

# 纳米孔测序在病原微生物检测中的应用专家共识<sup>△</sup>

张述耀<sup>1\*</sup>, 侯铁英<sup>2#a</sup>, 黎小妍<sup>3#b</sup>, 钟诗龙<sup>4</sup>, 伍俊妍<sup>5</sup>, 黄彬<sup>6</sup>, 中国药理学治疗药物监测研究专业基层委员会, 广东省药学会临床治疗精准用药专家委员会,《纳米孔测序在病原微生物检测中的应用专家共识》编写组[1. 暨南大学附属广州红十字会医院临床精准治疗中心, 广州 510240; 2. 华中科技大学协和深圳医院(南山医院), 广东深圳 518101; 3. 中山大学附属第六医院药学部, 广州 510510; 4. 广东省人民医院药学部, 广州 519041; 5. 中山大学孙逸仙纪念医院药学部, 广州 510120; 6. 中山大学附属第一医院检验科, 广州 510080]

中图分类号 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(XXXX)XX-0001-10  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.XXXX.XX.01



**摘要** 为提高危重症感染性疾病的诊断及救治水平,规范纳米孔测序的临床应用,促进该技术的良性发展,中国药理学治疗药物监测研究专业基层委员会和广东省药学会临床治疗精准用药专家委员会联合发起并组织多学科专家,采用名义群体法、德尔菲法等,制订了《纳米孔测序在病原微生物检测中的应用专家共识》,对纳米孔测序(涵盖靶向测序、宏基因组测序和全基因组测序等方向)的样本采集与运输保存、检测过程、生物信息学分析、报告解读等全流程进行了规范,并对其中的关键问题给出了推荐意见。

**关键词** 三代测序; 纳米孔测序; 病原微生物; 危重症感染; 临床检验; 微生物学诊断

## Expert consensus on the application of nanopore sequencing technology in the detection of pathogenic microorganisms

ZHANG Shuyao<sup>1</sup>, HOU Tiejing<sup>2</sup>, LI Xiaoyan<sup>3</sup>, ZHONG Shilong<sup>4</sup>, WU Junyan<sup>5</sup>, HUANG Bin<sup>6</sup>, Division of Therapeutic Drug Monitoring of Chinese Pharmacological Society, Expert Committee of Precision Medicine for Clinical Treatment of Guangdong Pharmaceutical Association, the Writing Group of the *Expert Consensus on the Application of Nanopore Sequencing Technology in the Detection of Pathogenic Microorganisms*[1. Clinical Precision Treatment Center, the Affiliated Guangzhou Red Cross Hospital, Jinan University, Guangzhou 510240, China; 2. Huazhong University of Science and Technology Union Hospital (Nanshan Hospital), Guangdong Shenzhen 518101, China; 3. Dept. of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510510, China; 4. Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 519041, China; 5. Dept. of Pharmacy, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 6. Dept. of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China]

**ABSTRACT** To improve the diagnosis and treatment level of critically ill infectious diseases, standardize clinical application of

<sup>△</sup> **基金项目** 广东省科技创新战略专项(“大专项+任务清单”)项目(No.STKJ202209072);广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金面上项目(No.2024A1515010633);浙江省科技计划项目“尖兵”“领雁”研发攻关计划(No.2023C03068)国红十字会基金会医学赋能公益专项基金(No.HSZH202200909);毕节市“揭榜挂帅”重大专项(No.毕科合重大专项[2023]2-2)

\* **第一作者** 主任药师,博士生导师,博士。研究方向:药物基因组学。E-mail:shuyao0754@qq.com

#a **通信作者** 主任医师,博士生导师,博士。研究方向:微生物药理学。E-mail:houtiejing001@126.com

#b **通信作者** 主任药师,博士。研究方向:药理学。E-mail:lxzyzj@126.com

nanopore sequencing, and promote the sound development of the technology, Division of Therapeutic Drug Monitoring of Chinese Pharmacological Society and Expert Committee of Precision Medicine for Clinical Treatment of Guangdong Pharmaceutical Association initiated and organized multidisciplinary experts to formulate *Expert Consensus on the Application of Nanopore Sequencing Technology in the Detection of Pathogenic Microorganisms* by using the nominal group method and the Delphi method, etc. The whole process of nanopore sequencing (covering targeted next generation sequencing, metagenomic next generation sequencing and

whole genome sequencing) was standardized in terms of sample collection and storage, detection process, bioinformatics analysis and report interpretation; the recommendations were provided for the key issues.

