**基于下一代测序的
传染病诊断器械：
微生物鉴定和抗菌剂耐药性
及毒力标志物检测**

**行业及食品药品监督管理局
工作人员指南草案**

***指南草案***

**本指导性文件公布的目的仅用于征询意见、建议用途。**

**文件发布日期：2016年5月13日**

您应在《联邦公报》发表通知宣称指南草案生效后90天内，提交关于本草案文件的评论和建议。电子意见提交至[http: //www.regulations.gov](http://www.regulations.gov/)。书面评论请提交至美国食品药品监督管理局案卷管理科（5630 Fishers Lane，ROOM1061（HFA-305），Rockville，MD，20852）。所有评论应注明案卷编号，该编号在联邦公报上公布的可用性通知中列出。

关于本文件的问题，请联系Heike Sichtig Ph.D.，微生物学器械分部，电话301-796-4574或电子邮箱：Heike.Sichtig@fda.hhs.gov。

##### 美国卫生和人类服务署

**食品药品监督管理局**

**器械和放射卫生中心**

**体外诊断和放射卫生办公室**

**微生物学器械分部**

**其他副本**

**前言**

其他副本可从因特网上获取。您还可以向CDRH-Guidance@fda.hhs.gov发送电子邮件请求以接收本指南的副本。请使用文件编号1500016来注明您所要求获得的指南。

目录

[I. 前言 1](#_Toc500404959)

[II. 背景 2](#_Toc500404960)

[A. 传染病NGS Dx器械的系统方法 3](#_Toc500404961)

[B. FDA-ARGOS：FDA的监管级别微生物序列数据库 4](#_Toc500404962)

[III. 范围 4](#_Toc500404963)

[IV. 获益-风险分析 7](#_Toc500404964)

[V. 器械描述 8](#_Toc500404965)

[A. 预期用途 8](#_Toc500404966)

[B. 测试方法学 9](#_Toc500404967)

[C. 辅助试剂 10](#_Toc500404968)

[D. 对照 11](#_Toc500404969)

[（1） 阴性对照 12](#_Toc500404970)

[（2） 阳性对照 13](#_Toc500404971)

[（3） 内部对照 14](#_Toc500404972)

[E. 测试结果和报告的解释 14](#_Toc500404973)

[VI. 器械确认 15](#_Toc500404974)

[A. 分析前因素 16](#_Toc500404975)

[（1） 标本采集和处理 16](#_Toc500404976)

[（2） 用于测序的标本制备 17](#_Toc500404977)

[（3） 测序、化学和数据采集 18](#_Toc500404978)

[（4） 数据存储 18](#_Toc500404979)

[（5） 临床调用测定 19](#_Toc500404980)

[B. 传染病NGS Dx器械的性能指标 20](#_Toc500404981)

[（1） 传染病NGS Dx器械的数据集 20](#_Toc500404982)

[（2） 测序策略 20](#_Toc500404983)

[（3） 所选靶标和用于靶标识别的参考序列 20](#_Toc500404984)

[（4） 临床调用信息学流程 21](#_Toc500404985)

[（5） 减少依据 21](#_Toc500404986)

[（6） 质量控制 21](#_Toc500404987)

[（7） 测序和读数映射 22](#_Toc500404988)

[（8） 污染物分析 22](#_Toc500404989)

[（9） 结果回转时间（TAT）采样 22](#_Toc500404990)

[（10） 数据存储 23](#_Toc500404991)

[C. 分析性能 24](#_Toc500404992)

[（1） 检测限 25](#_Toc500404993)

[（2） 包容性 26](#_Toc500404994)

[（3） 干扰物质 27](#_Toc500404995)

[（4） 精确度（再现性和可重复性） 28](#_Toc500404996)

[（5） 遗留和交叉污染 28](#_Toc500404997)

[（6） 稳定性 28](#_Toc500404998)

[（7） 其他分析研究 29](#_Toc500404999)

[D. 仪器仪表和软件 29](#_Toc500405000)

[E. 临床评价 31](#_Toc500405001)

[（1） 阴性百分比一致性的评价 31](#_Toc500405002)

[（2） 阳性百分比一致性的评价 33](#_Toc500405003)

[（3） 数据展示 34](#_Toc500405004)

[（4） 研究标本和标本类型 35](#_Toc500405005)

[VII. 器械修改 35](#_Toc500405006)

[VIII. 附录：用于监管级别基因组序列条目的比较数据库质量标准 37](#_Toc500405007)

[A. 提取的基因组DNA （gDNA） 37](#_Toc500405008)

[B. BioSample元数据 38](#_Toc500405009)

[（1） 临床样本 38](#_Toc500405010)

[（2） 环境样本（用于临床临近物的评价和排除） 38](#_Toc500405011)

[（3） 临床公共卫生需求样本 39](#_Toc500405012)

[C. 测序数据 39](#_Toc500405013)

[D. 测序元数据 40](#_Toc500405014)

[E. 建议的表型元数据 40](#_Toc500405015)

**基于下一代测序的
传染病诊断器械：
微生物鉴定和抗菌剂耐药性
及毒力标志物检测**

**行业及食品药品监督管理局
工作人员指南草案**

|  |
| --- |
| ***本指南草案在定稿后将代表食品药品监督管理局（FDA或机构）目前关于该主题的思考。其不会为任何人创造或赋予任何权利，也不会对FDA或公众产生约束。如果替代方法满足适用的法律法规的要求，则可以使用该方法。如果您想讨论另一种方法，请联系标题页面上列出的FDA工作人员或负责本指南的办公室。*** |

1. **前言**

FDA发布本指南草案的目的是，为行业和机构工作人员提供研究建议，以基于用于抗菌剂耐药性和毒力标志物的微生物鉴定和检测的诊断性器械（以下简称“传染病NGS Dx器械”），确立传染病下一代测序的分析和临床性能特征。传染病NGS Dx器械用于辅助微生物感染的诊断和选择适当疗法。下一代测序（NGS）技术可用于检测人类标本中临床重要致病性微生物的存在情况。与人类测序诊断相反，传染病测序诊断通常需要有快速且可执行的结果，有时在数小时内，因为初始诊断的延迟或不正确会导致死亡。此外，标本类型的范围较广（如，尿液、血液、脑脊液、粪便、痰液等），且样本中可能存的传染病因子的多样性较大，不允许进行直接的预分析、生化或生物信息学处理。每种独特标本类型均需要一种不同的核酸提取程序、不同的文库制备方案，甚至生成最终临床结果的生物信息学算法也不同。由于样本量有限（例如，CSF），且必须迅速及时地为患者制定传染病的治疗决策，重复测试的机会预期有限。

本指南草案提供了关于FDA推荐提交的数据类型的相关信息，用以支持II类上市前提交。本文件不适用于预期用于筛选血液和血液成分的供体，以及人类细胞、组织和治疗可传染疾病的基于细胞及组织产品（HCT/P）的供体。纳入特定靶标（例如，乙肝病毒、丙肝病毒、HPV和HIV）可提高器械对III类器械的分类，FDA鼓励您联系机构获取其他指南。[[1]](#footnote-0)此外，FDA建议申办方在进行任何临床或分析确认研究前联系机构，以讨论由于本快速发展领域中的新进展，是否有其他建议可用。

FDA指导性文件，包括本指南在内，不具有法律强制责任。相反，指南表明了该机构目前关于该主题的思考，除非引用具体的法规或法律要求，否则只应视为建议。在本机构指南中使用词语“应”是指建议或推荐进行某一事项，并非强制要求。

1. **背景**

FDA的微生物测序研讨会于2014年4月1日举办（[http: //www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm386967.htm](http://www.fda.gov/MedicalDevices/NewsEvents/WorkshopsConferences/ucm386967.htm)），在此期间，由于这些器械对患者管理形成的挑战，科学和临床团体的领导者强调了传染病NGS Dx器械进行监管监督的获益。同样，由于对传染病NGS Dx器械的关注增加，美国微生物学会（ASM）于2015年4月13日举办了标题为“临床微生物下一代测序的应用”的专题讨论会，会议中该小组将对监督的需要作为最大的挑战。

利益相关方在这些会议上提出的意见中强调，传染病微生物、抗菌素耐药性和毒力标志物的检测和鉴定已从基于培养物的方法发展到使用核酸扩增和杂交技术的分子方法。高通量或下一代测序有能力取代此前使用单一途径完成的方法，在过去，此前的方法可能需要数次不同的测试。

传染病NGS Dx器械与传统诊断器械的不同之处在于其可以用于检测特定的微生物或标志物，并且可以在单次运行期间同时检测样本中存在的多种微生物。本功能需要利用来自系统科学的方法，并在以下章节中进行描述。因此，提交用于支持监管提交资料的数据和信息应根据所用的特定NGS技术进行调整。

### 传染病NGS Dx器械的系统方法

本指南草案旨在用于靶向或不可知性（宏基因组）测序，以鉴定存在或不存在传染病微生物，和／或测定存在或不存在杀菌剂耐药性及毒力标志物。出于本指南文件草案的目的，传染病NGS Dx器械的功能包括使用靶向（通过任何实验室或生物信息学方法，优先扩增靶向于特定微生物或标志物的特定区域）或不可知性（无靶标偏倚）方法来检测多种病原体和标志物的方法，其通过一个共同过程在单一样本中进行，例如：标本采集、用于测序的样本制备、测序／化学／数据采集、数据存储或临床可行数据报告。传染病NGS Dx器械为复杂系统，主要由于传染病因子、不同标本类型和整体测序数据流程的多样性导致。与FDA用于其他分子基础诊断器械的方法类似，FDA建议使用“单一系统”方法评价传染病NGS Dx器械-从样本采集到临床可操作数据的输出（参见图1）。此外，FDA提出使用来自系统科学原则[[2]](#footnote-1)的方法评价这些器械。本方法将进行并行评价，从标本采集至结果报告，该评价将系统作为一个整体（包括生成临床可操作的数据），且测序数据流程中的每一个单独步骤均作为该系统的一部分。



