称为下一代测序技术,是一种能够快速、准确地测定 DNA 或 RNA 序列的方法,能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术,通常一次测序反应能产出不低于 100Mb 的测序数据。

### 3.6

#### **宏基因组测序 Metagenomics next generation sequencing; mNGS**

是一种基于 NGS 技术的测序方法,以临床样本中所有微生物和宿主基因组为研究对象,进行无偏倚测序分析。针对 CNS 感染患者的病原检测,通常是对临床脑脊液样本中的细胞游离 DNA 进行 mNGS 测序,也有研究利用临床样本的全细胞 DNA 进行 mNGS 测序。

注:细胞游离 DNA、全细胞 DNA 的定义见 3.6、3.7。

### 3.7

#### **细胞游离 DNA cell-free DNA; cfDNA**

是指体液中游离于细胞外的 DNA 片段,主要来源于宿主和病原微生物,在细胞凋亡,坏死,和炎症反应等过程产生。

### 3.8

#### **全细胞 DNA wholecell DNA; wcDNA**

是指体液中全部的 DNA。无论 cfDNA 还是 wcDNA 中都包含了大量的宿主 DNA,这会大大降低 mNGS 对病原微生物检测的敏感性。因此,针对 wcDNA,一般会通过差异裂解的方法,在尽量去除临床样本中细胞裂解释放的宿主 DNA 情况下,获得样本中病原微生物的 DNA。有研究表明,脑脊液 cfDNA 对病原的检出能力要高于 wcDNA。

### 3.9

#### **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]

### 3.10

#### **聚合酶链式反应 polymerasechain reaction; PCR**

模板 DNA 先经高温变性为单链,在 DNA 聚合酶和适宜的温度下,两条引物分别与模板 DNA 两条链上的一段互补序列发生退火,接着在 DNA 聚合酶的催化下以四种 dNTP 为底物,使退火引物得以延伸,如此反复变性、退火和 DNA 合成这一循环,使位于两段已知序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增。

[来源: GB/T 30989-2014, 3.14]

### 3.11

## 生物信息学分析 Bioinformatics analysis

生物信息分析（以下简称“生信分析”）是对测序得到的原始序列进行数据分析和处理的过程，以预定程序执行。该流程由多个软件组成，包括去除低质量序列和人源序列、处理微生物序列及相关元数据、检测候选目标微生物，实现检测与数据的转换。分析中应考虑预期用途、软硬件功能、数据存储位置、版本号及信息备份等。同时应确保患者信息安全，设置读取规则、人员权限、预警警报，目前已经有商业化的自动分析系统可以选择，实验室选择与国际同先的算法和软件，搭建实验室自己的分析流程，搭建过程中应选择已知阳性样本与质控品进行生物信息学分析能力模拟测试。

### 4 性能要求

#### 4.1 性能验证要求

4.1.1 开展病原体高通量测序临床检测前应完成方法学建立和性能确认，结合预期临床用途确立预期性能指标。

4.1.2 应进行生信流程评估，至少需要包括准确率、召回率、精确率和 F1 值等评估指标。

ACC 按照公式（1）计算：

$$ACC = (TP+TN)/(TP+FN+FP+TN) \dots\dots\dots (1)$$

R 按照公式（2）计算：

$$R = TP/(TP+FN) \dots\dots\dots (2)$$

P 按照公式（3）计算：

$$P = TP/(TP+FP) \dots\dots\dots (3)$$

F1 按照公式（4）计算：

$$F1 = 2PR/(P+R) \dots\dots\dots (4)$$

式中：

ACC——准确率（Accuracy）

R——召回率（Recall）

P——精确率（Precision）

F1——F1 值（F1-Score）

TP——真阳性（True Positive）

FP——假阳性（False Positive）

TN——真阴性（True Negative）

FN——假阴性（False Negative）

4.1.3 应根据检出种特异性序列数，相对丰度等信息，确立生物信息分析阳性检出阈值的标准。

4.1.4 收集一定数量的阳性临床样本，每份样本的上机测序数据量至少为 20 兆（megabyte, M）reads，随机抽取不同数据量梯度的数据重复多次分别进行生信分析流程分析，选择所有临床样本阳性检出率 95% 以上的数据量作为最低测序数据量。

#### 4.2 全流程性能确认

##### 4.2.1 设置质量控制点和风险控制点

应测定构建文库的浓度，同时将测序数据量和测序质量值作为质量控制点。

#### 4.2.2 阳性判断阈值

应根据产品特点对临床样本或模拟样本进行检测，采用受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve, ROC 曲线）或其它合理的模型确定相对合理的报告规则及阳性判断阈值。

