



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXX

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

Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems —metagenomic next generation sequencing validation

征求意见稿

2024 年 7 月 30 日

×××× - ×× - ××发布

×××× - ×× - ××实施

国家市场监督管理总局

国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由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。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

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

1 范围

本文件规定了医学实验室采用病原宏基因组高通量测序开展临床检测前：1) 关键实验环节的性能确认，包括标本采集运输及保存、标本前处理及核酸提取、文库制备、测序、生物信息学分析等关键环节；2) 病原宏基因组高通量测序完整流程的分析性能确认，包括精密度、检出限、稳定性、分析特异性和准确度等的性能确认要求。

本文件适用于拟开展病原宏基因组高通量测序的临床实验室，在开展临床检测前，进行方法学性能确认过程中使用，也适用于使用大规模并行下一代测序技术建立的病原宏基因组高通量测序的性能确认。

本文件不适用于采用生物纳米孔、固态纳米孔等为主要技术原理的单分子病原宏基因组高通量测序的性能确认，且不适用于采用靶向探针杂交捕获或多重引物扩增技术建立的病原高通量测序的性能确认。

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。

CLSI EP7-A2-2005 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition

CLSI GP10-A-1995 Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristics (ROC) Plots; Approved Guideline

ISO/IEC TS 4213-2022 Information technology — Artificial intelligence — Assessment of machine learning classification performance

ISO/TS 24420-2023 Biotechnology — Massively parallel DNA sequencing — General requirements for data processing of shotgun metagenomic sequences

GB 50346-2011 生物安全实验室建筑技术规范

GB/T 27025-2019 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 29791.1-2013 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息标示第1部分：术语定义和通用要求

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 37875-2019 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范

GB/T 42186-2022 医学检验生物样本冷链物流运作规范

GB/T 42060-2022 医学实验室--样品采集、运送、接收和处理的要求

WS/T 250 临床实验室质量保证的要求第1部分：通用要求

WS/T 348-2024 尿液标本的采集与处理

WS/T 408-2024 定量检验程序分析性能验证指南

GB/T XXXXX—XXXX

WS/T 416-2013 干扰实验指南

WS/T 442-2024 临床实验室生物安全指南

WS/T 505-2017 定性测定性能评价指南

WS/T 514 临床检验方法检出能力的确立和验证

WS/T 640-2018 临床微生物学检验标本的采集和转运

WS/T 807-2022 临床微生物培养鉴定和药敏检测系统的性能验证

YY/T 1579-2018/ISO 23640:2015 体外诊断医疗器械 体外诊断试剂稳定性评价

YY/T 1723-2020 高通量基因测序仪

YY/T 1789.1-2021 体外诊断检验系统 性能评价方法 第1部分：精密度

YY/T 1789.3-2022 体外诊断检验系统 性能评价方法 第3部分：检出限与定量限

YY/T 1789.6-2023 体外诊断检验系统 性能评价方法 第6部分：定性试剂的精密度、诊断灵敏度和特异性

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

高通量测序 high-throughput gene sequencing

区别于传统Sanger（双脱氧法）测序，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100 Mb的测序数据。

[GB/T 30989-2014, 3.19]

3.2

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。

[ISO/TS 24420-2023, 3.23, 有修改]

3.3

性能确认 validation

通过提供客观证据对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定。

[GB/T 19000-2016, 3.8.13, 有修改]

3.4

测序读长 read length of gene sequencing

单次运行可读取的质量合格的序列片段长度，通常以碱基数表示。

[GB/T 30989-2014, 3.24, 有修改]

3.5

碱基识别 base calling

测序过程中从荧光信号或其它由于测序反应而产生的信号转换成序列信息的过程。

[GB/T 30989-2014, 3.26]

3.6

碱基识别质量 quality of base calling

衡量碱基正确识别的概率。通常以ASCII码直接表示。

[GB/T 30989-2014, 3.29]

3.7

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文库等。

[GB/T 30989-2014, 3.5, 有修改]

3.8**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。

[GB/T 29859-2013, 2.1.1]

3.9**每百万序列数 reads per million, rpm**

每百万测序读长中匹配到某微生物基因组的特异读长数。

[GB/T 30989-2014, 3.31]

3.10**测序覆盖度 coverage rate**

待测标本检出的病原体核苷酸序列检测结果覆盖于对应病原体参考全长基因组（属/种水平）的比例(测序覆盖度%=覆盖区域长度/参考序列总长度 100%)。

[GB/T 30989-2014, 3.30, 有修改]

3.11**相对丰度 relative abundance**

某微生物物种序列在相应分类(通常分成细菌、真菌、病毒、寄生虫4大类)中的占比。

[ISO/TS 24420-2023, 3.19, 有修改]