**KEYWORDS** third-generation sequencing; nanopore sequencing; pathogenic microorganisms; critical infection; clinical laboratory tests; microbiological diagnosis

感染性疾病是由病原微生物引起的疾病的统称,目前仍然是全球公共卫生的重大威胁。实现病原微生物的快速精准检测对于感染性疾病的诊治具有非常重要的临床价值。目前,临床实验室针对病原微生物的检测主要有三类方法:(1)基于病原分离培养的方法。该方法是目前感染性疾病诊断的“金标准”,但因培养周期较长、阳性率低,许多病原微生物培养困难甚至无法培养,难以实现有效的病原体检测,从而导致诊断延误或漏诊;同时,延迟的病原学诊断也导致了广谱抗菌药物的不当使用和过度使用,使得病原菌耐药性增强、高耐药病原微生物在临床流行。(2)基于免疫学的检测方法,如抗原、抗体检测。该方法操作简便、成本低,但结果易受干扰,容易出现假阳性/假阴性。(3)基于分子生物学的检测方法,如荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、杂交芯片等。这些方法具有快速、灵敏、特异等优点,但属于靶向性检测,不能检测未知病原体,且单次检测的靶标数量有限。

随着基因组学技术的发展,高通量测序技术为病原微生物的鉴定提供了新的技术手段。该技术通过对样本核酸序列的测定可以实现传染病病原微生物的快速准确鉴定,而且检测通量高、耗时短,正越来越多地应用于临床感染性疾病的诊断和疫情防控之中。目前,高通量测序技术(也称“新一代测序技术”),泛指第二代测序技术(next generation sequencing technique, NGS)和第三代测序技术(third-generation sequencing technique, TGS)。其中,NGS测序通量高,但其测序读长较短,导致后续在进行生物信息学分析时基因组拼接困难,且测序时存在高GC偏好性,上述缺点使其应用受限,也因此推动了TGS的发展<sup>[1]</sup>。TGS因其超长的测序读长弥补了NGS的不足,逐渐被应用于临床各个领域。依据检测目的和方法的不同,TGS主要分为靶向测序(targeted next generation sequencing, tNGS)、宏基因组测序(metagenomics next generation sequencing, mNGS)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)等方向;依据测序原理的不同,则可分为纳米孔电信号测序[以纳米孔单分子测序(以下简称“纳米孔测序”)为代表]和单分子荧光信号测序[以单分子实时测序(single molecule real-time, SMRT)技术为代表]。其中,相较于单分子荧光信号测序,纳米孔测序具有设备小型化、便携的特点,可以在床旁、野外开展样本检测,符合临床上即时检测的需求,可缩短临床病原微生物的诊断时间,改善抗生素滥

用问题。近年来纳米孔测序已经在病原微生物检测、感染性疾病甚至重大公共卫生问题流行期间的诊断与防治等领域发挥了重要作用<sup>[2-3]</sup>,也有多项基于纳米孔测序病原微生物检测的多中心研究开展<sup>[4-5]</sup>,由此可见,纳米孔测序在临床病原微生物检测领域具有独特的优势及广阔的应用前景。

现有的病原微生物高通量测序规范共识主要针对NGS<sup>[6-8]</sup>,纳米孔测序因其独有的特点,在建库流程、数据分析等方面与NGS存在较大差异,临床急需适用于纳米孔测序的技术规范。为此,中国药理学会治疗药物监测研究专业基层委员会和广东省药学会临床治疗精准用药专家委员会联合发起制订了《纳米孔测序在病原微生物检测中的应用专家共识》,对纳米孔测序的原理和特点,纳米孔测序(包括tNGS、mNGS和WGS)的全流程(包括样本采集与运输保存、检测过程、生物信息学分析、报告解读等环节)进行了规范,并对其中的关键问题给出了推荐意见,以期对纳米孔测序的规范化流程管理,临床危重症感染患者及肿瘤患者的合理、精准用药,医院药学服务水平的提升提供助益;此外,还可为计划开展纳米孔测序的医院和检测机构提供参考依据,以共同促进该技术的进一步发展。

## 1 共识制定方法

本共识由中国药理学会治疗药物监测研究专业基层委员会和广东省药学会临床治疗精准用药专家委员会联合发起,暨南大学附属广州红十字会医院、华中科技大学协和深圳医院(南山医院)、中山大学附属第六医院、广东省人民医院、中山大学孙逸仙纪念医院以及中山大学附属第一医院作为共同牵头单位,组织国内多学科专家编写和审定。