6a）数据库

6b）基因组组装、基因组注释，基因组完成

报告

数据存储／

数据分析

用于测序的标本制备

测序／

化学／

数据采集

标本

采集

**FDA法规监督**

**图1：传染病NGS Dx的测序过程**

图1中的固体绿盒描绘了根据FDA法规监督的区域。重要的是应注意到，图1中右侧显示的第6a部分（数据库）以及第6b部分的某些方面（基因组组装、基因组注释、基因组完成），如果用作数据分析流程的一部分用于生成最终诊断报告，则可能受法规监督。在这种情况下，数据库是由计算机软件应用程序管理的有组织的数据采集，这些应用程序与用户、其他应用程序以及数据库本身进行交互以捕获和分析数据。下文为FDA预期在传染病NGS Dx器械的提交中所看到信息的相关建议。任何使用专有数据库的器械均请参见第VI（D）节，仪器和软件，以及第VIII章，附录。

### FDA-ARGOS：FDA的监管级别微生物序列数据库

FDA与各联邦机构合作，已开发出标题为“FDA-ARGOS：FDA的监管级别微生物序列数据库；BioProject 231221”的数据库。为了促进整合了传染病NGS Dx技术的器械形成最建议的监管方法，FDA建议使用替代比较方法进行临床评价，该方法在很大程度上依赖于配备监管级别靶序列的公共数据库。本数据库提供一组经确认的监管级别微生物基因组序列条目，其可在国家生物技术信息中心（NCBI）网站获取（[http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221) （使用FDA网站门户链接更新）。监管级别微生物序列是符合元数据要求的近似的完整高质量基因组草案。更多信息请参见第VIII章，附录。

1. **范围**

FDA预期将传染病NGS Dx器械作为系统进行监管，包括生成结果所必须的所有部件。系统的部件通常包括：标本采集器械、仪器、试剂、软件（如适用），用于生成测序文库，或以其他方式制备标本，以用于测序、可生成原始序列读数的测序仪器及相关试剂和数据采集元素以及数据分析流程（即组装、注释、变体调用，如适用）。作为现有培养物或复合方法的替代比较方法，通过FDA-ARGOS数据库可以实现对病原体和抗菌剂耐药性及毒力标志物的临床有效鉴定。更多信息请参见第VIII章，附录。

本指南草案的范围包括应用靶向或不可知性测序方法的传染病NGS Dx器械。这些方法如下：

* *靶向传染病NGS测序：*靶向测序需要对靶序列的先验知识；因此，其范围限制于特定靶标。出于本文档的目的，靶向测序指靶向于特定微生物或标志物的已定义区域的偏性扩增，这些微生物或标志物选择用于根据诊断器械的预期用途，通过任何实验室或生物信息学方法进行先验分析（例如，扩增产物测序或k-mer特征数据库）。靶向测序诊断的设计可使用数据库衍生算法，其需要包含可靠基因组靶序列的稳健监管级别序列数据库。
* *不可知性传染病NGS测序：*不可知性传染病测序不适用对序列靶标的先验知识，且通常可鉴定临床宏基因组样本中的所有成分（例如，关注的感染因子或标志物；新型、新出现的物质或标志物；微生物区系；人类背景；以及污染物）（从多微生物样本中进行直接遗传学分析）。不可知性测序方法在很大程度上依赖于生物信息学方法和专业知识，需要这些方法和知识以进行正确的计算机分析，从而在wet实验室生成序列数据后鉴定序列靶标。将根据选定的预期用途和基于小组的方法（基于特定的预期用途或公共卫生需求将感染因子组合在一起，例如，线状病毒小组），评价使用不可知性测序技术的NGS Dx器械的认证或批准。不可知性临床宏基因组样本（无靶标偏倚）中的基因组序列靶标的确认将需要监管级别的参考靶序列和邻近物进行诊断调用。关于序列靶标检测的性能指标-分析性和临床性-需要在监管报告提交中确立，例如，声明仅在特定置信度临界值时进行属级别调用的依据，以及证明诊断调用可对医师及其患者带来获益。

应指定一种算法将诊断调用与现有的监管级靶序列相关联。应该提供锁定的生物信息学流程的文档记录，包括从处理“原始”测序数据到产生诊断输出的所有必需步骤，并应证明临床微生物学使用的稳健性。本指南草案不讨论发现新出现的或新型病原体，或其他研究应用。

病原体或标志物的发现不是原始监管提交的一部分。如果识别新出现或新型感染因子或检测新出现或新型耐药性和毒力标志物需要寻求传染病NGS Dx器械的声明，则应在发现其出现时和诊断使用前，向机构报告这些新的序列靶标。如果对医生及其患者有获益，则可以寻求初始属识别的声明，但应该伴随有充分的性能数据和适当的获益-风险分析。对这些新出现或新型序列靶标的临床意义的理解往往有限，因为没有具体的先验知识可用。然而，利益相关者宣称，关于新型或新出现序列靶标的信息可能对医生及其患者进行临床决策指定中有一定的价值。在这些情况下，可能没有足够的证据显示明确的临床意义，相反，证据有助于确立很可能的关联。为了使信息可用于这些新型或新出现的序列靶标，申办方应提交一份将其纳入器械提交中的理论依据，详述如下：1）传达关于新型或新出现序列靶标相关信息的价值，2）关于如何报告具有相关局限性的新型或新发现靶标的描述（例如，在发现后，对新出现／新型感染因子或标志物进行属调用及后续确认），以及3）如何有效地传达关于新型和新出现序列靶标的信息（即，最大获益的医学决策指定，且对患者的风险极小）。发现和确认后，这些新型或新出现的靶标为先验一致，且监管级别的靶序列应有资格用于临床诊断用途。我们鼓励开发者联系机构，讨论在其现有的已认证或已批准器械中添加新出现或新型的靶标。

FDA注意到，传染病NGS Dx器械具有在单独人类临床标本中检测多种感染因子和／或耐药性和毒力标志物的潜能。为了促进整合传染病NGS Dx技术的器械形成最建议的监管方法，FDA建议使用替代比较方法进行临床评价，该方法在很大程度上依赖于配备监管级别靶序列的公共数据库。对于这种应用，FDA已经开发FDA-ARGOS（FDA监管级别微生物序列数据库，BioProject 231221），其含有一组经确认的监管级别基因组序列条目。第VIII章附录总结了FDA的公共监管级别微生物参考数据库的框架。FDA提出使用监管级别基因组序列作为临床评价的一种替代比较物。我们注意到，器械性能应在使用本替代比较物之前进行确立。为了使用替代比较方法，在临床评价前，应当提供预期用途或小组（例如，线状病毒小组）中声明的微生物以及耐药性和毒力标志物，作为监管级别参考。

本指南草案不打算用于讨论利用任何其他类型器械技术的器械。

本指南草案建议申办方应进行研究，以确立传染病NGS Dx器械的分析和临床性能特征，该器械与患者临床表现和其他实验室测试联合使用，用于鉴定微生物和检测抗菌剂耐药性及毒力标志物，以用于辅助致病微生物感染的诊断。对于本指南草案中讨论的试验，阳性结果不能排除与其他病原体有潜在和合并感染。同样，阴性结果不得用作诊断、治疗或患者管理决策的唯一依据。

下文为FDA预期在传染病NGS Dx器械的提交中所看到信息的概述。提交的每个部分的详细信息在以下章节中进行更详细的讨论。以下为此类信息的概述：

* 器械描述
* 器械确认
	+ 分析性能
	+ 仪器和软件
	+ 临床评价

FDA鼓励申办方使用预提交方案[[3]](#footnote-2)，以讨论其特定器械的上市前提交策略。

1. **获益-风险分析**

与传染病NGS Dx器械相关的健康风险来源包括错误鉴定致病微生物或标志物的风险，其可能导致个人和公共健康后果。在临床前提交中，此类对健康的风险需要具体考虑。如前所述，传染病测序诊断对立即且可执行的结果有绝对需求，有时在数小时内，因为初始诊断不正确可能导致死亡。

传染病NGS Dx器械可与患者临床表现及其他实验室测试联合使用，以辅助进行感染的诊断。然而，对患者管理决策的潜在风险与传染病NGS Dx器械的持续使用有关。这些风险中的一些可能包括器械未能按指示执行，导致结果不准确或缺乏结果，并最终导致用户对结果的解释不正确。这些潜在风险可导致对患者管理决策的恶劣后果。

特别是，致病微生物的假阳性鉴定可能导致诊断不正确，伴随抗生素治疗不恰当或延迟以及患者隔离预防措施错误。因此，这可能潜在性地导致更多严重感染。另外，在公共卫生紧急情况下的假阳性结果可能导致用于监测和预防的资源分配不当。同样，假阴性结果或缺乏结果可能导致无法提供诊断和正确治疗，或导致预防感染传播的患者管理不正确。

根据传染病NGS Dx器械的预期用途或技术特点可能会产生其他风险。每种诊断器械的认证或批准的上市前申请均应讨论情况的可能性和后果：

* 微生物靶标的鉴定不正确或遗漏。
* 抗菌剂耐药性标志物的检测不正确。
* 毒力标志物的检测不正确。
* 不能区分定殖和感染。
* 污染物（根据预期用途定义）的鉴定遗漏。

标题为“当进行医疗器械上市前批准和重新分类中的获益-风险测定时需考虑的因素”的指南文件（[http: //www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments／](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm267829.htm)u [cm267829.htm）提供了关于FDA获益-风险测定的信息。上市期间](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm267829.htm)提交中应包含对所评估器械的相关潜在获益和风险、分析技术的优缺点以及证明器械有效性的可用临床信息的讨论。

1. **器械描述**

您应纳入以下描述性信息，以充分表征您的传染病NGS Dx器械。

### 预期用途

预期用途适用于有靶向和不可知性测序方法，并应注明：序列靶标或序列靶标组（感染因子、抗菌剂耐药性和毒力标志物）、所检测靶标的性质（如RNA、DNA或二者）、测序技术、标本类型、临床综合征以及测试的预期特定人群。预期用途也应指明任何使用条件，并声明对序列靶标的鉴定和检测是假定的。

您的提交中，应明确纳入与您的产品预期用途相关的以下信息：

* 鉴定、系统发育关系（如适用），或您器械旨在用于鉴定或检测的序列靶标（病原体或遗传标志物）的其他已鉴定表征。
* 诊断算法中可能如何使用器械结果。
* 实验室鉴定和感染诊断时可能需要的其他措施。
* 根据当前临床和流行病学筛查标准，如果怀疑有新型或新发现的感染因子感染，应采取的其他措施。