3.12**近缘物种 closely related species**

在进化树上彼此亲缘关系较近的物种。

3.13**临界点或值 cut off**

在定性试验中，临界点是指检测反应的某一点，低于此检测反应点的定性检测结果被判定为阴性，而高于此点则被判定为阳性。

[WS/T 505-2017, 3.13]

3.14**实验室背景 background laboratory contamination**

除了标本中的微生物核酸外，mNGS结果中包含来自试剂、耗材、实验室表面的微生物核酸序列，被称为实验室背景，可通过检测阴性质控或空白对照进行监控。

[FDA-2016-D-0971, 有修改]

3.14**精密度 precision**

在规定条件下，对同一或相似被测对象重复测量得到测量示值或测得量值间的一致程度。

[GB/T 29791.1-2013, A.3.29]

3.15**重复性 repeatability**

在一组测量条件下的测量精密度，包括相同测量程序、相同操作者、相同测量系统、相同操作条件和相同地点，并且在短时间段内对同一或相似被测对象重复测量。

[GB/T 29791.1-2013, A.3.30]

3.16

中间精密度 intermediate precision

在一组测量条件下的测量精密度，这些条件包括相同的测量程序、相同地点并且对相同或相似的被测对象在一长段时间内重复测量，但可包含其他相关条件的改变。

[GB/T 29791.1-2013, A.3.20]

3.17

检出限 detection limit, limit of detection, LoD

描述一个检验程序以特定置信水平能报告为存在的被测量最低值。它也被用来指最小可检测浓度。

注：分析灵敏度有时用于表示检出限。

[GB/T 29791.1-2013, A.2.7和A.2.8]

3.18

稳定性 stability

试剂组分在规定保存条件、冻融次数、时间界限内保持其性能特性的能力。

[GB/T 29791.1-2013, 3.68, 有修改]

3.19

分析特异性 analytical specificity

测量系统的能力，用指定的测量程序，对一个或多个被测量给出的测量结果互不依赖也不依赖于接受测量的系统中的任何其他量。

示例：测量系统用碱性苦味酸程序测量血浆肌酐浓度不受葡萄糖、尿酸、酮体或蛋白浓度干扰的能力。

注：测量程序的特异性不应和诊断特异性混淆。

[GB/T 29791.1-2013, A.3.4]

3.20

干扰 interfering

因样品其他成分或特性的影响而产生的检验结果变化。

[WS/T 408—2024, 3.6]

3.21

交叉反应 cross-reactivity

采用配对比较的方法，明确具有同源性或相近的病原体核酸片段同时存在或单独存在时，对检测结果的影响。

3.22

准确度 accuracy

被分析物质的测定结果与真实结果之间的接近程度。

[WS/T 505-2017, 3.4]

3.23

敏感性 sensitivity

真阳性率 true positive rate

在患有明确临床疾病的患者中，诊断性试验检测为阳性或超过决定限例数的比例，反映新试验正确判断是否罹患某种疾病的能力。

[WS/T 505-2017, 3.9]

3.24

特异性 specificity

真阴性率 true negative rate

在没有特定临床疾病的患者中，诊断性试验结果为阴性或在决定限范围内的比例，特异性反映新试验正确排除某病的能力。

[WS/T 505-2017, 3.10]

4 要求

mNGS 检测对实验室工作人员专业知识和能力、软件、硬件要求较高，拟开展 mNGS 检测的实验室可依据卫办医政发 194 号文件《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》、GB/T 30989-2014、GB 50346-2011、WS/T 442-2024 等相关文件要求进行实验室建设。

进行性能确认前，应根据临床预期用途，明确适用人群和标本类型，并根据科学研究证据、指南、共识等确定待测病原谱及其临床意义等。实验室需根据待测标本类型和病原谱建立包括标本采集运输及保存、核酸提取、文库制备、上机测序、生物信息分析流程、数据库等完整的检测系统，形成标准操作程序（Standard Operation Procedure System, SOPs）。在临床检测前，应进行检测系统（包含人、机、料、法、环等）的分析性能确认。

检测系统的测序仪、核酸提取试剂、文库制备试剂、上机测序试剂、生物信息分析流程、数据库、标本类型、病原谱、SOPs 等在性能确认过程中不应进行任何修改。性能确认过程包括性能确认标本的制备、关键实验环节的性能确认和完整流程的分析性能确认，最终建立检测系统检测标本中各病原体的检测性能指标，明确所用检测系统是否满足临床预期用途及检测局限性。如果性能确认过程中，实验室改变或优化了检测系统的试剂组分、操作流程、仪器设备等，应根据影响程度进行全流程或部分检测环节的分析性能确认。