本共识采用名义群体法,由多学科(药学、检验、临床)专家组成编写组,采用线上和线下相结合的会议形式共同讨论确定共识编写大纲,内容包括纳米孔测序的原理和特点、纳米孔测序的基本流程和要求以及生物信息学分析和报告解读等。编写组针对大纲涉及的内容进行了系统检索、分析、归纳,并根据我国现状、临床需求和研究证据展开讨论,形成共识初稿。之后,采用德尔菲法,邀请临床实践经验丰富的多学科专家组成外审专家组,就共识初稿进行专家咨询,开放收集专家的外审意见,并由执笔专家对专家意见进行整理、归纳、分析、反馈、修订,最后经牵头单位牵头专家组召开定稿会进行讨论,确立本共识。

## 2 纳米孔测序

### 2.1 纳米孔测序的原理

纳米孔测序是将单分子检测和电流信号传导相结合的测序方法,测序原理上摆脱了NGS的洗脱和PCR扩增(边合成边测序)过程,通过连接接头的马达蛋白将双链核酸解开,在电场力的驱动下使单链核酸分子穿过纳米蛋白孔道,由于不同的碱基通过纳米孔道时会产生不同阻断程度的电流信号,测序仪通过记录电流信号的变化,就可推导出碱基信息,从而实现对核酸分子的测序<sup>[1-9]</sup>。相较于NGS,该技术实现了从短测序读长到超长测序读长、从光学检测到电子传导检测的双重跨越。

### 2.2 纳米孔测序的特点

纳米孔测序具有以下特点:(1)可检测到的最长序列可达4.2 Mb<sup>[9]</sup>,超长读长测序使得其对同源性强的同属水平下的种水平鉴定特异性更高。由于可以跨过基因组的一些复杂区域,该技术可实现对复杂基因组的组装和用于发现更多病原微生物的未知结构变异<sup>[10-11]</sup>。(2)单孔测序平均速度可达450 bp/s<sup>[9]</sup>,通过多通道纳米孔并行测序,可以快速获得高通量待测序列。(3)建库过程无需片段化,可直接连接接头对核酸序列进行测序,简单便捷。(4)测序过程不依赖PCR扩增,避免了扩增给测序带来的偏好性,可无偏倚地直接对原始DNA或RNA进行测序,保留了原始碱基的修饰信息<sup>[12-13]</sup>。(5)可实时进行碱基识别与分析,并能按需终止测序,显著缩短了测序流程及分析时间,可满足动态检测需求。(6)纳米孔芯片经清洗后可反复使用,直至纳米孔蛋白失活,因此上样更加灵活,有效提高了芯片利用率。(7)纳米孔测序仪体积小、便携,不受电力、实验室空间和服务器等外部资源的限制,适合床旁、野外或疫情暴发地的实时测序<sup>[14-15]</sup>。

**推荐意见 1:**病原样本具有一定的生物安全隐患,推荐本地化开展病原微生物检测项目,避免不当运输;由于纳米孔测序的灵活性,取样后可即刻完成样本前处理及上机测序。

**推荐意见 2:**临床表现高度怀疑感染性疾病但病原不明,需要快速识别感染性病原微生物,但样本量较少使用NGS开机成本高时,推荐使用纳米孔测序。纳米孔测序上样更加灵活且可进行实时碱基识别与分析,能够实现感染性病原微生物检测时效性与成本的平衡。

**推荐意见 3:**针对新发突发传染病疫情防控,需要基于全长基因组进行病原微生物演化和变异分析时,推荐使用较长读长的纳米孔测序进行病原微生物全长基因组检测和分子溯源。

**推荐意见 4:**对于需要区分高同源性的病原微生物亚型(例如结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌)时,推荐使用较长读长的纳米孔测序以增加其特异性。

## 3 纳米孔测序的样本采集与运输保存

### 3.1 样本采集

针对临床疑似感染性疾病的患者,可采集患者样本进行纳米孔测序。目前,该技术的灵敏度主要受样本中人源核酸占比、微生物含量以及微生物核酸提取效率的影响。为了保证检测效果,对感染性疾病的样本采集应遵循以下基本原则:(1)尽量在患者入院当日或抗菌药物使用前采集样本;(2)尽量采集原发病灶部位的样本;(3)样本采集过程中应严格执行无菌操作;(4)从正常无菌部位采集检测样本,应严格无菌操作,避免污染;(5)从有菌定植或污染部位采集样本,应采取必要措施,尽量减少污染。不同样本的采集方法如下<sup>[16-17]</sup>:

#### 3.1.1 血液、骨髓及其他高凝样本

(1)血液样本通常于肘静脉采集3~5 mL血液至乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管或游离DNA保存管中。采血时皮肤需彻底消毒,切忌在静脉滴注抗菌药物的静脉处采血,除非怀疑有导管相关的血流感染。

(2)骨髓样本一般通过骨髓穿刺取得,临床医师需要在严格无菌操作下,抽取患者1~2 mL骨髓样本至EDTA抗凝管或游离DNA保存管中。

(3)其他高凝样本视样本类型规范采集,且采样管需含有抗凝剂以避免发生血液凝固导致样本质量不合格。样本采集后应立即将采样管上下颠倒混匀8~10次,以充分混匀血样与保护剂,避免样本凝固,混匀时应动作轻柔,以免发生溶血。

样本采集完成应立即拧紧管盖,标记条码后立即送检。

#### 3.1.2 呼吸道样本

(1)咽拭子样本通常仅用于诊断上呼吸道感染。采集时嘱患者张口发“啊”音,以暴露咽喉部,必要时用压舌板;取出拭子管中的无菌长棉签,快速擦拭两侧腭弓和咽、扁桃体的分泌物,扁桃体有脓点时最好挤破脓点并采集脓性物,将2~3根咽拭子存放在含有保存液的保存管中,盖紧管盖,标记条码后立即送检。

(2)肺泡灌洗液是疑似肺炎或下呼吸道感染的最佳送检样本。患者咽喉局部麻醉后,导入纤维支气管镜,通过支气管镜对病灶所在支气管以下肺段或亚肺段进行多次灌洗,每次注入20~60 mL 37 °C或室温无菌生理盐水,通常灌洗4~5次,负压吸引回收,回收液中一般会包含约10 mL支气管末梢和肺泡中的分泌物;弃去首管可能被污染的样本,收集第二管,标记条码后立即送检。

(3)痰样本主要用于下呼吸道感染的辅助诊断。在医护人员的指导下,患者需用清水或生理盐水漱口2~3次,有假牙者应先取下假牙,再用力咳出深部痰液3~5 mL于无菌杯内,勿留取唾液和鼻咽腔分泌物;若无法自行咳痰,可通过吸痰器从气道采集,盖好并拧紧杯盖,标记条码后立即送检。

### 3.1.3 脑脊液样本

脑脊液是诊断中枢神经系统感染最主要的样本。采集部位皮肤消毒后,通常在第3、4腰椎或第4、5腰椎间隙插入带有管芯针的空针,进针至蛛网膜间隙,拔去管芯针,收集脑脊液。为防止污染,建议取第二管以后的脑脊液,约3~5 mL,标记条码后立即送检。

### 3.1.4 胸腔积液、腹水、关节积液和尿液样本

(1)胸腔积液/腹水/关节积液一般由临床医师经皮穿刺或外科方式获得。通过影像学、超声等技术定位穿刺部位后,消毒穿刺部位皮肤,麻醉穿刺部位,用中空孔针穿刺至目标部位,抽取胸腔积液/腹水/关节积液样本5 mL于无菌管中,标记条码后立即送检。

(2)尿液一般由受检者自行采集。受检者清晨采集中段尿样本5 mL于无菌采样管中,标记条码后立即送检。

### 3.1.5 脓肿样本

对于开放性脓腔,先用无菌生理盐水清洁创面,再用拭子采集深部伤口或溃疡基底部的分泌物,或剪取深部病损边缘的组织;对于封闭的脓肿,先对病灶局部的皮肤或黏膜表面彻底消毒,再用注射器抽取脓液3 mL,或将脓肿切开引流后,取脓肿壁的一部分送检;对于瘰管或窦道脓肿,最好在外科探查时采集最深处组织。样本采集完放入无菌采样管内,标记条码后立即送检。

### 3.1.6 深部组织样本

深部组织样本一般在手术探查时才可获得,应采集足够量的组织样本,一般以 $\geq 5 \text{ mm}^3$ 为宜,至少约绿豆大小。小块组织宜用1~2 mL无菌水或生理盐水保湿,大块组织应剪碎后取适量分装到无菌采样管内,标记条码后立即送检。