#### 4.2.3 最低检出限

根据产品预期用途和技术原理合理选择最低检出限参考品的稀释基质、投入靶标的形态（如菌液、小片段核酸等）和代表性靶标范围，对代表性病原体检出限进行评估，以 95% 的重复均能检测到某一病原体的最低浓度为该病原体的检出限。其中 mNGS 的检出限受宿主细胞/核酸浓度、核酸提取效率、病原体种类等多种因素影响，mNGS 产品检出限性能应至少在高低不同宿主细胞/核酸浓度下进行评估。

#### 4.2.5 精密度确认

根据产品特性对精密度指标做出合理要求，应考虑批次、时间、操作者等影响精密度的条件，设计合理的精密度试验方案。精密度评价试验应为全流程试验，包含核酸提取步骤。对阳性标本，分析结果是指通过生信流程得到的检出病原中包括该参考品中的病原体，则记为正确结果，否则为错误结果。结果一致的实验数占全部实验数比例高于 95%，判断为可接受。

#### 4.2.6 抗干扰确认

应根据产品特性设置合适的质控系统以识别宿主核酸可能对结果造成干扰所引起的假阴性。并以弱阳性标本混合不同浓度的宿主细胞/核酸进行验证。

#### 4.2.7 交叉干扰确认

mNGS 应选取同属内近源物种，将其分别按照一定浓度比例进行混合测序，统计近源物种的检出情况相对丰度比例与预期是否一致。宜在医学相关水平验证交叉物种的假阳性。

#### 4.2.8 稳定性确认

应根据产品特点对采集后各阶段的样本进行稳定性研究，研究内容包括冷藏保存时间、冷冻保存时间、冻融次数等，评估样本的不同储存条件对检测结果的影响情况。所选择样本宜包含弱阳性样本。

#### 4.2.9 临床评估

宜收集明确既往检测结果的脑脊液剩余标本，包含阳性及阴性标本进行检测。对于阳性标本，宜与既往培养结果或使用一代测序或者 ddPCR 等复核，统计总符合率、阳性符合率和阴性符合率。

## 5 检测要求

### 5.1 样本采集与处理

000015. 1.1 应按照 WS/T640-2018 要求进行脑脊液的采集和处理。

5.1.2 应选择符合预期用途并经过确认的脑脊液样本处理程序，每一操作程序的规定要求（性能特征）应与该产品的预期用途和技术原理相关。

### 5.2 企业参考盘的建立与验证

5.2.1 应建立企业参考盘验证产品全流程检测性能，企业参考盘的组成应至少包含阳性参考品、阴性参考品、最低检出限参考品和精密度参考品。

5.2.2 应根据产品预期用途和技术原理合理选择参考品的稀释基质、投入靶标的形态（如菌液、小片段核酸等）和代表性靶标范围。

5.2.3 使用 mNGS 技术原理的产品宜根据产品临床样本类型特点合理选择宿主背景，并设置至少高低两个宿主浓度的企业参考品。

5.2.4 使用企业参考品对全流程进行性能验证，检测结果应符合产品的预期用途。

### 5.3 生信参考盘的建立与验证

5.3.1 应建立生信分析流程性能确认参考盘以验证产品生信分析流程的可靠性，内容应包括但不限于：

- a) 验证近缘物种的相互交叉干扰率评估；
- b) 分析流程的灵敏度评估；
- c) 数据库的完整性和代表性评估。

5.3.2 确认指标主要包括准确率、召回率、精确率、F1-Score 和最低测序数据量。

### 5.4 mNGS 分析流程

生信分析应涵盖以下 4 个模块：

- a) 低质量序列过滤（接头序列，测序质量低的序列，含有 N 的序列，低复杂度序列）；
- b) 宿主序列过滤；
- c) 物种注释，通过与微生物数据库比对确定物种检出信息；
- d) 综合物种检出信息判定阳性检出。

### 5.5 质控要求

应根据产品特点在检测全流程特定的环节合理设置质量控制点。涉及的质控点包括但不限于：

- a) 文库核酸浓度；
- b) 测序数据量；
- c) Q30 值等。

### 5.6 结果解读

结果解读要求主要包括：

- a) 阳性结果提示病原体存在，阴性结果不能完全排除感染的可能；
- b) 宜根据对病原体及对应检测技术原理和性能的了解，对检测结果进行准确的分析和解读，并对异常结果进行复核和处理；
- c) 应结合临床病史和实验室检查结果，对核酸检测结果进行综合分析和解读。

