

国家标准《新型冠状病毒全基因组测序通用技术要求》

征求意见稿编制说明

一、工作简况

本标准由国家药品监督管理局提出，全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。任务来源为国家标准化委员会下发【2024】16号《国家标准化委员会关于下达2024年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》，本项目计划号为20240073-T-464。

本标准的主要起草单位为：中国食品药品检定研究院、中国科学院微生物研究所、中国海关科学技术研究中心、国家卫健委临床检验中心、北京市医疗器械检验研究院、深圳市疾病预防控制中心、中国科学院北京基因组研究所、天津金匙医学科技有限公司、广州微远基因科技有限公司、予果生物科技(北京)有限公司、深圳华大智造科技股份有限公司、四川大学华西医院、中国医学科学院病原生物学研究所、上海伯杰医疗科技股份有限公司、江苏宏微特斯医药科技有限公司。

2024年05月14日在北京召开了标准启动工作会，来自企业、审评、检测机构、医院等126家单位的200余人参加了讨论，国家标准技术审评中心审评二部主任于亚笛、国家药监局医疗器械标准管理中心标准三室主任郭世富、SAC/TC136主任委员陈文祥等专家参加了此讨论。会上成立了起草小组，就标准主要大纲、工作进度及各起草单位承担工作进行了讨论。起草人员分工如下，全篇审核由中国食品药品检定研究院、国家卫健委临床检验中心、北京市医疗器械检验研究院负责，前言至第3章由天津金匙医学科技有限公司、广州微远基因科技有限公司负责，第4-5章由深圳华大智造科技股份有限公司、予果生物科技(北京)有限公司、中国医学科学院病原生物学研究所负责，其余及统稿工作由中国科学院微生物研究所、中国海关科学技术研究中心、深圳市疾病预防控制中心、中国科学院北京基因组研究所、四川大学华西医院、上海伯杰医疗科技股份有限公司、江苏宏微特斯医药科技有限公司负责。本次会议明确标准适用于对口咽拭子、鼻

咽拭子、气道抽吸液、痰液、肺泡灌洗液、其他呼吸道分泌物或病毒培养物等样本中的新型冠状病毒的全基因组测序，包括宏转录组测序法、多重聚合酶链反应（PCR）测序法及杂交捕获测序法等。本文件适用的测序原理包括可逆末端终止测序、联合探针锚定聚合测序、纳米孔测序等。会后根据意见，对草案进行进一步完善。

2024年6月11-12日在北京召开了标准讨论会，来自企业、审评、检测机构、医院等单位的代表共计260余人参加了讨论，邀请到安徽医科大学附属省立医院沈佐君主任、清华大学郭永老师、中国食品药品检定研究院黄杰副所长、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所吴长城主任、上海市东方医院田文杰老师等专家参加了本次标准讨论会，参会代表具有广泛代表性。与会专家对标准内容，标准结构和技术内容进行充分讨论。与会专家及代表对工作组讨论稿进行了全面讨论，形成以下主要意见：

- 1) “4.3 核酸提取及纯化”由原稿的“应对核酸提取及纯化功能，如效率、纯度、完整性等进行验证。”修改为“应对核酸提取及纯化效率，如产量、纯度及完整性等进行验证”。
- 2) “4.4.1 核酸定量”原稿中的“数字PCR方法”可有两种修改方式：①保留，考虑到ddPCR方法是未来定量的趋势，随着时代的发展，应用会越来越广泛；而具体数值应等待本次验证的实验结果完成后，进行补充，如：使用数字PCR方法测定样本中的病毒载量，在浓度 \geq XX copies/mL时，开展全基因组测序；浓度 $<$ XX copies/mL时，不一定满足高通量测序的核酸浓度要求，但可优化实验条件后进行测序。②删除“数字PCR方法”的描述，因现阶段使用qPCR方法足够完成核酸的初步定量工作，无须使用数字PCR进行定量。
- 3) “4.4.2 片段分析（可选）”由原稿的“应对病毒核酸片段分析方法进行验证”修改为“宜对病毒核酸片段分析方法进行验证”。
- 4) “4.5 测序文库制备”增加如下内容：①宏转录组测序法增加“去除宿主/其他病原体RNA（可选）”。②多重PCR测序法增加“应根据新冠变异位点的变化，及时对靶向扩增引物池进行更新”。③应增加纳米孔测序方法。

- 5) “4.9.1 病毒参考基因组”由原稿中的“SARS-CoV-2 MN908947.3”修改为“NC_045512.2”。
- 6) “4.10.4 变异情况分析”删除“包括不限于变异的频率、分布, 及对病毒特性、免疫逃逸能力等的影响”, 增加“并注释其对应氨基酸的变化”。同 5.10.4。
- 7) “5.6 测序文库质量控制”删除“使用荧光定量仪器”、“片段分析仪器”内容。
- 8) “5.8 测序数据质量控”由原稿的“应进行 Q20、Q30 的统计和评估”改成“应进行碱基的质量值进行分析和统计”。

2024 年 6 月至 7 月, 秘书处组织开展了验证工作, 发出了验证方案和验证稿, 共计 13 家单位报名参与验证。在验证数据、结果的基础上, 起草小组经过充分讨论, 形成征求意见稿。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的论据