### 3.1.7 房水/玻璃体液样本

房水/玻璃体液样本的采集一般由培训过的眼科医师在手术室内完成。房水样本,需麻醉患者并进行常规结膜囊清洁后,用1 mL无菌注射器,于角膜缘平行虹膜平面穿刺入前房,抽取房水约0.1 mL;玻璃体液样本,则于角膜缘后平坦部垂直巩膜向眼球中心方向穿刺入玻璃体腔10 mm,抽取尽可能多的玻璃体样品(不少于0.2 mL)。样本采集完放入无菌采样管内,标记条码后立即送检。

### 3.1.8 粪便样本

粪便样本一般由受检者自行采集,通常根据项目检测需求选择自然排便法或直肠拭子法。自然排便法采集时需注意,应弃去前段容易污染的部分,选择中段粪便0.5~1 g(约黄豆粒大小);直肠拭子法采集时需注意,先用肥皂水将肛门周围洗净,将沾有无菌生理盐水的棉拭子插入肛门4~5 cm(儿童为2~3 cm),将棉拭子与直肠黏膜表面接触,轻轻旋转拭子,拭子上可明显见到粪便即可,最好采集2个或以上拭子。样本采集完,将拭子

放入无菌采样管内,标记条码后立即送检。

### 3.1.9 菌液样本

用于靶向WGS的菌液样本,通常需要培养获得,因此需要测试合适的分离纯化及培养条件,从临床样本中得到纯培养物;用于非靶向PCR-Free WGS的菌液样本,应保证采集的样本所提核酸 $> 1 \mu\text{g}$ ,菌液采集后置于5 mL无菌管中,标记条码后送检。

## 3.2 样本运输及保存

(1)样本应根据实际送检情况选择合适的运输方式:若样本可在24 h内送达实验室并开始检测,可考虑用冰袋低温运输;若运输时间在24~72 h内,应使用干冰运输,送达实验室后应立即进行样本前处理和核酸提取,以防止核酸降解影响检测效果<sup>[16-17]</sup>。运输过程中应尽量避免剧烈颠簸,以规避漏液导致的污染风险。若怀疑高致病性或新发突发传染病,运输中应严格按照《传染病防治法(2013修正)》等相关法规要求及实验室安全管理要求<sup>[18]</sup>进行包装及转运。若外送至第三方测序公司测序,应尽可能在生物安全防护条件下抽提核酸,然后用干冰运输。

(2)样本采集完成后应立即送检,若无法立即送检,可暂存于4 °C的环境中(不超过7 h),且需当天送检;若短期内不送检,样本应立即置于-20 °C以下冰箱暂存(不得超过7 d);长期保存应立即置于-80 °C冰箱保存。RNA测序样本应直接置于-80 °C冰箱保存<sup>[16-17]</sup>。保存过程中应尽量避免反复冻融(一般不超过3次)。

## 4 检测过程

### 4.1 样本前处理

按照前述各个样本的相应要求进行样本的采集及运输保存,防止污染和核酸降解,并及时做好样本初始状态的记录。

各实验室应建立样本前处理的标准操作流程,包括样本液化、样本浓缩及去除宿主等前处理方法。对于不同类型的临床样本,应建立针对性的前处理程序。例如,对于痰液等黏性较高的样本,需进行液化处理,且各实验室应针对液化过程建立样本黏稠程度分级、液化液使用体积、液化时间等标准化程序,以保证微生物核酸的完整性;对于血液样本,需根据实际检测需求决定是否离心进行血浆分离;对于组织样本,为提高核酸提取效率,需先将其切碎后再进行操作<sup>[7]</sup>。样本提取前是否需要去除宿主细胞或核酸,应结合样本类型及应用方向综合考虑。例如,tNGS可靶向捕获特异性病原微生物的核酸,人源核酸对检测结果的干扰较小。而对于mNGS而言,如果样本中宿主细胞含量较高,在测序数据量恒定的条件下,会导致病原微生物检测的灵敏度降低,因此,高宿主背景样本提取前可考虑采用经过验证的方法去除宿主细胞或核酸<sup>[6]</sup>。