## 5.7 样本保存与记录

提取出的核酸样本宜先进行分装，不宜反复冻融。做好样本来源、取样人员等文档的登记、标记和存档。

## 5.8 质量控制

- 5.8.1 实验室宜按照 GB/T 27025 相关规定，建立完善的质量管理体系并实施。
- 5.8.2 实验室人员应经过培训，具备相应的检测技能，上岗前进行考核，确保其满足工作要求。
- 5.8.3 试剂和设备应符合相关要求，经过批准或注册。建立试剂和设备的管理制度，包括试剂的采购、验收、储存、使用等。设备应当定期进行维护和校准。
- 5.8.4 宜制定检测全流程的操作规程及制度，定期对检测结果进行分析和总结。

## 5.9 安全防护

- 5.9.1 实验室应具备相应的生物安全条件和实验设施设备，宜符合 GB 19489 相关规定。
- 5.9.2 实验室人员宜接受核酸检测技术相关培训和教育，了解并遵循安全规章制度，包括安全防护措施、操作规程和应急处理等。
- 5.9.3 实验室人员处理和检测样本时应穿戴适当的个人防护装备，具体防护要点宜参考 SN/T 2752.4 执行。
- 5.9.4 实验室宜定期进行清洁消毒和生物安全检查。消毒剂选择经批准的合格产品，并按照说明书正确使用。

## 参 考 文 献

- [1] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识 [J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11):681-689. DOI:10.3760/cma.j.cn311365-20200731-00732.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] FERNANDEZ-CARBALLO, B. LETICIA, BROGER, TOBIAS, WYSS, ROMAIN, et al. Toward the Development of a Circulating Free DNA-Based In Vitro Diagnostic Test for Infectious Diseases: a Review of Evidence for Tuberculosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2019, 57(4):e01234-18. DOI:10.1128/JCM.01234-18.
- [5] Chen, Hongbin et al. Clinical evaluation of cell-free and cellular metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. Journal of advanced research, 2024, 55: 119-129. DOI:10.1016/j.jare.2023.02.018
- [6] MILLER, STEVE, NACCACHE, SAMIA N., SAMAYOA, ERIK, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid[J]. Genome research, 2019, 29(5):831-842. DOI:10.1101/gr.238170.118.

[7] Ebinger, Arnt et al. A theoretical and generalized approach for the assessment of the sample-specific limit of detection for clinical metagenomics [J]. Computational and structural biotechnology journal, 2020,19:732-742. DOI:10.1016/j.csbj.2020.12.040.

[8] 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, XXXX, XX(XX): 1-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20230720-00019.

[9] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. Nat Med, 2021, 27(1): 115-124. DOI:10.1038/s41591-020-1105-z.

[10] 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.

[11] 检测和校准实验室能力的通用要求[J]. 口腔护理用品工业, 2019, 29(4):38-53.

[12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验室生物安全通用要求:GB 19489-2008[S]. 2008.

[13] 卫生检疫人员的自我防护规范 第 4 部分: 实验室人员:SN/T 2752.4-2011[S]. 2011.

[14] Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, et al. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. [J] The New England journal of medicine vol. 380,24 (2019): 2327-2340. doi:10.1056/NEJMoa1803396

[15] 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.

[16] 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.

[17] 中华检验医学培训工程专家委员会,中华医学会呼吸病学分会. 成人呼吸道感染病原诊断核酸检测技术临床应用专家共识(2023) [J]. 协和医学杂志, 2023, 14(5):959-971. DOI:10.12290/xhyxzz.2023-0338.

[18] 高通量测序共识专家组. 高通量测序技术在分枝杆菌病诊断中的应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2023, 41(3):175-182. DOI:10.3760/cma.j.cn311365-20221203-00492.

[19] Blauwkamp T A, Thair S, Rosen M J, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease[J]. Nat Microbiol. 2019 Apr;4(4):663-674.

[20] 中国医师协会神经外科医师分会神经重症专家委员会,北京医学会神经外科学分会神经外科危重症学组. 神经外科中枢神经系统感染诊治中国专家共识(2021 版) [J]. 中华神经外科杂志, 2021, 37(1):2-15. DOI:10.3760/cma.j.cn112050-20200831-00480.

[21] CNAS-GL039: 2019 分子诊断检验程序性能验证指南