### 测试方法学

您应详细说明您的器械所使用的方法学。您至少应说明适用于该器械的以下要素：

* 测序策略（即，靶向传染病NGS测序或不可知性传染病NGS测序）。
* 用于进行以下策略选择的信息和理论依据：（1）通过任何实验室或生物信息学方法（例如探针设计）先验得到的优先扩增靶向于特定微生物或标志物的特定区域，（2）不可知性方法（无靶标偏倚）中从“原始”序列数据到临床可执行数据的测序方案和生物信息学算法。
* 测序技术说明
* 标本采集和处理方法（例如，拭子、病毒培养基、阳性血液培养物、稳定化等）。
* 标本基质（例如，血液、痰液、粪便等）。
* 用于标本采集、稳定化和浓度的所有预分析方法和仪器。
* 检测到所声明序列靶标的特异性（即，除评价临床特异性以外使用的方法论，用于证明靶序列仅在关注的病原体或病毒和耐药性标志物中发现）。
* 传染病NGS Dx器械的限制因素（例如，饱和度水平、多路分解、指数数量等）。
* 提供或推荐使用的试剂组分及其在锁定系统内的功能（例如，缓冲液、酶、条形码、测序试剂、寡核苷酸、其他信号或扩增试剂等）。
* 试剂或器械材料导致特异性和非特异性干扰作用的可能性。
* 系统中其特定功能的内部控制和描述。
* 推荐或为用户提供的外部控制。
* 使用器械所需的仪器，包括系统内的组件及其功能。
* 从原始数据到报告结果的计算路径（例如，如何处理原始信号并转换成临床可执行的结果）。这可包括用于鉴定和处理数据集中可见问题的充分软件控制。还可包括对背景噪声的调整和标准化，如适用。
* 插图、照片和非标准设备或方法的详细描述（如有）。
* 设计输入和输出，以及风险分析和可追溯性矩阵。

如适用，您应该纳入解决或缓解与传染病NGS Dx器械相关风险的设计控制规范说明。例如，设计控制可能需要：

* 预防样本索引和条形码编码过程中样本的交叉感染。
* 用于可能影响质量的生产处理程序。
* 尽量减少样本污染或遗留导致的假阳性结果。
* 能够进行对靶微生物内突变导致的新出现变异的检测。
* 检测并纠正由于固有的遗传漂移或选择压力导致的器械性能的长期不稳定。

### 辅助试剂

辅助试剂为传染病NGS Dx器械的生产商在器械标签中指定为“需要但未提供”的试剂。需要这些试剂的目的是按照其使用说明的指示进行试验，并达到器械标签中所声明的性能特征。出于本文件的目的，“特定辅助试剂”为申办方指定的试剂。具体应包括目录、产品编号或器械实现其标签性能特征所必需的其他指定信息。例如，出于本文件的目的，如果器械标签规定使用品牌X或FDA已认证可用于此特定器械的其他扩增酶以供本特定器械进行此类使用，则品牌X DNA扩增酶是特定的辅助试剂。[[4]](#footnote-3)此外，任何其他DNA扩增酶的使用均可能改变标签汇总该器械的性能特征。例如，如果器械需要使用95%乙醇，并且任何类型的95%乙醇均可使器械达到标签中提供的性能特征，则辅助试剂是通用试剂。

如果器械的使用说明指定一种或多种特定辅助试剂，则您应详细描述如何确保器械和这些特定辅助试剂的测试结果符合使用说明。在这种情况下，结果应该与您的上市前提交申请中确立的性能相一致。您的计划可包括定性系统方法的应用、产品标签或其他措施。

FDA将评价该计划是否有助于缓解器械显示的风险，以提供器械安全性和有效性的合理保证，并确定其实质等同性。您的计划应含有以下要素的详细信息：

1. 讨论特定辅助试剂的风险评估。这应包括：

* + 试剂质量和变异性管理的相关风险。
	+ 特定辅助试剂的使用说明与您对该特定辅助试剂的使用说明之间不一致的相关风险。
	+ 您遇到的该器械相关风险。
	+ 可导致您的器械获取不正确结果的风险的任何其他问题。

2. 描述您预期如何使用您的风险评估，通过对辅助试剂进行任何必要控制，以缓解应使用您的风险评估予以解决的风险。这可能包括（如适用）：

* + 用于确保辅助试剂正确使用的用户标签。
	+ 评估用户在特定辅助试剂方面与标签说明的合规性的计划。
	+ 在涉及特定辅助试剂问题并将影响传染病NGS器械性能的事件中警告用户的计划。
	+ 用于特定辅助试剂的材料规范。
	+ 将使得您的器械有适当性能的试剂批次的鉴定。
	+ 稳定性测试。
	+ 投诉处理方案。
	+ 纠正或预防措施。
	+ 任何应处理的其他问题，以确保按照您的器械使用说明时，您的器械联合指定辅助试剂的使用安全有效。

此外，您应提交测试数据和您的监管提交，以确定您提供或建议的质量控制足以使用辅助试剂检测性能或稳定性问题。

针对鉴定、使用或控制特定辅助试剂的相关问题，请联系FDA获取建议。

### 对照

FDA建议您在分析和临床确认研究期间，每天进行适当的测试对照。这包括旨在用于该试验的的任何阳性和阴性对照，以及建议但未提供的用于该试验的适当外部对照。在临床实验室背景中，实验室负责遵循对进行适当对照的其所在国家和当地法规。

理想情况下，试验应包含器械识别到的每种靶标的外部对照。由于传染病NGS Dx器械检测到的靶标数量较大，可考虑使用轮换对照方案，依据是在整个评价过程中设计和使用一组代表性微生物或标志物（反映试验菜单中的每种已声明微生物）。外部对照也应监测每次试验运行的微生物提取，如适用。例如，只要稳定性研究证实了使用的时间框，一种微生物可使用多天，则随后下一种微生物再使用多天。对照应接近临床标本的组成和质量，以充分挑战该系统。

FDA建议您提供关于校准品和对照材料的以下信息（如适用）：

* 系统中包含或建议使用的不同对照的性质和功能。这些对照应可使用户确定所有步骤和关键反应是否正确进行，且无污染或非特异性干扰。
* 值分配（相对或绝对）的方案和验收标准，以及对照和校准材料的确认。
* 可用于检测仪器故障以符合所要求规范的对照参数。
* 用于串扰矩阵生成、分期和预分期的文库校准对照。

在分析和临床研究过程中每日进行外部阳性和阴性对照，以监测整个测试过程的持续性能。外部对照应旨在覆盖低多样性样本和不平衡基因组。对照应提供关于以下内容的信息：（1）标本质量，（2）核酸质量和（3）过程质量。FDA通常建议您纳入以下类型的对照：阴性对照、阳性对照和内部对照。

#### 阴性对照

##### 空白或无模板对照（NTC）

空白或无模板对照含有缓冲液或标本运输培养基，以及除核酸外的所有试验组分。本对照用于排除靶核酸的污染物，或扩增反应中的背景增加。阴性对照应以合理的频率（即，每次变化、每日、每周的次数）运行，按照实验室的定义，符合国家和当地对控制污染物的建议进行。FDA建议您使用任何多路复用传染病NGS Dx器械运行空白和NTC对照，以测定出血指数。NTC对照提供追踪背景实验室污染演化情况的机制。

##### 阴性标本对照

阴性标本对照含非靶核酸。其显示非特异性检测，表明在无靶序列的情况下无法获得信号（如适用）。可接受的阴性标本对照材料的示例可包括：

* 来自未感染个体的患者标本，已通过测试排除感染性NGS Dx器械检测的任何病原体。
* 含非靶标微生物的标本。
* 替代的阴性对照（例如，已包装的RNA）。

#### 阳性对照

##### 用于完整试验的阳性对照

阳性对照旨在模拟患者标本，含靶核酸，用于控制整个试验过程，包括核酸提取、扩增（如适用）和检测。阳性对照作为一项与患者标本同时发生的单独试验进行运行。对于临床和分析研究，FDA建议在评价期间，每天至少运行一次阳性和一次阴性外部对照。阳性对照可为更大试验菜单的一个子集，可在整个预定义计划中进行轮换。对于有内部对照的单次使用／测试消耗品，考虑到国家和当地建议，可能需要对每个新批次进行定期的外部对照测试。如果您发现不同的标本类型需要不同的标本处理过程，则每种处理方法应由每天使用对照显示。一些可接受外部阳性试验对照的示例包括：

* 减毒病毒或细菌疫苗株。
* 低致病性病毒或细菌。
* 灭活的病毒或细菌。请注意，由于核酸剪切，一些灭活策略（即辐射）提供的阳性对照极差。
* 含靶序列的已包装RNA/DNA（如适用）。

##### 用于扩增或检测的阳性对照

用于扩增或检测的阳性对照可包含纯化的靶核酸，浓度接近定性试验的检测限。其在获得阴性结果时，可控制器械和反应组分的完整性。

#### 内部对照

内部对照的适当性将取决于对照的性质以及如何使用。传染病NGS Dx器械的工作流程较复杂，涉及多个步骤，其中可能出现显著样本丢失、修改或污染。鉴定复杂工作流程中的样本丢失、修改或污染的所有来源，并鉴定可测定是否已出现这些情况的内部对照，这将非常重要。内部对照通常为非靶核酸序列，与靶核酸序列一同提取并一同扩增（如适用）。其可控制试剂的完整性、设备功能和标本中存在的抑制剂。这些内部对照的使用对传染病NGS Dx器械而言特别重要，其用于控制样本索引、条形码编码过程、文库制备和测序程序中样本交叉污染的可能性。可接受的内部对照材料示例包括已包装的非靶基因组，其在任何预分析步骤前以足够的浓度掺入到每个临床标本中，并与临床靶标同时分析。

FDA建议当设计器械的特定对照，包括选择和设计对照成分时，您应咨询机构。申办方应对所有对照使用试验的测序／数据分析流程。

### 测试结果和报告的解释

在上市前提交中，您应描述从生成原始测序数据到最终报告中阳性、阴性、不确定或无效微生物或标志物鉴定的计算流程。您应提供：

* 流程中所用软件包、数据库和版本的鉴定。
* 称一种微生物为阳性或标志物鉴定的计算方法和临界值。

如适用，也请提供以下信息：

* 如果结果的解释涉及再次测试，您应提供以下信息：（1）一份关于再次测试是否应从相同核酸制备、新提取物开始重复，或是否应获取并测试一份新患者标本的建议，（2）一种用于通过结合初始结果和再次测试后结果定义最终结果的算法。请注意，本算法应在评价试验临床性能的关键临床研究前开发。
* 如果试验存在无效结果，您应提供对如何定义无效结果的说明。如果内部对照是确定无效结果的一部分，则您应提供对用于定义无效结果的每种可能对照结果组合提供解释，并包括关于如何随访任何无效结果的建议（即，是否应将结果报告为无效或是否建议进行再次测试）。如果建议进行再次测试，您应提供类似于对不确定结果进行再次测试的信息（即，再次测试是否应从相同核酸制备、新提取物或新患者标本开始）。