## 4.2 核酸提取

完整的核酸提取方法需经重复性和耐受量验证,保证提取核酸的完整性和纯度。应根据临床样本类型和微生物种类建立有针对性的标准化提取程序,以保证不同类型病原微生物的提取效果。例如,针对真菌、分枝杆菌等特殊微生物,应保证其破壁效果;针对RNA病毒、游离核酸,则应保证其提取效果。每次试验,都应包括内参、阴性对照和阳性对照,以评估每批次样本中是否存在操作或环境带来的污染等异常<sup>[7]</sup>。若使用自动提取仪,应避免交叉污染,且提取时间应控制在合适范围内。

提取核酸时,对于DNA、RNA是否需要分开提取,应结合应用方向和检测靶标综合考虑。若检测范围包括新发或未知病原(包括RNA病毒),进行mNGS检测时应将DNA和RNA分开提取,以提高各类病原微生物的无差别检出率。

## 4.3 核酸质量验证

各实验室应建立合格核酸样本的标准,包括纯度、完整性及核酸含量。高纯度DNA的 $A_{260}/A_{280}$ (260 nm与280 nm波长处的吸光度比值)应在1.7~1.9范围内, $A_{260}/A_{230}$ (260 nm与230 nm波长处的吸光度比值)应 $>2.0$ 。高纯度RNA的 $A_{260}/A_{280}$ 应在1.8~2.0范围内, $A_{260}/A_{230}$ 应 $>2.0$ <sup>[9]</sup>。应采用合适的方法检测核酸完整性,若核酸降解严重则需要重新提取。每次提取的核酸样本应使用Qubit荧光染料进行定量测定,以确保核酸含量满足后续实验要求。

## 4.4 文库制备

纳米孔测序的文库制备是将提取到的核酸进行修复后连接测序接头的过程,如需同时测序多个样本,可在连接标签接头后再连接测序接头。不同连接方式使用的试剂、时间、初始投入量均有所不同,需明确不同连接方式的标准化操作步骤。不同应用方向的测序技术,其建库方式不同,例如,tNGS要保证病原微生物的特异性扩增或捕获效率;mNGS更注重无偏倚扩增;WGS则可在不打断核酸的情况下测序,纯菌液样本只需1  $\mu\text{g}$ 即可直接进行WGS,而低起始量的样本可在扩增后进行,例如COVID-19在循环数阈值(Ct值)仅为35时也可在扩增后进行WGS。

是否进行PCR扩增和片段化处理可根据起始核酸含量和应用方向决定,以提高数据产出效率。扩增可能会导致菌群或污染序列不成比例地扩大,对分析提出了更高的要求。建库完成后,应及时上机检测。因测序接头含有蛋白成分,不宜用乙醇处理,也不宜长时间保存。

## 4.5 文库质量验证

各实验室应明确核酸质量及文库产出标准,不同建库方式应有不同的质量标准。可采用Qubit荧光染料法检测文库浓度,高质量的文库需达到一定浓度。具体浓

度要求及文库用量与实际应用方向和文库中核酸序列的长度有关。各实验室需要明确文库中核酸序列的长度,以确定文库用量,例如用WGS检测5 000 bp左右的序列时,在上样量50 fmol情况下,需要170 ng的核酸(<https://nanoporetech.com/support>)。

## 4.6 上机测序

由于纳米孔测序芯片是生物蛋白孔,其保存、使用、质控标准都要符合测序设备标注的标准流程。纳米孔测序芯片虽可多次使用,但“可用芯片”的标准也有具体的要求。例如,初次使用的MinION/GridION芯片的可用孔数应 $>800$ ,随着使用次数的增加,芯片可用孔数会有所减少,其数据产出速度和孔状态都会有不同程度的下降。芯片是否可以继续使用应根据需要的数据量及实验要求进行评估,根据MinION/GridION芯片的质控标准及测试报告,其最低应用标准为50孔。

测序数据量与预期用途(病原鉴定、耐药检测、全基因测序等)、样本中的人源核酸占比、芯片质量等有关。纳米孔测序仪可实时输出核酸序列信息,包括长度、质量、接头连接效果、孔状态、芯片稳定性、序列过孔速度等,应根据应用目的的不同确定相应的测序标准。用户在使用过程中应关注接头连接率及纳米孔利用率等指标,一般接头连接率应不低于90%,纳米孔利用率应不低于75%,序列过孔速度要求在300 bp/s以上,测序质量值应 $>Q9$ ,不满足要求的应及时停止测序,予以补救。