4.1 性能确认标本的制备

实验室应严格遵循预期临床用途所涉及的标本类型和病原谱，合理制备性能确认标本。如预期临床用途涉及不同的标本类型，应分别制备性能确认标本。配制完成后应立即放置于合适的温度保存至性能确认开始。根据制备过程不同，性能确认标本可分为临床标本、模拟的阳性标本和计算机模拟的测序数据3种形式：

- a) 临床标本：理想的性能确认标本是预期临床应用检测的临床标本。实验室无法获取足够的、能代表各种类型病原体、合适浓度的阳性临床剩余标本时，建议使用模拟阳性标本完成性能确认。如临床预期用途拟检测病原体耐药基因，应根据检测的耐药基因范围制备性能确认标本，以临床耐药表型或其他耐药基因检测方法为比较方法，对相关分析性能进行确认；
- b) 模拟的阳性标本：为避免基质效应，模拟阳性标本时，建议使用检测结果明确的阴性临床剩余标本作为稀释基质。建议根据性能确认方案需要的标本量，将已溯源或定量的阳性临床剩余标本、标准微生物菌株等掺入阴性临床剩余标本中模拟阳性标本。如实验室拟对游离DNA检测流程进行性能确认，建议在阴性临床剩余标本中加入片段长度分布及浓度与阳性临床标本一致的病原体核酸。模拟阳性标本建议覆盖细菌、真菌、病毒、寄生虫等。如病原谱仅包含部分病原体种类，可只制备病原谱范围内的模拟阳性标本，如病原谱中只包含病毒，可只模拟病毒阳性的性能确认标本；
- c) 计算机模拟的测序数据：对于病原谱范围内不易获取真实临床阳性标本或标准微生物菌/毒株的物种时，建议在既往检测结果为阴性的测序数据中加入模拟的病原测序数据生成模拟测序数据。病原测序数据的模拟主要分为两个步骤：（1）从数据库中下载高质量参考基因组并进行数据清洗、打断；（2）使用软件模拟生成测序数据，相关参数建议参考真实测序数据的情况进行设置，比如序列长度75bp，测序错误率1/1000等。最终临床标本测序数据与计算机模拟的测序数据整体形成生物信息学性能确认标本。

建议覆盖病原谱范围内的所有病原体，并设置不同序列梯度（如10000条、1000条、100条、10条、1条）和比例（如1:0、1:1、1:3）的近缘病原体序列。

4.2关键实验环节的性能确认

实验室应对标本采集运输及保存、标本前处理及核酸提取、文库制备、测序、生物信息学分析等关键环节分别进行性能确认，而后对完整实验流程的分析性能进行系统性性能确认。

4.2.1标本采集运输及保存环节的性能确认

规范微生物标本的采集运输，保证检测标本为合格标本是检测结果准确的前提。建议实验室参考已有标本采集要求文件，如WS/T 640-2018、WS/T 348-2024等，制定正确的标本采集手册，确保负责采集标本人员方便获取，并能正确实施手册要求。同时，标本采集手册应当明确说明标本采集容器、标本转运方法和时限要求，以保证医护人员、标本转运人员在标本采集之前能获得有关标本采集和转运的准确信息。如实验室或临床科室拟使用不同的标本采集容器进行标本采集，应分别完成不同采集容器的标本采集运输及保存环节的性能确认。

转运标本宜采用专用的转运箱，按不同运输距离和环境条件，选择合适的标本转运箱，并对运输过程中的标本位置及其保存温度进行监控并保留记录。临床检验标本院内转运时，建议采用生物危害标识的标本袋包装，防止标本泄露后污染其他标本及运输箱。院外转运时，如标本确诊或疑似为高致病性病原微生物（毒）种或标本，其运输应按照《可感染人类的高致病性病原微生物（毒）种或样本运输管理规定》办理相关准运证。实验室应参考GB/T 42060-2022建立标本评价要求文件。收到标本后立即对标本的质量进行评价，建议至少包括标本唯一性标识、标本量、标本转运条件等。

宜选用新鲜标本进行核酸提取，若不能保证随到随检，应立即分装后按照标本特性妥善保存。不同标本类型和病原体的预处理方法和稳定时间存在差异。建议实验室充分考虑实际临床应用过程中标本的保存条件和检测频率，参考国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心制定的《猴痘病毒核酸检测试剂注册审查指导原则》（2024年第10号）对标本稳定性进行确认。具体如下：