对于不可知性测序，您应讨论是否报告邻近物和新出现或新型病原体的结果以及如何报告。新出现或新型病原体不是初始上市前提交中的一部分，但为病原体发现过程的一部分。然而，FDA注意到获取本信息的重要性，并建议联系机构讨论当前的政策。

1. **器械确认**

FDA建议您在进行任何临床或分析确认研究前联系机构，以讨论由于本快速发展领域的新进展，是否有其他建议可用。

在临床环境中评价用于优化和操作传染病Dx器械的预分析和分析方案的标准集合，这必不可少。这很重要，因为有很多变量会显著影响这些器械的性能特征。如此前所述，FDA建议将传染病NGS Dx器械概念化为一个“系统”，并使用系统科学中的方法评价这些器械。

您的性能声明通过您器械标签中反映的上市前测试进行确立，其应基于标签中描述的特定测试配置，包括所有预分析步骤予以确定。此外，如果您的产品标签指示使用多种提取方法，则提交用于支持提交上市前性能测试应使用说明中指定的所有提取方法。

分析性能的评价应包括对分析和临床研究持续时间的适当控制。这包括任何内部试验对照以及生产商推荐的适当外部对照，但不一定与试验一同提供。此外，该评价应显示分析和临床研究期间如何测试这些对照。

在提交中，您应详细描述用于评价以下所列每种性能特征的研究设计。

### 分析前因素

考虑分析前因素对传染病NGS Dx至关重要。在您的提交中，您应明确讨论关于分析前因素的以下问题。

#### 标本采集和处理

传染病NGS Dx器械的性能高度依赖于所分离核酸的质量和数量，因此标本类型、采集方法和存储对于获得成功结果起重要作用。出于本文件的目的，有3种传染病NGS Dx相关的主要标本类型：（1）临床分离物，其中微生物在确定的培养基上作为纯克隆培养物生长；（2）富集的复合培养物，例如血管培养物；和（3）直接人类临床标本，其中潜在的感染因子可能存在于复杂的环境中，有可能与共生生物体或宿主背景有关。

您应确认传染病NGS Dx器械预期使用的所有标本类型。适当的标本类型取决于多种因素，包括感染部位和待检测的感染因子或耐药性和毒力标志物核酸。特别是，临床标本应当在疾病临床进展的适当时间从适当解剖部位或来源进行采集。

适当的标本类型可根据临床综合征而变化。许多不同的标本类型有可能用于确认研究，我们建议您咨询FDA以确定哪些样本视为适用于器械平台的预期用途，以及某些样本类型是否可视为等同的并予以合并。

所提取核酸的质量和数量可能受多种因素影响，如标本来源、采集方法和处理（例如，运输、储存时间、温度）。所有标本稳定性参数的验收标准均应明确指示并说明理由，且应包括以下信息：

* 任何指定供该系统使用的核酸提取方法的确认。
* 样本采集方法可提供适当核酸以供传染病NGS Dx器械检测到所有序列目标的确认。
* 器械在所有标本处理条件下均保持可接受性能的确认。

应采用所有适用的国家和联邦生物安全指南采集和处理用于病原体鉴定和抗菌剂或病毒标志物检测的标本。有关标本处理的标准注意事项，请参阅最新版本的相关临床和实验室标准研究所（CLSI）文件。[[5]](#footnote-4)

应在通过基于传染病NGS的技术产生任何信号之前制备核酸。鉴于样本制备方法可能带来的显著差异及其对整体性能的影响，应为检测中使用的每种方法提供确认数据。我们注意到提取试剂盒应正确标记为体外诊断器械，包括符合联邦食品、药品和化妆品（FD&C法案）法案第502（a）、（c）、（f）节和第519（f）节，以及21 CFR第801和809部分的实施条例，并根据21 CFR第807部分的要求进行注册和列出。如果您有问题，可与FDA讨论这些问题。

#### 用于测序的标本制备

在标本采集或克隆分离之后，核酸提取和纯化代表该过程中的后续步骤。有一系列方法可用于制备纯化的核酸，且有几种上市的试剂盒以及自动化系统。所提取核酸的完整性和纯度对于传染病NGS Dx器械的成功鉴定和检测而言尤为重要。然而，我们注意到，对于宏基因组学样本类型，可能不能确定所提取核酸的完整性和纯度。类似地，抑制剂和干扰物质的存在会影响传染病NGS Dx器械的性能。然而，成功的测序结果取决于足够数量和质量的样本材料用于特定类型测序的可用性。您应该提交对您的材料质量控制的最低要求和临界值，包括但不限于以下因素：

* 样本量（µg）
* 样本体积（µl）
* 样本中的核酸浓度（ng/µl）（通常用于处理非特异性丢失）
* 定量方法
* 260/280比值
* 260/230比值
* 琼脂糖凝胶
* 核酸的总ng数

该过程中的下一个主要步骤涉及用于测序和文库制备的核酸制备。这一步也可以使用一系列不同方法进行。虽然所采用的确切方法通常是平台特定的，但其倾向于共享许多相似的特征。对于每个传染病NGS Dx器械平台，在这一步骤中使用的方法均应详细记录，并纳入最终的“锁定”制造配置中。

对于使用文库制备方法的器械，申办方应针对所有已声明的制备方法和试剂讨论试验性能的可变性。不同的文库制备方法可能产生不同数量和质量的核酸，因此制备方法对于获得成功结果至关重要。应该考虑涉及标本文库构建和标准化的步骤，这可能影响所产生序列的再现性和可靠性（例如，样本富集、测序策略、引物、扩增效率、试剂批次、杂交等）。此外，在确认文库制备过程中也应该考虑对临床标本的潜在抑制剂或用于提取核酸的方法进行分析。

#### 测序、化学和数据采集

传染病NGS Dx器械的平台采用多种测序机制，包括但不限于：基于DNA聚合酶依赖性方法（如循环可逆终止（CRT）、单核苷酸添加和实时测序）的合成测序；通过使用DNA连接酶的连接（SBL）进行测序；以及没有预先扩增的单分子测序。

大多数传染病NGS Dx器械平台使用基于光学的成像进行检测，测量已标记核苷酸按顺序整合到模板中时生成的生物发光或荧光信号。此外，还有使用非光学方法进行检测的平台，例如离子敏感场效应晶体管半导体芯片。

所有这些技术的共同特征是，其并行地产生包含测序反应的多个DNA/RNA片段的序列。应将最低数量的质量指标应用于传染病NGS Dx器械，以评价仪器运行的性能和所生成数据的质量。关于待提交指标的具体建议，请参见B小节-传染病NGS Dx器械性能指标。

#### 数据存储

构成反应信号输出的多个DNA/RNA片段的序列应以允许进行后续生物信息学分析的适当格式存储。

有许多数据格式适用于传染病NGS；然而，最常见的是基于文本的格式FASTA（存储用于检索国家生物技术信息中心BLAST数据库的生物序列格式）和FASTQ（存储生物序列及其相应的质量评分）。在审查过程中为评价您的传染病NGS Dx器械而生成的所有数据均应安全地存储，并使用对数据集的明确命名管理进行保存。FDA可能要求提供此类数据以用于独立验证目的。

#### 临床调用测定

生产商提供的用于测序平台的信息学软件包或数据分析流程是获取临床可操作数据过程的最后一步。重要的是应注意到，在器械确认前，数据分析流程应该处于“锁定”配置状态。

数据分析流程的宽度范围为从检测指示存在特定核苷酸的信号到基于序列目标的最终调用。这种分析很大程度上依赖于作为分析流程固有部分的信息学部件，并需要支持验证数据。这可包括来自以下数据分析流程特定区域的信息：

* 信号至碱基调用的转换。
* 通过传统的序列比对方法或通过k-聚体（长度为k的短子序列）的统计分析进行比对。
* 临床调用测定（算法和特定临床监管级别测量，用于测定在预期用途或小组中声明的序列靶标的鉴定或检测）。
* 数据库（如适用）（例如，在第VIII章附录中讨论的FDA-ARGOS-FDA监管级别微生物序列数据库（BioProject 231221）等数据库）。

对于信号调用转换部件，应提供平台流程，包括碱基调用器和版本，以及质量评分依据。

为了比对和映射到监管级别参考靶序列（单个或多个），应提供概述从原始序列数据（即读取）至可操作最终靶序列的“锁定”流程步骤的方案。该方案应列出具体的比对和映射工具、版本和参数设置，以及具有足够源信息的参考序列。任何新出现和新型序列靶标在纳入器械预期用途或小组中前，均应认定为临床可操作的序列和作为监管级别靶序列。请注意，首次对新型微生物基因组进行测序（从头测序）是病原体发现的一部分，因此不在本指南文件草案的范围内。

应提交所用算法和版本的详细信息，以用于确认研究的临床调用测定，包括基因组覆盖要求、裁剪逻辑和其他潜在因素。关于如何进行临床调用和确认，有不同的注意事项。这些测定取决于测序格式，范围为从靶向富集方法至不可知性测试方法。所有试验特定软件优化均应进行讨论，并适当确认。关于这些问题我们建议提前与机构进行讨论。