**推荐意见5: 纳米孔芯片清洗、使用应有标准化流程,应明确使用前的质控标准,依据样本类型及应用方向选择适合的数据量及测序时间等参数,测序过程中应监控测序指标,如过孔速度、测序质量、孔状态等。**

## 5 生物信息学分析

生物信息学分析包括以下几个步骤:序列拆分、接头及低质量序列过滤、数据统计、参考数据库比对及物种鉴定、背景微生物过滤、交叉污染判定、物种注释(物种分类、致病性、临床意义)等。

### 5.1 序列拆分

在构建测序文库时,每个样本会加上一个测序标签(也称barcode,一般为24 bp左右,属人工合成的序列片段),然后将多个样本批量混合上机(多份样本混合后加入一张芯片),在测序后需通过识别测序标签以区分不同样本。

### 5.2 接头及低质量序列过滤

下机数据经拆分后即可得到每个样本的测序数据,但得到的测序数据需过滤掉测序接头和低质量序列(长度较短或平均测序质量较低的序列),然后将获得的高质量读长序列作为微生物鉴定的输入数据。一般可使用Porechop软件<sup>[20]</sup>过滤测序接头,使用NanoFilt<sup>[21]</sup>、Filtlong(<https://github.com/rrwick/Filtlong>)等工具过滤测序序列。可根据不同检测产品的片段读长特点选择合适

的最短读长阈值,平均测序质量值 $<Q7$ 的序列将被整条过滤掉<sup>[22-23]</sup>。

### 5.3 数据统计

可使用NanoStats软件进行测序数据量的统计,包括测序序列数(reads)、碱基数(bases)、序列长度分布、平均测序质量值等<sup>[21]</sup>。不同样本类型、不同应用方向的检测性能特点对数据量等统计指标有不同的要求,需进行相关的测试实验以获得统计指标要求。

测序数据量指标的确定,一般与应用方向、产品检测限及样本类型等几个因素有关。(1)应用方向:相较于tNGS,mNGS检测的微生物靶标更多,且受人源宿主核酸的影响更大,因此mNGS一般比tNGS需要的数据量更大。(2)产品检测限:检测限越低,需要的数据量越高。(3)样本类型:一般情况下,肺泡灌洗液样本的病原微生物含量、丰度均较高,可能在数据量较低的情况下就能检出;而对于血液样本,病原微生物的丰度相对较低,且人源细胞含量较高,往往需要更高的数据量才能检出。

对于序列读长分布,mNGS的序列片段是由微生物基因组随机断裂而来,长度分布一般较随机。而tNGS的片段长度取决于待测微生物引物设计时的引物扩增子长度。例如,病毒等基因组较小的微生物,在测序过程中更容易碎裂成短的片段(100 bp左右)<sup>[24]</sup>,所以引物扩增子需要设计得更短一些,进而导致测序片段也较短。因此,扩增子长度会直接影响序列长度,通常序列长度要求不小于最短扩增子长度。

### 5.4 参考数据库比对及物种鉴定

纳米孔测序因其较长的测序读长及直接测序的优势,对于病原微生物检测可不进行组装拼接而直接进行比对分析,且序列比对特异性更高,分析流程更为简单。可使用minimap2<sup>[25]</sup>等软件将纳米孔测序的reads跟参考序列数据库进行比对,获得物种鉴定分类信息。参考数据库应选择质量较高的数据库,如美国FDA的FDA-ARGOS<sup>[26]</sup>、美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)的RefSeq<sup>[27]</sup>等。另外,病原微生物的样本可能会带有宿主序列,因此,比对标数据库也应包含人源参考基因组数据库,如Human GRCh37/hg19和Human GRCh38/hg38基因组数据库(<http://genome.ucsc.edu/>)。比对标数据库应定期更新,过滤删除冗余、不正确或组装质量较差的参考序列,吸纳新发现的病原微生物基因组信息充实数据库。各实验室应按照样本类型构建病原谱,每一微生物应含有足够代表种及属水平的序列特征。

### 5.5 背景微生物过滤

病原检测流程中存在试剂工程菌、环境微生物及实验室残留微生物,可造成测序污染,导致假阳性结果。因此,各实验室需要构建背景数据库用于过滤污染序列。另外,对实验样本应设置无模板对照(no template

control,NTC)样本,以监控背景微生物,并进行过滤<sup>[28]</sup>。

### 5.6 交叉污染判定

标签合成错误、样本间标签污染、实验过程中需要开盖而产生气溶胶污染等,均可造成同批次样本间的交叉污染,一些强阳性样本也容易污染其他样本<sup>[29]</sup>。可通过设计相关测试实验或加入内参序列等方式估算样本交叉污染的比例,从而为后续结果解读提供参考。