- a) 确认方法：使用制备的弱阳性标本和阴性标本，在不同温度（如：-80℃、-20℃、4℃、常温）、不同保存时长（如：1天、3天、7天）、不同冻融次数（如：1次、2次、3次）的条件下保存。使用实验室已验证的荧光定量法（qPCR法或ddPCR法等），对每种保存条件下的标本进行3次重复检测。
- b) 分析：统计符合率大于等于95%的保存条件，确认标本稳定转运和保存的温度、时长和冻融次数要求。

4.2.2标本前处理及核酸提取试剂的性能确认

实验室根据待检标本类型选择标本前处理及核酸提取流程，主要包括研磨、液化、去宿主、裂解和纯化等步骤。临床应用前，应对拟采用的试剂或设备进行性能确认，建议实验室参考GB/T 37875-2019中5.1-5.7评价方法中的相关要求，确认标本前处理及核酸提取试剂的产量、纯度、完整度，及其重复性、再现性和批间差异等性能。具体如下：

- a) 确认方法：建议优先采用标本类型一致或接近的标准物质。当没有合适的标准物质时，建议使用4.1配制的临床标本或模拟临床阳性标本和弱阳性标本。根据GB/T 37875-2019中5评价方法的规定，建议实验室：①使用既定流程，在同一实验室，由同一操作员，使用相同的设备，采用同一批次核酸提取试剂，在1d内重复提取不少于6份平行标本；②使用既定流程，在同一实验室，由不同的操作员，使用相同的设备，采用不同批次核酸提取试剂，在不同天内重复提取不少于3份平行标本；
- b) 分析：建议实验室参考GB/T 37875-2019中5评价方法的计算公式，确认标本前处理及核酸提取试剂的产量（鉴于mNGS所检测标本中具体病原体的含量差异大，且提取试剂对于不同类型病原体的提取效率存在差异，建议使用荧光定量法定量）、纯度、完整度，及其重复性、再现性和批间差异等。

4.2.3文库制备试剂的性能确认

文库的质量对于测序数据的质量至关重要，文库片段长度分布和文库浓度应符合高通量测序仪测序要求。不同实验室所用建库流程和试剂（逆转录（RNA流程）、纯化、核酸片段化（包括但不限于酶

切法、超声波法等）、末端修复、接头连接、PCR扩增、文库片段筛选及纯化等）存在差异，同一实验室的试剂和流程应在性能确认前明确。建议确认所制备文库的片段长度分布、纯度、浓度及总量，并对文库制备试剂的重复性、再现性和批间差异进行性能确认。具体如下：

a) 确认方法：使用已确认过的标本前处理及核酸提取流程，提取4.1制备的性能确认标本的核酸，进行文库制备。①使用既定流程，在同一实验室，由同一操作员，使用相同的设备，采用同一批次试剂，在1d内重复制备不少于6份平行标本的文库；②使用既定流程，在同一实验室，由不同的操作员，使用相同的设备，采用不同批次试剂，在不同天内重复制备不少于3份平行标本的文库；

b) 分析：使用可及的测定方法确认文库片段长度分布、纯度、浓度及总量，文库制备试剂的重复性、再现性和批间差异性能确认计算方法，建议参考GB/T 37875-2019中5的方法。①文库长度分布：使用片段长度分析仪器对文库长度检测，重复建库结果应呈现出单一的、圆滑的峰且接近正态分布，并根据检测结果确定长度分布范围和文库平均长度；②文库纯度：建议使用紫外分光光度法，测定260 nm、280 nm、230 nm下的光密度OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₂₃₀，计算OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀值，确认文库的纯度；③文库浓度及总量：建议采用紫外分光光度法、荧光定量法等测定文库浓度，并计算得到文库的总量。

4.2.4测序仪器及试剂的性能确认

不同测序平台特异性参数各异，包括仪器大小、通量、读长、运行时间及测序成本等，实验室应结合具体的临床应用需求选择合适的测序仪器。建议实验室参考YY/T 1723-2020中4.4要求，完成测序仪器及试剂的测序覆盖率和测序平均深度、测序准确率、重复性等的性能确认。具体如下：

a) 确认方法：建议实验室使用来源稳定、溯源信息完备和参考序列信息已知的标本、标准菌株或参考品等，按照测序仪器厂商提供的测序标本制备流程和测序操作进行测序标本处理、质控，重复3次上机测序；