### 传染病NGS Dx器械的性能指标

FDA建议在您的上市前提交中纳入以下项目。

#### 传染病NGS Dx器械的数据集

用于确认的所有分析和临床数据集的详细说明，包括用于样本采集的研究方案均应提供（如适用）。同样，应纳入临床测定中直接使用的所有已处理数据。

#### 测序策略

应提供样本处理、NGS文库构建、文库定量／确认以及是否应用靶向或不可知性传染病NGS方法的详细说明。

#### 所选靶标和用于靶标鉴定的参考序列

应提供关于每个所选靶标以及使用的可公开获得或专有参考靶序列的靶标的详细说明。对于临床测定中使用的每个可公开获取或专有参考序列，请提供以下指标：

* NCBI登记ID
* 基因组的预期大小和特征
* 重叠群的数量
* 开放阅读框（ORF）的数量
* 所覆盖基因组的估计百分比

我们建议使用监管级别基因组参考序列进行靶标鉴定和传染病NGS Dx器械的开发。监管级别微生物序列是符合元数据要求的近似的完整高质量基因组草案（参见第VIII章，附录）。微生物质量指标是微生物特异性的，一些团体指南概括了对“高质量”状态的建议。[[6]](#footnote-5)[,](#_bookmark34)[[7]](#footnote-6)监管级别的基因组序列应对试验的适应症提供足够的覆盖范围。监管级别微生物参考基因组序列在Phred样质量评分[[8]](#footnote-7) ≥ Q30时需要覆盖至少20倍的95%以上的核心基因组或提供足够的理由，说明可接受较低的覆盖水平的理由。FDA已开发标题为“FDA-ARGOS – FDA监管级别微生物序列数据库（BioProject 231221）”的数据库，其提供一组已确认的监管级别基因组序列条目，可在NCBI的网站上获取[（http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221](file:///%5C%5C%5C%5Cshundajiayi%5C%5C%E7%BF%BB%E8%AF%91%E5%AE%A2%E6%88%B7%5C%5C%E7%BF%BB%E8%AF%91%E5%AE%A2%E6%88%B7%5C%5C%E4%BA%A4%E6%B5%81%E4%B8%AD%E5%BF%83%5C%5C2017%5C%5C10%E6%9C%88%5C%5C1017%E7%9F%B3%E6%85%A7%5C%5C%E9%9C%80%E8%A6%81%E7%BF%BB%E8%AF%91%E7%9A%84FDA%E6%8C%87%E5%AF%BC%E5%8E%9F%E5%88%99%EF%BC%88%E5%85%AD%EF%BC%89%5C%5C%E9%9C%80%E8%A6%81%E7%BF%BB%E8%AF%91%E7%9A%84FDA%E6%8C%87%E5%AF%BC%E5%8E%9F%E5%88%99%EF%BC%88%E5%85%AD%EF%BC%89%5C%5C%EF%BC%88http%3A%5C%5Cwww.ncbi.nlm.nih.gov%5C%5Cbioproject%5C%5C231221)（使用FDA网站门户链接更新））。如果没有参考序列可用于开发您的靶标，您应联系FDA讨论后续步骤。参考序列的适当性取决于试验设计且取决于微生物，应由FDA的输入进行确定。

#### 临床调用信息学流程

应提交“锁定”信息学流程的描述，详细说明从信号生成到临床调用测定（例如，阳性、阴性、不确定）时所使用的方案、参数和参考数据库。这应包括映射算法设置（例如，读取匹配调控级别基因组参考序列的百分比）和每个病原体／标志物靶标的鉴定百分比设置。我们建议提供显示信息流的图表／图片。

#### 减少依据

如适用，应以叙述形式提供关于以下内容的详细信息：如何将关注的感染因子或耐药性和病毒标志物的遗传物质与宿主及其他微生物的基因组进行物理或生物信息学（如适用）的准确分离。

#### 质量控制

试验性能的评价应包括对分析和临床研究持续时间的适当控制。结果还应纳入与您的试验一同提供的任何阳性和阴性对照，以及推荐的适当外部对照，但不一定与试验一同提供。如果在整个评估过程中使用轮换对照方案，则应显示每个对照小组成员的结果。

#### 测序和读数映射

应提供每个样本进行序列运行的总结信息和统计数据，其中应包括：

* 关于裁剪和过滤逻辑的说明（例如，最小Q评分、最小长度等）。
* 生成的读取总数。
* 生成的唯一读取总数。
* 读数长度范围。
* 映射的读数总数和识别百分比。
	+ 每个靶标映射的读数和鉴定百分比。
	+ 每个靶标阳性、阴性或不确定的临床调用指定。（注：覆盖范围要求取决于特定试验预期用途，且通常会根据关注的感染因子或耐药性和病毒标志物、标本类型以及读取质量和所生成读数而变化。通常，使用培养物分离测序法的传染病NGS Dx器械中，特定感染因子或标志物特征的范围至少为覆盖范围的30-200倍。目标覆盖率要求的适当性取决于试验设计，可以与FDA进行讨论。）

对于不可知性NGS测序，应提供其他指数以详细描述读取数和感染因子及标志物靶标的识别百分比，用以获得合格的监管级别基因组参考序列。如果应用了杂波抑制，则应在减去人类宿主读数后提供其他指标。关于非致病微生物、污染物和对照的详细信息和定义应纳入性能指标待定器械的预期用途中。

#### 污染物分析

应提供关于如何鉴定潜在污染物（例如，遗留、条形码多路分解导致的读数误识别）和缓解程序的详细说明。并概述缓解程序。

#### 结果回转时间（TAT）采样

应提供传染病NGS Dx器械的样本至结果回转时间。请纳入表明“锁定”传染病NGS Dx回转时间的数据，针对以下二者：（1）用于测序的临床样本实验室工作流程，以及（2）对传染病NGS数据从序列到可操作临床结果的后续计算分析。

#### 数据存储

应提供评价过程中使用的所有数据。本数据应保存在文件中，可应FDA的要求提供。

以下为其他参考信息和资源，用于帮助指导试验开发和提供关于传染病NGS Dx器械性能指数的深入信息，与FDA当前对监管这些器械的思考相一致：

* “FDA-ARGOS – FDA监管级别微生物序列数据库（BioProject 231221）”（[http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221（](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221)使用FDA网站门户链接更新）），其提供一组已确认的监管级别基因组序列条目。
* CLSI分子方法标准MM09-A2[[9]](#footnote-8)
* Ladner等高通量测序时代用于测序病毒基因组的标准。[[10]](#footnote-9)
* Chain等新测序时代的基因组项目标准。[[11]](#footnote-10)

以下流程图描述了支持靶向和不可知性测序方法的研究。分析和临床研究的详细描述将在以下章节中进行讨论。



**PPA**

**NPA**

**临床研究**

**残留／交叉污染**

**检测限**

**稳定性**

FDA监管级别微生物序列数据库

**再现性／可重复性**

**干扰物质**

**包容性**

**分析研究**

**传染性疾病NGS Dx**

##### 图2：支持FDA许可或批准传染病NGS Dx的分析和临床研究概述

一般而言，对于靶向传染病NGS，可以应用类似于其他多路复用器械的确认概念。关于多路复用器械确认概念的更多信息请参见标题为“高度多路复用微生物／医学对策的基于核酸的体外诊断器械”的FDA指南（[http: //www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceD](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceD) ocuments/UCM327294.pdf）。对于不可知性传染病NGS，应在分析和临床研究中根据预期用途或所选小组，对代表性数量的靶标（与微生物或标志物一致的特定数量）进行确认。

### 分析性能

图2表明了您应为您的试验进行的分析性能研究，并包含在您的提交中，内容如下：

#### 检测限

检测限（LOD）提供对特定靶标试验分析敏感度的测量，定义为可进行可靠靶标测序的最低浓度，与在≥95%标本重复中一致检测的阴性标本不同。LoD的正确测定非常重要，因为微生物病原体出现在患者标本中的水平可能极低。根据序列格式，范围从靶向至不可知性测序方法，关于如何确立和确认LOD可能有不同的注意事项。如果使用靶向多路复用小组方法，则可应用于其他多路复用器械相似的确认概念。更多信息请参见标题为“高度多路复用微生物／医学对策的基于核酸的体外诊断器械”的FDA指南（[http: //www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceD](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceD) ocuments/UCM327294.pdf）。

简言之，可在已声明的标本矩阵中，使用不同已声明靶标的汇总物进行LOD测定。本汇总方法也适用于包容性和再现性研究。敏感度和特异性测定可使用前瞻性进行的有限临床研究予以确定。

相反，如果应用不可知性测序方法，可能无法对预期用途中包含的每个靶序列的LOD进行测定。LoD测定的适用性取决于传染病NGD Dx器械的设计和所用测序类型。

例如，不可知性传染病NGS Dx器械的一种方法是设计可行性研究以估算LoD范围。可设计模拟样本，以在受控条件下尽可能地模拟传染病NGS Dx器械的样本。模拟样本应包含有可接受临床水平的人类背景DNA，以基因组当量／mL显示。针对试验预期用途的一组代表性病原体和标志物靶标应当以临床水平掺入，使用基因组当量／mL表示。查询文献以确定用于关注的每种病原体和标志物靶标的适当临床水平。您可在开始这些研究前咨询FDA。应提供保证，即器械可检测出靶标的临床范围为从潜在的单一拷贝至已记录最高水平。我们建议使用“spike-ins”（掺入）进行内部质量控制（例如，美国国家标准与技术研究所（NIST）RNA掺入控制标准参考物质（SRM）2347）。LoD范围的估算可以通过检查第VI（B）小节-传染病NGS Dx器械性能指标中所述的测序和读数映射统计进行确定。

通过测试每个浓度的少量重复测定确立的初步LoD应进行确认，方法为测试最低20个最低浓度的独立重复，该浓度可在超过95％的时间中产生阳性结果。

只要研究设计合理，使用Probit分析也可以用于确立LoD。标题为“EP17-A2，临床实验室测量程序的检测能力评价；已批准指南，2012”的CLSI文件提供了关于Probit方法的其他信息。

#### 包容性

包容性或分析反应性的确认应根据器械的预期用途和测序策略进行。根据生产商的诊断要求声明，研究应旨在用于确认特异性检测预期用途中包含的病原体、耐药性和毒力标志物之间潜在遗传变异的能力。确立包容性的方法应使用经过所有预分析步骤的完整培养微生物。在某些情况下，可以使用罕见微生物、不可培养微生物或BLS3和BSL4微生物等的预提取和已确定核酸。本评价中使用的靶标应在器械LOD处或极接近器械LOD处进行测试。请注意，器械的LoD取决于器械中测试的靶标，每个评估靶标可能不同。评价可以使用旨在反映不同遗传因素（作为任何结论的基础）的试验小组。