1、标准制定的意义、原则

新型冠状病毒全基因组测序可用于病毒突变检测分型, 对病毒突变监测和疫苗研制等具有重要意义。在国务院联防联控机制综合组发布的《新型冠状病毒感染防控方案(第十版)》中明确常态化和应急情况下需要开展重点监测工作, 主要开展病毒变异监测、个案报告、哨点医院监测、不明原因肺炎监测、城市污水监测等。但是目前尚无统一的标准对新型冠状病毒全基因组测序的方法和技术要求进行规范, 对临床使用上的风险不易把控, 所以急需研制一个国家标准规定通用技术要求。国家标准的制定将有助于规范新型冠状病毒全基因组测序并统一标准。不仅如此, 还可以此为文本参考, 为下一次疫情的发生做准备。

2、本标准性能指标制定依据, 对于有争议指标的处理及验证情况。

本标准性能指标制定主要包括病毒核酸质量控制、测序文库制备、测序文库质量控制、测序、测序数据质量控制、病毒基因组比对、病毒基因组组装和分型等, 基于体外诊断试剂标准品和实验室用户的要求的质量标准制定。

本标准的起草及工作组研讨过程中, 主要争议在于“病毒核酸质量控制”、“病毒参考基因组”、“变异情况分析”等。经充分讨论后, 起草工作组达成以

经后续意见征集及专家讨论后，根据征集到的意见及专家讨论后建议，最终送审稿版本删除了“数字 PCR 方法”的描述，并根据最新发布的 GB-T1.1-2020 对标准格式进行了修改。

本标准的制定过程中，使用“新型冠状病毒全基因组测序验证样本（批号：20240228）”，依据《新型冠状病毒全基因组测序通用技术要求》的各项要求，对样本、核酸提取及纯化、病毒核酸质量控制、病毒核酸定量、测序文库制备、测序文库质量控制、测序、测序数据质量控制、病毒基因组比对、病毒基因组组装和分型等项目进行验证。验证时严格按照各试剂盒的产品说明书进行操作和判定结果，验证单位是所有的标准起草参与单位，在验证结果的基础上制定客观、科学的性能要求和试验方法，目的是能有效规范方法的质量控制，保证方法的科学性。

表 1 第 1 家~第 8 家验证单位的验证结果(20240073-T464-001~20240073-T464-008)

[illegible]

4.5 测序文库制备	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.6 测序文库质量控制	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.7 测序	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.8 测序数据质量控制	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.9 病毒基因组比对	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.10 病毒基因组组装和分型	符合要求	符合要求	符合要求	部分验证	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求

表 2 第 9 家~第 15 家验证单位的验证结果(20240073-T464-001~20240073-T464-008)

20240073-T464-	009	010	011	012	013	014	015
4.1 生物安全	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.2 样本	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.3 核酸提取及纯化	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.4 病毒核酸质量控制	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.5 测序文库制备	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.6 测序文库质量控制	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.7 测序	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.8 测序数据质量控制	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求	符合要求
4.9 病毒基因组比对	S1-S4 符合要求, S5 不符合要求	S1-S4 符合要求, S5 不符合要求	符合要求	符合要求	S1-S4 符合要求, S5 不符合要求	符合要求	符合要求
4.10 病毒基因组组装和分型	S1-S4 符合要求, S5 不符合要求	S1-S4 符合要求, S5 不符合要求	符合要求	符合要求	S1-S4 符合要求, S5 不符合要求	符合要求	符合要求

根据本次实验验证的结果,标准条款 4.1 生物安全-4.8 测序数据质量控制均符合要求,且满足实验室用户的需求。4.9 病毒基因组比对、4.10 有 2 家表示 S1-S4 符合要求, S5 不符合要求。分析原因, S5 样本的理论浓度为 10^4 copies/mL、 10^3 copies/mL、 10^2 copies/mL, 浓度较低, 使用实时荧光定量 PCR 的方法检测 Ct 值一般大于 32, 所以获得基因组的数据质量偏低, 未能完成病毒基因组组装和分型。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度, 以及与国际、国外同类标准水平的对比情况, 或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。

国外对于此类产品没有相应的体外诊断试剂国际参考品及相应的标准要求。本标准首次描述了新型冠状病毒全基因组测序方法的术语和定义、要求、试验方法, 与现有法律、法规和强制性标准保持协调统一, 同时符合《医疗器械标准制修订工作管理规范》的规定进行制定, 并与相关法律、法规和强制性标准保持一致, 并参考相关标准规范:

GB/T 40982—2021 新型冠状病毒核酸检测试剂盒质量评价要求

GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

本标准与 GB/T 40982—2021 相比，适用的仪器类型、检测试剂盒均不同；与 GB/T 30989—2014 相比，测序靶标针对新冠病毒的全基因组测序，且增加了多重 PCR 扩增及杂交捕获法；与 GB/T 40226—2021 的相比环境微生物 DNA 检测的方法，本标准针对新冠病毒为 RNA 样本类型，适用范围不同。

五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系。

本标准参照我国体外诊断试剂相关法规制定，与法规的要求保持一致。本标准与现行的法律、法规和其他相关标准有无冲突。符合现有医疗器械监管法律法规要求。

六、重大分歧意见的处理经过和依据。

本标准制定过程中未出现重大分歧意见。

七、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议。

建议本标准为推荐性标准。

八、贯彻国家标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

建议在本标准发布后实施前进行标准宣贯，宣贯对象是企业、各级医疗器械监管查验审评部门。

建议标准发布后 12 个月实施。

九、废止现行有关标准的建议。

无。

十、其他应予说明的事项。

本标准不涉及专利，不存在版权风险。

标准起草工作组

2024 年 07 月 30 日