b) 分析：建议实验室参考YY/T 1723-2020中4.4中计算方法，确认测序仪器及试剂的测序覆盖率和测序平均深度、测序准确率、重复性。

4.2.5生物信息学分析流程的性能确认

生物信息学分析流程是mNGS的重要组成部分，建议实验室参考2018年加强流行病学中观察性研究报告质量指南（Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology, STROBE）和美国病理协会等学术组织，提出的高通量测序生物信息学分析流程性能确认标准中的要求进行性能确认，明确生物信息学分析软件是否满足临床预期用途，并获得软件存在的缺陷及潜在预期风险。性能确认内容建议包括：①根据病原谱范围，模拟不同序列梯度的单物种阳性测序数据，确认生物信息学分析流程对于拟报告范围内的物种鉴定能力；②模拟进化上近缘的物种阳性测序数据，并按照不同比例进行混合后分析，确认生物信息学分析流程中近缘物种的交叉干扰率；③实验室参考CLSI GP10-A-1995中的要求建立cut off值。建议实验室采用具有统计学意义数量的受试者标本建立cut off值，可依据序列数、相对丰度的具体数值或与空白对照和/或阴性质控的比值等。对临床标本的测序数据进行分析，通过建立受试者工作特征曲线（ROC），计算出每类物种的cut off值。cut off值的建立应考虑实验室背景，实验室背景监测的方案包括但不限于：①批次内实验室背景监测：通过空白对照和/或阴性质控监控每批次检测的实验室背景；②批次间实验室背景监测：实验室背景受试剂耗材批次、季节、人源细胞含量等影响，建议实验室定期更新实验室背景数据和cut off值。具体如下：

a) 确认方法：使用固定版本的生物信息学分析软件和数据库，对4.1中制备的计算机模拟测序数据和真实临床标本的测序数据进行生物信息学分析。纳入研究的标本或数据应来源于检测项目结果应用的代表性人群，且检测结果应为已被实验室和/或临床标准确定。如性能确认过程中发现分析软件存在缺陷应及时进行修补，分析软件重大更新遵循风险从高原则，建议使用性能确认数据和临床标本测序数据重新确认检测系统的实验室背景、cut off值等性能后更新；

b) 分析：

(1) 物种鉴定能力：建议实验室参考ISO/IEC TS 4213-2022中5.1的要求，按照公式(1)~公式(4)统计确认准确率、召回率、精确率、F₁度量(精确度和召回率的调和平均值)；

$$A = (T_P + T_N) / (T_P + F_N + F_P + T_N) \dots\dots\dots (1)$$

$$R = T_P / (T_P + F_N) \dots\dots\dots (2)$$

$$P = T_P / (T_P + F_P) \dots\dots\dots (3)$$

$$F_1 = 2T_P / (2T_P + F_P + F_N) \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A——准确率

R——召回率

P——精确率

F₁—— F₁ 度量

T_P——真阳性

F_P——假阳性

T_N——真阴性

F_N——假阴性

(2) 近缘病原体的交叉率：统计分析结果，计算不同近缘物种间的交叉率。以此交叉率为准，明确分析结果出现两种近缘物种时，判定某物种明确检出的近缘物种比例范围；

(3) cut off值的建立方法：统计分析结果，计算出每类物种在不同cut off的敏感性(公式(5))和特异性(公式(6))。在x轴和y轴上分别绘制出1-特异性和敏感性的变量，在直角坐标系中标出各点并连成曲线(即受试者工作特征曲线(ROC))。取正确指数(也称约登指数)(公式(7))最大值对应的cut off值为最优cut off值。

$$S_E = T_P / (T_P + F_N) \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

$$S_P = T_N / (T_N + F_P) \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

$$Y_I = (S_E + S_P) - 1 \dots\dots\dots (7)$$

式中：

S_E——敏感性

S_P——特异性

Y_I——约登指数

4.3完整流程的分析性能确认

实验室应对精密度、检出限、稳定性、分析特异性和准确度进行性能确认。宿主细胞浓度不同，mNGS的cut off、LoD等可能存在差异。建议有条件的实验室设置不同宿主细胞浓度水平的性能确认标本，分别进行性能确认。

4.3.1 精密度

建议实验室参考WS/T 408—2024中的相关要求，对检测体系的重复性(批内)和中间(实验室内)精密度指标(标准差或变异系数)进行确认。如实验室检测结果只提示病原体阴性或阳性，而不包含物种的序列数、相对丰度和覆盖度等量值，可仅评估重复性。具体如下：

a) 确认方法：采用同批次试剂，对阳性标本、弱阳性标本和阴性标本进行至少5批次检测，每批次重复检测每种标本至少3次完整检测；

b) 分析：重复性确认应统计阴阳性符合率是否超过95%；中间精密度确认建议用一般办公软件计算每个标本每批实验结果（cut off值）的均值和标准差，计算各批均值的均值（总均值），平均批内标准差，批间标准差和实验室内标准差。