包容性和反应性评价可使用微生物小组进行。这些小组应设计为包含不同的菌株、实验室分离株、血清型以及与样本类型相关的其他紧密相关亚种。重要的是应注意，用于包容性的小组设计应纳入一个不同且临床相关的标本集。为确保在本分析中使用最高质量的材料，应确认原始库存的标识和滴度（例如，基因组当量）。例如，如果您的试验检测和鉴定肠炎沙门氏菌，我们建议您证明本测试通过在特定的LoD、临近特定LoD处或临界值处进行测试，可检测到所有频繁报告的血清型。

当您无法获得足够微生物以呈现足够多样性时，我们建议您联系FDA以讨论您的研究。当菌株可用性有限时，可以通过对靶序列的计算机分析增强实验室测试。计算机分析应包括临床相关微生物的序列，并代表每个已声明靶标的时间、地理和系统发生多样性。在这些情况下，计算机模拟方法将用于指导传统分析中包含的病原体，且应在器械预期用途中注明对这些分离物的经验性测试。例如，一种通过计算机分析指导实验室测试的方法可使用读取映射识别作为基础。采用这种方法，将在对靶区域识别水平降低的组中选择代表性微生物，用于进一步实验室测试。我们建议您提供包含所选菌株的明确依据，用于评估包容性的指标，和对每种所评价病原体和标志物靶标的特定关注区域中读数映射的明确展示。这种基于小组的方法适用于基于扩增策略的靶向测序方法。

对于不可知性测序，我们建议使用旨在覆盖试验拟定预期用途的充分多样性的小组。小组设计中应考虑到系统发生树。如果试验的预期用途拟定用于确定彼此密切相关的靶标（即一个碱基变异），则包容性测试应纳入具有这些碱基变异的代表性小组成员。

#### 干扰物质

应考虑在临床标本中可能干扰信号产生和测序的干扰物质和邻近物进行评价。来自临床标本的干扰物质的潜在来源包括外源性物质（即，处方／非处方药、抗凝剂等）和内源性物质（即，蛋白、脂质、血红蛋白、胆红素等）。标题为“EP07-A2,临床化学中的干扰测试；已批准指南；2005”的CLSI文件提供关于如何设计干扰研究的其他信息。器械确认研究中抑制剂的选择应通过所指明的临床标本类型确定。此外，在确认过程中应考虑对可能由测序仪引入的潜在干扰物质进行彻底评价，并可包括来自此前治疗或洗脱周期的残留化学物质。

对于靶向测序，您应提交：

* 存在靶标时污染物的干扰。
* 存在靶标时其他微生物的干扰（已知在针对特定适应症（临床综合征）的试验所检测的多种标本中存在的微生物）。
* 人类背景的干扰，如适用。
* 不存在靶标时的交叉反应（邻近物）。
* 聚合酶链式反应（PCR）抑制剂的干扰。
* 扩增引物的竞争，如适用。

对于不可知性测序，您应提交：

* 人类背景的干扰。
* 存在靶标时污染物的干扰。
* 存在靶标时其他微生物的干扰（已知在针对特定适应症（临床综合征）的试验所检测的多种标本中存在的微生物）。
* 不存在靶标时的交叉反应（非致病微生物、邻近物）。
* PCR抑制剂的干扰。

请注意，靶向和不可知性测序应包括基于传染病Dx（例如，血液样本中的皮肤生物群）预期用途的污染物的详细说明。

#### 精确度（再现性和可重复性）

应对传染病NGS Dx器械的再现性进行评价，以评估相同材料重复测试时的变异性，并引入多个变量。例如，可以使用多个研究中心的仪器，由不同操作者在不同日期运行仪器，进行再现性的评价。评价还应确定多个试剂批次对器械性能变异性的影响以及其可能对最终结果的影响。标题为“EP12-A2，评价定性测试性能的用户方案；已批准指南；2008”的CLSI文件提供关于如何设计再现性研究的其他信息。微生物标准参考材料（SRM）正在由NIST进行开发，并将成为一种有价值的工具以供在评价中使用。

类似地，应当评价在固定条件下多次分析标准材料时的可重复性以评估试验精确度。本评价应在单一研究中心进行，评价尽量多的非试验相关变量，以确定器械对序列输出精度的影响（如有）。标题为“EP12-A2，评价定性测试性能的用户方案；已批准指南；2008”的CLSI文件提供关于如何设计可重复性研究的其他信息。与再现性评价类似，可重复性评价也可以采用NIST当前正在开发的SRM。

#### 残留和交叉污染

应考虑对残留污染物的影响进行评价。这应包括对整个器械的评价，包括样本制备和文库制备，其中已知阳性样本（高靶标浓度）和阴性样本交替进行。应计算和报告此前运行的残留率。本信息应包含在器械标签中，以警示最终用户。此外，根据残留率，可能需要在包装标签中纳入其他信息，例如警告、注意事项和清洗说明，以针对如何减少或消除这种影响对最终用户提供指导。

#### 稳定性

您应针对确定试剂和仪器的实时稳定性，以及应激测试条件和结果的说明（如适用），描述您的研究设计。对于每项研究，您均应说明您的验收标准和您如何对其进行选择。

#### 其他分析研究

我们注意到，根据器械预期用途、标本类型和研究设计，可能需要以下额外研究：

* 矩阵等效性研究。
* 新鲜和冷冻标本研究。
* 标本稳定性研究。
* 评价多靶标标本的混合感染研究。

### 仪器和软件

以下引用的条例与传染病NGS Dx器械有关且包含适用于这些器械的信息。这些条例为：

* 21 CFR 862.2265 –用于临床用途的高通量DNA序列分析仪。旨在用于从外周血样本中进行人类基因组测序的MiSeqDx平台器械的决策总结请参见提交编号K123989（[http: //www.accessdata.fda.gov/cdrh\_docs/reviews/K123989.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K123989.pdf)）。
* 21 CFR 862.2570 –临床多路复用测试系统的仪器。关于此类仪器的信息请参见标题为“II类特殊控制指南文件：临床多路复用测试系统的仪器”的FDA指南（[http: //www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocument s/ucm077819.htm）。](http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm077819.htm)

如果系统包括软件，则应提交关于从原始序列数据到最终临床调用的计算流程（例如，程序、版本等）的信息。此外，应提交按照关注程度详细说明的软件信息。更多信息请参见标题为“医疗器械中所含软件的上市前提交内容指南”的文件（[http: //www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/u](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/u) cm089543.htm）。关注程度应在危险缓解前确定。本类型的体外诊断器械通常被视为中等程度的关注，因为软件缺陷可能间接地影响患者，并可能由于不准确的信息而导致损伤。

对于任何使用专有数据来定义由其器械所生成信号结局的器械，FDA建议在提交中纳入用于确立监管级别参考数据库准确性的质量标准以及策划、维护和更新数据库的方法。数据库中每个所声明微生物的监管级别基因组靶序列均应使用至少5个良好表征的分离株进行构建。你应提供关于如何评价每个条目的正确物种指定的程序和验收标准。请提供关于微生物或标志物鉴定以及如何评估序列质量的详细信息。

在您的提交中，您应提供一张代表数据库组成的详细表格，以包含每个已声明微生物的分离株数量，关于如何表征数据库中每个分离物的总结数据（例如测序、生物化学、分析证书），以及所有使用的监管登记质量指标，这些指标在监管级别基因组条目的比较物数据库质量标准的第VIII章附录中概述，针对使用公共数据库资源“F-ARGOS-FDA监管级别微生物序列数据库（BioProject 231221）”的任何器械（[http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221（使用FDA网站门户链接更新](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221%EF%BC%88%E4%BD%BF%E7%94%A8FDA%E7%BD%91%E7%AB%99%E9%97%A8%E6%88%B7%E9%93%BE%E6%8E%A5%E6%9B%B4%E6%96%B0%EF%BC%89)））。

如果数据库包含微生物和标志物多于申办方正在寻求的微生物和标志物，您应注明您的匹配算法是否在监管级别基因组靶序列参考数据库中检索针对所有微生物和标志物的匹配，或仅针对所声明的数据库微生物进行检索。如果特定已声明微生物或标志物的监管级别基因组靶序列数量有限，则应在临床试验中测试更多的独特分离株以验证靶参考序列。此外，申办方应该评价关于如何确定分离株鉴定的匹配算法（例如，仅针对监管级别确认的微生物和标志物数据库，或针对整个监管级别进行匹配）。

如果数据库中包含了有生物威胁的微生物，请在开始研究前联系Heike Sichtig Ph.D.，微生物学器械分部，电话301-796-4574，或电子邮箱Heike.Sichtig@fda.hhs.gov。

以下为帮助您符合FDA规定的软件生命周期质量管理规范中开发和维护您器械的其他参考文件列表。这些参考文件如下：

* “软件确认的一般原则；行业及FDA工作人员最终指南”（[http: //www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocument](http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocument) s/ucm085281.htm）
* “医疗器械中的现有软件使用”（[http: //www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/Gui](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/Gui) danceDocuments/ucm073779.pdf）
* “医疗器械中所含软件的上市前提交内容指南”（[http: //www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocu](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocu) ments/ucm089543.htm）
* 21 CFR 820.30，子部分C –设计控制
* ISO 14971-1；医疗器械-风险管理-第1部分：风险分析的应用
* AAMI SW68:2001；医疗器械软件-软件生命周期过程

### 临床评价

传染病NGS Dx器械的临床敏感度（或阳性百分比一致性）和特异性（或阴性百分比一致性）的确定可以使用许多与其他微生物诊断器械相同的原理进行。评估应在多个地理和人口统计学多样化的研究中心进行，在预期用途环境下，使用注明用于申报器械的标本，并由经过适当水平培训的操作者进行。应该使用公认的临床规定（例如，IDSA、EORTC）适当地定义预期用途人群。请注意，仅一个研究中心可位于美国之外。然而，鉴于NGS技术在单个临床标本中可能检测到的潜在病原体和耐药性及毒力标志物的数量，应用更传统的监管策略可能会阻碍这些器械的批准或许可，因为需要对每个检测到的微生物进行广泛评价（基因组序列），或在器械特异性的情况下均未检测到这些微生物，需要使用昂贵的参考方法。

因此，为了推广最简易监管方法，我们提出替代确认过程，该过程将很大程度上依赖于公共数据库，这些数据库中包含符合特定监管质量标准的高质量基因组序列（见附录VIII）。来自申报器械的基因组序列输出，当与具有足够覆盖范围的高质量数据库比较时，应该提供足够的信息确定器械特异性。显然，可能没有对公共领域中每个微生物均有足够代表性，因此无法在当前对其整体使用本方法；然而，可能有一些途径能够采用本策略的某些方面，直到在公共领域有足够的覆盖范围，特别是如果使用基于小组的方法时。

除了监管级别参考序列外，传染病NGS Dx器械的实施在很大程度上依赖于稳健的LoD分析确认（在适当矩阵中）。此外，您应提供关于器械分析敏感度的信息，程度为所示疾病状态中的病原体负载的临床相关范围。

#### 阴性百分比一致性的评价

应使用前瞻性采集的标本和分析进行阴性百分比一致性的评价，至少有3个临床测试中心，其中2个应在美国。研究中的患者入组应基于体征和症状确定，并符合本研究的任何其他入选标准。通常，使用健康的献血者是不可接受的；然而，在某些情况下（例如人造标本），这些标本可能适用于这些研究，我们鼓励开发者联系FDA以讨论这些类型的标本适用时间。

通常，为了评估阴性百分比一致性，应采集1500个前瞻性样本并通过受试器械进行分析，以获取充分统计学效力，以供FDA做出实质等同性测定或确定器械安全性和有效性的合理保证。根据与传染病NGS Dx器械一起使用的微生物和样本类型的数量，可以使用监管级别基因组靶序列数据库作为比较，进行阴性百分比一致性评价。如可能，应使用来自预期使用人群的患者评价阴性百分比一致性（NPA）。

如果所测试微生物或标志物在数据库中不可用，不能用于其他可接受比较方法（CM）的评估，我们建议查阅标题为“高度多路复用微生物／医学对策的基于核酸的体外诊断器械-行业及食品药品监督管理局工作人员指南”的FDA指南（[http: //www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/u cm327293.htm](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/u%20cm327293.htm)），获取对适用于靶向测序方法的可接受CM的说明，并在进行研究前与FDA进行讨论。如果标本体积导致无法运行所有比较测试，则应采取明确定义的随机方法，以便对于每个检测到的微生物或标志物的每个CM至少分析100次。此外，应做出规定，以便可分析足够数量的标本中有生物威胁的微生物，以符合特异性性能标准。

通过使用100个扩增子检测20个不同微生物（每个微生物5个扩增子）的靶向微生物器械示例，其中每个CM需要相等测试体积并允许进行5次CM测试，可以用比较方法测试第一个标本（CM1、CM2、CM3、CM4、CM5），用CM测试第二个样本为（CM6、CM7、CM8、CM9、CM10），依此类推。测试4个标本后，每个CM将应用一次。在对前4个标本进行测试后，可以产生一个随机顺序的1至20的新整数阵列，并可以根据这个新阵列以比较方法测试后续4个标本。开发者应该通过点估计值和95%置信区间的下限确立临床特异性，以超过FDA反馈中认可的水平。对于有生物威胁的微生物[[12]](#footnote-11)，将证明临床特异性达到99.9%的点估计值，95%CI的下限大于99%。

还应注意，在来自前瞻性研究的标本中，对于申报靶向传染病NGS Dx器械检测到病原体阳性结果的每个标本，该标本也需要接受相应CM的测试。由传染病NGS Dx器械的阳性结果生成的CM结果相关信息不应直接用于敏感度和特异性的计算，因为其会在传染病NGS Dx器械性能的估计中引入偏倚。但是，本信息有助于理解靶向传染病NGS Dx器械的整体性能，尤其是在联合检测方面，应在单独的表格中展示。传染病NGS Dx器械特异性的比较性能应使用经FDA许可或批准的器械（如可用）进行确立。如适用，建议使用经确认的传染病NGS Dx器械。如果没有可用或适当的经FDA许可或批准的器械，可使用两种经良好确认的基于PCR的试验，随后进行双向测序。

#### 阳性百分比一致性的评价

阳性百分比一致性的分析将为每种已声明微生物或标志物纳入至少50个阳性标本。最初，应使用基于培养物或基于PCR的参考方法（最好经过FDA许可或批准），这些方法应至少包含用于试验预期用途的代表性靶标。监管级别确定性数据库可用于潜在地确定密切相关的靶标。对于不可知性测序方法，可以设计代表性微生物的小组（通过可接受的CM确认为阳性），并应使用确定性微生物参考数据库测试所有已声明微生物的选单。应纳入的每种病原体或标志物的阳性标本数将由阳性百分比一致性的点估计值和95%双侧置信区间的下限生成。这些值可根据器械预期用途而变化。您应与FDA讨论，以确定通过传染病NGS Dx器械指明的每种病原体或标志物的适当临床敏感性水平。

例如，具有包括菌血症微生物小组选单的传染病NGS Dx器械应包括每种已声明病原体或标志物的足够数量的已存档和回顾性标本，用以产生有至少90%阳性百分比一致性且双侧95%置信区间（CI）大于80%的结果。假设达到90.2%的点估计值；则需要包含至少61个阳性标本（55/61）以超过所示的95%CI下限（大于80%）。实际上，对于61个标本，其中55个生成的点估计值为90.2%，95% CI：80.2%至95.4%。然而，使用60个标本的示例，有54个标本的性能生成的点估计值为90.0%，则CI不符合最低性能标准，其95% CI为79.9%至95.3%。

所有阳性已存档或回顾性标本（在存放标本前通过参考方法确定）均将使用相应CM和申报器械进行分析。CM进行的确认是确保标本正确存档、保存期间没有发生标本降解以及正确鉴定标本的必要条件。任何未经CM确认为阳性的标本均不得纳入已声明微生物的初始性能评价中。然而，当使用确定性微生物参考数据库扩展已声明微生物小组时，可使用来自未经证实标本的申报器械测试结果。此外，由传染病NGS Dx器械对任何其他病原体的任何阳性测定也应由CM进行验证，因为这提供了关于NGS器械性能的其他信息，尤其是在可能合并感染情况下。可以考虑采用其他方法确认标本的阳性；然而，我们鼓励您在执行研究前与FDA进行讨论。回顾性阳性标本应该与器械预期用途中列出的标本类型相同，并应从适当的预期使用人群中采集。选择入选本研究的标本应代表特定病原体或标志物的临床相关浓度范围。如果阳性临床标本中提取的核酸已进行归档，则只要使用适当的预期使用人群，可考虑将其纳入分析中，使用指定的预分析步骤采集和处理指定的样本类型，并由相应的CM完成确认。

我们认为真实临床人类标本、存档的标本或其他标本，可能不容易获得有生物威胁的微生物。可使用通过在单独阴性临床标本中掺入培养的病原体而制备的模拟临床标本。对于本分析，50%的掺入标本应制备为处于LoD浓度，而剩余50%标本的浓度应跨越病原体浓度的临床范围。对于非生物威胁病原体，模拟标本应反映相关临床范围。开发者应通过同行审查文献参考或相关领域专家的反馈，提供对每种所示标本类型的预期临床范围的依据。鉴于处理很多有生物威胁的微生物时伴随的限制，应作出安排，以在有能力进行适当研究的合格机构确认临床性能。对于有生物威胁的微生物，由于阳性百分比一致性确认方面的逻辑问题，可在单独研究中心进行分析。或者，如果有生物威胁的微生物不涉及特定机构，则可使用多个测试中心方法以评价阳性百分比一致性，且已存档标本（阳性和阴性）应在3个测试中心随机且均匀地分布以供分析。

使用模拟标本进行任何研究前，您均应咨询FDA以获取反馈。您的方案应包含详细的测试计划和依据。

#### 数据展示

您应分别展示由传染病NGS Dx器械识别到的每种病原体或标志物的阳性百分比一致性（PPA）和NPA。每种一致性均应有95% CI。同样，您应展示：

* 通过参考方法获得合并感染标本的器械结果。注：因为标本体积过大，某些前瞻性标本的此信息可能不可用；
* 可通过传染病NGS Dx器械获得合并感染标本的CM结果；且
* CM测量的结果通过受试传染病NGS Dx器械中的阳性结果生成。

临床研究中的所有标本均应使用传染病NGS Dx器械，按照您器械的使用说明中所述进行确认。例如，如果有初始不确定或无效结果的标本根据传染病NGS Dx器械的使用说明进行再次测试，则从这些标本的指定测试程序中获得的最终结果应在您的统计分析中进行使用。对于您临床研究中的标本，您应提供以下信息：1）由于初始结果不确定而再次测试标本的百分比（如适用），和2）由于初始结果无效而再次测试标本的百分比（如适用）。此外，您应分别展示最终无效和最终不确定结果的百分比（如适用）。对于所有前瞻性采集的新鲜标本、前瞻性采集的存档标本和库存预选的标本，您应提供传染病NGS Dx器械的数值结果分布，分别显示每种病原体和所有病原体合并的结果分布。

#### 研究标本和标本类型

您应使用来自您预期用途中所声明所有标本类型和矩阵的临床标本，以表明从临床材料中可获得正确结果。对于您在临床研究中使用的标本，您应提供数据表明任何库存标本的存储和运输均不影响试验结果，且用于库存标本的方法不影响特定微生物的阳性。例如，如果已存档标本此前已冷冻，您应进行分析研究，以表明您的试验对新鲜和冷冻标本可提供等效结果。如果您有关于适当标本类型选择以及可汇总标本类型的问题，请联系FDA。

1. **器械修改**

为响应公共卫生需求或紧急情况，以下信息定义了在现有平台器械上整合新靶标的途径，并确保已许可或批准器械的性能特征随时间保持一致。传染病NGS Dx器械添加新的序列靶标可能导致对器械预期用途进行重大变更或修改，或产生新的预期用途，因此可能需要提交传统的监管提交（例如，一份新的上市前通知（510（k））或上市前批准申请（PMA）提交），并符合21 CFR 807子部分E以及确认数据以确立性能。由于已经进行了许多研究已确定此前已许可或批准器械的性能，且我们假设试验的性能没有变更，因此仅一部分评价可能需要重新提交。在您的提交中，您还应提供为您的器械添加新物种的详细操作。这些程序可包括：验收标准、风险分析和确认测试。我们注意到，可使用原始临床研究中产生的数据对新扩展数据库，将靶序列添加到您已许可或批准的微生物声明中。在您的提交中，应包含将如何发布数据库更新的说明。我们鼓励器械开发者联系机构获取帮助。