4.3.2 LoD

建议实验室参考YY/T 1789.3-2022中的5 LoD建立方法，建立LoD并进行确认，通常使用LoD_{95%}表示，即有95%的可能能够正确检出病原体的最低病原体浓度。具体如下：

a) 建立方法：建议采用可溯源的标准物质、培养物或阳性标本作为阳性掺入物，阴性标本作为稀释基质进行梯度稀释。对梯度稀释的标本重复检测，记录不同稀释度/浓度检出（或阳性）的结果。采用适当的模型和分析方法（如Probit分析），计算95%阳性检出率水平时的病原体浓度作为LoD；

b) 确认方法：制备LoD浓度水平的阳性标本至少20份，阳性检出率大于等于95%。

注：宿主细胞浓度的改变会影响mNGS的LoD，实验室进行初次性能确认时，建议使用常见宿主细胞浓度水平的标本，初步建立LoD及其他性能指标，并进行确认。

4.3.3稳定性

建议实验室参考YY/T 1579-2018/ISO 23640:2015中的相关要求，在规定的试剂储存和处理条件下，确认其仍保持性能稳定。具体如下：

a) 确认方法：参考试剂说明书要求，将试剂组份反复冻融、保存到试剂说明书声称的次数或时间，之后对阳性标本、弱阳性标本和阴性标本进行检测；

b) 分析：统计符合率大于等于95%的值，以确认试剂稳定性。

4.3.4分析特异性

建议实验室分析特异性性能确认，明确标本中的内源或外源干扰物质、近缘物种或序列对检测结果的影响。

4.3.4.1 干扰试验

建议实验室参考WS/T 416-2013中的相关要求，完成干扰物质研究。实验室应选择涵盖预期用途和干扰因素的标本进行评价研究，干扰物质一般包括内源性物质（血红蛋白、甘油三酯、胆红素等）、外源性物质（药物、抗凝剂等），建议使用实际可能存在的干扰物质及浓度进行研究。具体如下：

a) 确认方法：重复检测加入干扰物质的阳性标本、弱阳性标本至少3次；

b) 分析：统计符合率大于等于95%的值，确认不同干扰物质对检测结果的干扰程度。

4.3.4.2 交叉反应

建议实验室参考CLSI EP7-A2-2005中的相关要求，根据临床预期用途病原谱，选取代表性近缘物种阳性标本，如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌、白念珠菌和热带念珠菌，明确近缘物种的交叉率。具体如下：

a) 确认方法：近缘物种分别按照相近浓度和一高一低的浓度比例进行混合，而后进行检测；

b) 分析：统计实际检出的序列数或相对丰度等指标，明确近缘物种的交叉率。

4.3.5准确度

建议实验室参考WS/T 505-2017中9.3要求评价方法的准确度，比较方法建议选择但不限于培养、PCR、一代测序等方法。阳性标本建议每类病原体均有一定阳性例数，不宜采用健康人标本。鉴于方法学的复杂性和临床阳性标本的随机性，首次性能确认时部分确认可报告范围，临床应用过程中，应对可报告范围持续关注 and 确认。具体如下：

a) 确认方法：建议使用mNGS和比较方法并行连续检测临床标本，建议比较方法获得至少50例阳性标本和50例阴性标本。mNGS与比较方法结果有差异的标本，可采用“金标准”或“参考方法”进行确认；

b) 分析：按照公式计算检测试剂的敏感性/真阳性率（公式（5））和特异性/真阴性率（公式（6））。

5.性能确认报告

在性能确认过程中，应记录所有性能确认检测的情况，并对检测结果进行整理，形成性能确认记录文档并指导临床检测。报告中建议明确以下内容：

a) 使用的确认流程

性能确认报告中应包含性能确认过程中所用检测系统的详细信息，包括测序仪、核酸提取试剂、文库制备试剂、上机测序试剂、生物信息分析流程软件版本号、数据库版本号、标本类型、病原谱、SOPs等；

b) 预期用途

性能确认报告中，应根据性能确认结果，明确所用检测系统是否能够满足性能确认前设定的预期用途，应体现已进行性能确认的标本类型和病原体检测性能，做为已确认的可报告范围。若发现部分病原体的检测性能无法达到预期的检测性能，建议继续修改、优化检测系统后完成性能确认，或将其从可报告范围中删除；