如果需要包含额外靶标以处理公共卫生需求或紧急情况，则用于证实性能的研究将主要集中在额外序列靶标。当增加一个新序列靶标或修改器械时，可能不需要某些类型的评价，包括稳定性研究和残留及交叉污染的评价。此外，再现性研究和临床评价的范围应集中在新的或修改的序列靶标和性能确认的代表性小组。

此外，文库和生物信息学流程的修改或更新应在使用和实施之前传达给FDA。

1. **附录：用于监管级别基因组序列条目的比较数据库质量标准**

传染病NGS Dx器械具有在单独人类临床标本中检测多种感染因子和耐药性和毒力标志物的潜能。为了促进整合传染病NGS Dx技术的器械形成最简单的监管方法，FDA建议使用可选替代比较方法进行临床评价，该方法在很大程度上依赖于配备监管级别靶序列的公共数据库。对于本应用，FDA与各联邦机构合作，已开发出标题为“FDA-ARGOS – FDA监管级别微生物序列数据库（BioProject 231221）”的数据库，其包含一组经确认的监管级别基因组序列条目（[http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221（](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/231221%EF%BC%88%E4%BD%BF%E7%94%A8FDA%E7%BD%91%E7%AB%99%E9%97%A8%E6%88%B7%E9%93%BE%E6%8E%A5%E6%9B%B4%E6%96%B0%EF%BC%89)使用FDA网站门户链接更新））。本附录总结了FDA的公共监管级别微生物参考数据库的框架。

FDA提出使用监管级别基因组序列作为临床评价的一种替代比较物。为了使用替代比较方法，在临床评价前，应当提供预期用途或小组（例如，线状病毒小组）中声明的微生物以及耐药性和毒力标志物，作为监管级别参考。我们通过添加新的条目或通过证明现有条目符合要求，以继续扩展数据库。如果您对代表性有特定要求，或用于开发这些监管级别基因组序列条目的资源有限，请联系机构。

以下章节重点介绍了FDA预期采集的信息领域，以便可以对公有领域或专有数据库中的基因组序列沉积进行评估并证明其符合监管目的。为了符合监管级别基因组序列条目，必须在测序前明确鉴定微生物或耐药性和毒力标志物。数据库的监管部分应包括传染病NGS Dx器械预期用途中声明的所有微生物的经确认监管级别基因组序列条目。如此前所声明，根据预期用途（例如，属、种或标志物水平ID）或小组（例如，线状病毒小组），仅监管级别已鉴定微生物因子和标志物可纳入最终报告中。

##### 监管级别基因组序列条目的质量指标：

### 提取的基因组DNA（gDNA）

提取的gDNA应有高质量和纯度，且有足够的浓度以达到适当产量，从而确保所采用的测序方法类型有足够深度和宽度的基因组覆盖范围。

### BioSample元数据

对样本来源材料（例如，临床、环境、公共卫生需求）的少量说明对可追溯性而言是必需的。我们使用下文概述的以下描述符。（注：在NCBI的最小病原体模板之后对最小元数据进行部分建模。）

#### 临床样本

临床样本 说明

1. 唯一ID 样本的唯一数据库ID
2. 微生物 微生物属和种
3. 鉴定方法 样本鉴定方法（生物化学、MicroScan、Vitek）
4. 分离来源 解剖学采样部位（例如，皮肤、创伤、导尿
管）/标本类型（例如，血液、粪便和尿液）
5. 宿主疾病 相关临床综合征（例如，脓毒症、脑膜炎、菌血症）
6. 采集日期 采样日期（年月）
7. 采集者 临床样本采集的原始地点或实验室
8. 地理位置 样本的地理来源
9. 年龄分类 年龄组（岁，FDA分类）
10. 性别 性别（男性、女性）（建议）
11. AST方法\* 抗菌剂敏感性测试方法（建议）
12. AST方法生产商\* AST方法的生产商（建议）
13. 抗菌剂敏感性\* 对于每种抗生素（例如，万古霉素、苯唑西林）（建议）

\*重要的是应注意到，每个条目均有相关的抗菌剂敏感性测试（AST）数据；然而，缺少AST数据不会用作排除标准。本信息的目的是，在特定微生物的表型特征与其基因组序列之间建立联系。此外，随着诊断技术开始脱离更传统的基于文化的格式，这种信息变得越来越重要。

#### 环境样本（用于临床临近物的评价和排除）

环境样本 说明

1. 唯一ID 样本的唯一数据库ID
2. 微生物 微生物属和种
3. 鉴定方法 样本鉴定方法（生物化学、MicroScan、Vitek）
4. 分离来源 采样部位（例如，动物传染病、空气滤器、河床）/标本类型（例如，蜱虫池、水、土壤）
5. 采集日期 采样日期（年月）
6. 采集者 环境样本采集的原始地点／研究所
7. 地理位置 样本的地理来源
8. 宿主／携带者 标本宿主（例如，蚊子、母牛）（建议）
9. AST方法\* 抗菌剂敏感性测试方法（建议）
10. AST方法生产商\* AST方法的生产商（建议）
11. 抗菌剂敏感性\* 对于每种抗生素（例如，万古霉素、苯唑西林）（建议）

\*重要的是应注意到，每个条目均有相关的抗菌剂敏感性测试（AST）数据；然而，缺少AST数据不会用作排除标准。本信息的目的是，在特定微生物的表型特征与其基因组序列之间建立联系。此外，随着诊断技术开始脱离更传统的基于文化的格式，这种信息变得越来越重要。

#### 临床公共卫生需求样本

临床公共卫生需求样本 说明

1. 唯一ID 样本的唯一数据库ID
2. 微生物 微生物属和种
3. 鉴定方法 样本鉴定方法（生物化学、MicroScan, Vitek）

也请纳入所有可用和适用的临床或环境描述符。我们注意到，由于获取这些数据的现有限制，条目仅在个例分析的基础上纳入；然而，纳入应根据公共卫生需求进行确认（例如，样本来自有临床相关性但描述性元数据极有限或没有的疾病暴发）。

### 测序数据

测序数据的最低要求是，生成的原始数据应存储在NCBI的序列读数档案（SRA）中，组件应存放在NCBI的组装分部。原始读数和组件的可用性将提供一个路径，用于在更新的技术出现时重新分析数据。此外，应存储注释数据（如有）。

测序数据 说明

1. SRA 在NCBI的序列读数档案（SRA）分部存储原始读数
2. 组装 在NCBI的组装分部存储组件
3. 注释\* 在NCBI的注释分部存储注释（建议）

\*基因组注释应存储在NCBI的注释分部（如有），并应根据请求使用NCBI元和基因组注释流程（PGAP）进行添加。

### 测序元数据

测序过程的少量说明对于可追溯性而言是必要的。我们使用了以下列出的7种描述符，包括用于组装和注释的生物信息学工具信息，以及基因组覆盖范围信息。

测序元数据 说明

1. 文库 文库生产商、策略、来源、选择和文库布局
2. 平台 平台生产商和仪器型号
3. 提交者 提交临床或对策分离株测序数据的人员或测序中心
名称
4. 覆盖倍数 基因组覆盖范围
5. 流程 用于生成数据的流程，测序器平台软件和版本
6. 组装程序 组装程序和版本
7. 注释工具 注释工具和版本（建议，如有）

### 建议的表型元数据

建议提供对表型信息的说明，以在特定微生物的表型特征与其基因组序列之间建立联系。我们推荐了5种描述符，概述如下（描述符1-4也纳入了本附录第VIII（B）和（C）节中）。

建议的表型 说明元数据

1. 注释 基因组注释数据
2. AST方法 抗菌剂剂敏感性测试方法
3. AST方法生产商 AST方法的生产商
4. 抗菌剂敏感性 对于每种抗生素（如，万古霉素、苯唑西林、四环素、妥布霉素）
5. 其他表型数据 关于形态学、革兰氏染色、毒力数据、代谢数据的信息



1. 某些靶标具有固有的高风险，包括以下未充分理解、不能权威性识别风险的方法，因此属于III类。测试多种靶标的器械采用最高类别靶标的分类。 [↑](#footnote-ref-0)
2. George J. Klir, Facets of Systems Science, Springer; 2nd edition （October 31, 2001); John N. Warfield, "A proposal for Systems Science", Systems Research and Behavioral Science, 20, 2003, pp. 507–520. [↑](#footnote-ref-1)
3. 预提交方案请参见标题为“医疗器械提交相关反馈请求：预提交计划和与食品药品监督管理局工作人员的会议”的指南文件，参见网站<http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm311176.p>df. [↑](#footnote-ref-2)
4. 即使您确定在测定中可能使用一种或多种替代辅助试剂，这些指定替代品中的每一种仍可能是辅助试剂。如果您不能确保指南的该方面是否适用于您的器械，我们建议您咨询机构。 [↑](#footnote-ref-3)
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 1999. Richmond, J.Y. and McKinney,

R.W. eds., HHS Publication Number （CDC) 93-8395; and CLSI. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. CLSI document M29-A. Wayne, PA:Clinical and Laboratory Standards Institute; 1997. [↑](#footnote-ref-4)
6. Ladner et al., “Standards for Sequencing Viral Genomes in the Era of High-Throughput Sequencing, mBio,” June 17, 2014:Vol. 5 no. 3. [↑](#footnote-ref-5)
7. Chain et al., “Genome Project Standards in a New Era of Sequencing, Science,” October 9, 2009:Vol.326 no. 5950 pp. 236-237. [↑](#footnote-ref-6)
8. Ewing B., Green P. （1998):“Base-calling of automated sequencer traces using phred.II.Error probabilities.Genome Res.,” 8 （3):186–194. [↑](#footnote-ref-7)
9. 诊断实验室医学中的核酸测序方法；已批准指南— 第2版（MM09-A2）。 [↑](#footnote-ref-8)
10. Ladner et al., Standards for Sequencing Viral Genomes in the Era of High-Throughput Sequencing, mBio 17 June 2014:Vol. 5 no. 3. [↑](#footnote-ref-9)
11. Chain et al., Genome Project Standards in a New Era of Sequencing, Science 9 October 2009:Vol.326 no. 5950 pp. 236-237. [↑](#footnote-ref-10)
12. 视为有生物威胁的病原体的阐明，请参见国家选择代理登记处（<http://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html>）。 [↑](#footnote-ref-11)