在临床应用过程中，实验室应定期回顾临床病例资料，统计检验结果与临床的符合率，分析检测结果可能存在的问题，识别前期未预见的风险，并优化检测流程以提高准确性和可靠性；

c) 分析性能确认原始数据及结果

原则上性能确认报告中应包含全部的原始实验记录，性能确认报告应客观展示所用检测系统的局限性，明确检测系统的性能参数，比如关键环节（标本采集运输及保存、标本前处理及核酸提取、文库制备、测序、生物信息学分析等）和完整流程（精密度、检出限、稳定性、分析特异性、准确度等）的性能。测序数据及分析流程的原始数据和记录较多时，应将原始数据和记录保存至固定的电脑或服务器中，并在性能确认报告中明确保存的位置以便随时调取；

d) 局限性

性能确认报告中检测系统的局限性说明主要包括两个层面：①性能确认过程中已明确的局限性，比如对于病原谱范围内部分病原体，未能获得阳性临床剩余标本和模拟阳性标本导致不能完成完整流程性能确认时，应按 mNGS 无法准确检出的病原体对待，需使用其他方法（如 PCR 法、Sanger 测序法）对临床检测的阳性结果进行确认，或在检测报告中注明检测局限性；②性能确认中无法确认的分析性能参数，比如果临床实验室拟检测多种标本类型，未经性能确认的标本类型应被视为无法准确检出的标本，均应在性能确认报告中进行阐述说明。

参 考 文 献

- [1] 张栋,张京家,杜娟,等. 病原宏基因组高通量测序性能确认方案[J]. 中华检验医学杂志,2022,45(9):899-905. DOI:10.3760/cma.j.cn114452-20220721-00426.
- [2] Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Infectious Disease Next Generation Sequencing Based Diagnostic Devices: Microbial Identification and Detection of Antimicrobial Resistance and Virulence Markers; Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff; Availability. FDA-2016-D-0971.
- [3] RoyS, ColdrenC, KarunamurthyA, et al. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(1):4-27. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.003.
- [4] Dalianis, H. (2018). Evaluation Metrics and Evaluation. In: Clinical Text Mining. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-78503-5_6
- [5] Han D, Li Z, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity[J]. Crit Rev Microbiol, 2019,45(5-6):668-685. DOI: 10.1080/1040841X.2019.1681933. [2] Charalampous T, Kay GL, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nat Biotechnol, 2019,37(7):783-792. DOI: 10.1038/s41587-019-0156-5.
- [6] Greninger AL, Naccache SN. Metagenomics to Assist in the Diagnosis of Bloodstream Infection[J]. J Appl Lab Med, 2019,3(4):643-653. DOI: 10.1373/jalm.2018.026120.
- [7] Mitchell SL, Simner PJ. Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology: Are We There Yet?[J]. Clin Lab Med, 2019,39(3):405-418. DOI: 10.1016/j.cll.2019.05.003.
- [8] Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2010,23(3):550-576. DOI: 10.1128/CMR.00074-09.
- [9] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017,141(6):776-786. DOI: 10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [10] Jing C, Chen H, Liang Y, et al. Clinical Evaluation of an Improved Metagenomic Next-Generation Sequencing Test for the Diagnosis of Bloodstream Infections[J]. Clin Chem, 2021,67(8):1133-1143. DOI: 10.1093/clinchem/hvab061.
- [11] Miller S, Naccache SN, Samayoa E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid[J]. Genome Res, 2019,29(5):831-842. DOI: 10.1101/gr.238170.118.
- [12] Xie F, Duan Z, Zeng W, et al. Clinical metagenomics assessments improve diagnosis and outcomes in community-acquired pneumonia[J]. BMC Infect Dis, 2021,21(1):352. DOI: 10.1186/s12879-021-06039-1.
- [13] Xie Y, Du J, Jin W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia: China, 2010-2018[J]. J Infect, 2019,78(2):158-169. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.09.004.
- [14] Murphy CN, Fowler R, Balada-Llasat JM, et al. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia/Pneumonia Plus Panel for Detection and Quantification of Agents of Lower Respiratory Tract Infection[J]. J Clin Microbiol, 2020,58(7)DOI: 10.1128/JCM.00128-20.
- [15] Webber DM, Wallace MA, Burnham CA, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for Detection of Viral and Bacterial Pathogens in Lower Respiratory Tract Specimens in the Setting of a Tertiary Care Academic Medical Center[J]. J Clin Microbiol, 2020,58(7)DOI: 10.1128/JCM.00343-20.
- [16] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet, 2019,20(6):341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.

- [17] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018,34(17):i884-884i890. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- [18] Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015,43(Database issue):D670-681. DOI: 10.1093/nar/gku1177.
- [19] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009,25(14):1754-1760. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- [20] Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler[J]. *Genome Res*, 2017,27(5):824-834. DOI: 10.1101/gr.213959.116.
- [21] Li D, Liu CM, Luo R, et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph [J]. *Bioinformatics*, 2015,31(10):1674-1676. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv033.
- [22] Lin SH, Liao YC. CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes[J]. *PLoS One*, 2013,8(3):e60843. DOI: 10.1371/journal.pone.0060843.
- [23] Marçais G, Delcher AL, Phillippy AM, et al. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system[J]. *PLoS Comput Biol*, 2018,14(1):e1005944. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005944.
- [24] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nat Commun*, 2018,9(1):5114. DOI: 10.1038/s41467-018-07641-9.
- [25] Bharucha T, Oeser C, Balloux F, et al. STROBE-metagenomics: a STROBE extension statement to guide the reporting of metagenomics studies[J]. *Lancet Infect Dis*, 2020,20(10):e251-251e260. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30199-7.
- [26] 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.
- [27] Afshinnekoo E, Meydan C, Chowdhury S, et al. Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics[J]. *Cell Syst*, 2015,1(1):97-97.e3. DOI: 10.1016/j.cels.2015.07.006.
- [28] Davis JJ, Wattam AR, Aziz RK, et al. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020,48(D1):D606-606D612. DOI: 10.1093/nar/gkz943.
- [29] Sichtig H, Minogue T, Yan Y, et al. FDA-ARGOS is a database with public quality-controlled reference genomes for diagnostic use and regulatory science[J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):3313. DOI: 10.1038/s41467-019-11306-6.
- [30] Zhang X, Tan Y, Ling Y, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19[J]. *Nature*, 2020,583(7816):437-440. DOI: 10.1038/s41586-020-2355-0.
- [31] Goodacre N, Aljanahi A, Nandakumar S, et al. A Reference Viral Database (RVDB) To Enhance Bioinformatics Analysis of High-Throughput Sequencing for Novel Virus Detection[J]. *mSphere*, 2018,3(2)DOI: 10.1128/mSphereDirect.00069-18.
- [32] Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016,44(14):6614-6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
- [33] Basenko EY, Pulman JA, Shanmugasundram A, et al. FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes[J]. *J Fungi (Basel)*, 2018,4(1)DOI: 10.3390/jof4010039.
- [34] Bolt BJ, Rodgers FH, Shafie M, et al. Using WormBase ParaSite: An Integrated Platform for Exploring Helminth Genomic Data[J]. *Methods Mol Biol*, 2018,1757:471-491. DOI: 10.1007/978-1-4939-7737-6_15.
- [35] Fritz A, Hofmann P, Majda S, et al. CAMISIM: simulating metagenomes and microbial communities[J]. *Microbiome*, 2019,7(1):17. DOI: 10.1186/s40168-019-0633-6.

- [36] Setubal JC, Almeida NF, Wattam AR. Comparative Genomics for Prokaryotes[J]. *Methods Mol Biol*, 2018,1704:55-78. DOI: 10.1007/978-1-4939-7463-4_3.
- [37] Ye SH, Siddle KJ, Park DJ, et al. Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification[J]. *Cell*, 2019,178(4):779-794. DOI: 10.1016/j.cell.2019.07.010.
- [38] Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19[J]. *Nat Med*, 2020,26(6):842-844. DOI: 10.1038/s41591-020-0901-9.
- [39] Ebinger A, Fischer S, Höper D. A theoretical and generalized approach for the assessment of the sample-specific limit of detection for clinical metagenomics[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021,19:732-742. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.12.040.
- [40] Klenner J, Kohl C, Dabrowski PW, et al. Comparing Viral Metagenomic Extraction Methods[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2017,24:59-70. DOI: 10.21775/cimb.024.059.
- [41] Lim MY, Song EJ, Kim SH, et al. Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2018,41(2):151-157. DOI: 10.1016/j.syapm.2017.11.008.
- [42] Paul T, Basu S, Sarkar K. SPION-mediated soil DNA extraction and comparative analysis with conventional and commercial kit-based protocol[J]. *3 Biotech*, 2014,4(6):669-677. DOI: 10.1007/s13205-014-0232-y.
- [43] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2021,44(2):107-120. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794.
- [44] Bal A, Pichon M, Picard C, et al. Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow[J]. *BMC Infect Dis*, 2018,18(1):537. DOI: 10.1186/s12879-018-3446-5.
- [45] Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation[J]. *Caspian J Intern Med*, 2013,4(2):627-635.
- [46] Colquhoun D. An investigation of the false discovery rate and the misinterpretation of p-values[J]. *R Soc Open Sci*, 2014,1(3):140216. DOI: 10.1098/rsos.140216.
- [47] López-Labrador FX, Brown JR, Fischer N, et al. Recommendations for the introduction of metagenomic high-throughput sequencing in clinical virology, part I: Wet lab procedure[J]. *J Clin Virol*, 2021,134:104691. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104691.
- [48] Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018,18(7):605-615. DOI: 10.1080/14737159.2018.1487292.