### 5.7 物种注释

实验室需建立临床病原微生物的注释数据库,包括每种微生物的相关信息:比如物种分类(细菌、真菌、病毒、支原体/衣原体/螺旋体/立克次体、寄生虫等)、致病性(致病、条件致病)、定植信息、临床意义等,以据此进行后续的报告解读。

## 6 报告解读

报告解读是一个排除干扰并确定感染病原微生物的过程,临床送检的样本多种多样,其定植菌、微生物比例、空间异质性等差异,会给临床解读报告造成困惑。临床医师需密切结合患者的病史、感染指标、影像学、临床表现、并发症、流行病学史、接触史等情况,同时结合检测数据的质控要求,判断检出的病原微生物是否符合临床诊断<sup>[9]</sup>,如条件允许可进一步通过其他技术进行交叉验证。

病原微生物的确认须遵循Koch法则<sup>[30]</sup>:(1)该微生物存在于同类疾病患者中,健康个体无此微生物;(2)该微生物必须能够被分离、培养、纯化;(3)该微生物接种于易感动物可引起相同疾病,并可从被接种的动物体内分离到该微生物;(4)该微生物可引起每一个个体发病。但是,作为一种临床检验方法,利用纳米孔测序检测到的病原微生物可能并不能够完全满足传统Koch法则,作为该法则的补充,纳米孔测序的检测结果解读应满足如下要求:

### 6.1 数据质控要求

不同应用方向的检测范围有较大差异。由于检测目标中可能包含不同数量的病原微生物、耐药基因、毒力基因,因此不同的测序方向对于评估测序质量的要求自然也会有所不同。例如,mNGS由于检测的病原微生物数量多且易受宿主核酸的影响,往往要求更大的数据量;而tNGS检测的目标限定在少量特定病原微生物上,少量数据即可满足检测要求。解读时应先根据不同产品的技术要求确定是否满足样本质控要求,比如数据量、片段长度、测序质量、内参含量等。若有样本不满足质控条件,应尽快对检测步骤和样本状态进行溯源排查,确定原因,并采取进一步措施。

### 6.2 阳性阈值及判读标准

理论上,凡存在于样本中的微生物均可检出,但因微生物基因组长度和样本类型等的差异,无法针对所有微生物建立统一的阴性、阳性判读标准。各实验室应根

据预期用途、样本类型、检测目标和技术特点,建立并验证阳性阈值及判读标准<sup>[19]</sup>。受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析是一种可用于确定已知结果的临床样本训练集最佳阈值的有用工具,并能使用独立的验证集验证预先设定的阈值。由于病毒极少存活于环境中,因此,检出少量的病毒特异序列即可判为阳性(如少于3条特异序列)<sup>[31]</sup>。可通过NTC样本监控背景菌,避免报出与临床不相关的环境菌、共生菌及条件致病菌等。一般reads越多,病原微生物的可能性越大(如,数十条特异序列)。对于结核分枝杆菌、鼠疫耶尔森菌、布鲁菌等临床关注度高且较难检测的病原菌可采用独立的判读标准,检出1条特异序列即可判为阳性<sup>[32]</sup>。寄生虫基因组因较为复杂,且与人源基因组相似,应在严格确认序列特异性之后再行判读<sup>[33]</sup>。如果检出序列为新发物种,则可不受阈值限制,但需给出同源性比对结果。

对于耐药基因的分析判读,可考虑综合抗生素耐药性数据库(Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)<sup>[34]</sup>等抗性基因数据库,数据库会给出耐药基因在不同物种中的分布情况;另外,应充分结合病原微生物检出的丰度及比对情况进行物种推断,必要时进行进一步的比对验证或结合药敏测试结果判断。对于mNGS,由于受人源核酸影响较大,并且检测病原靶标更多,往往需要更大的数据量才能检测到耐药基因,病原微生物丰度越高,耐药基因被检测到的几率越大。对于tNGS,由于受人源影响较小,并且该技术会针对耐药基因设计特异性引物或探针进行捕获,较小的数据量即可满足检测要求。相比于NGS,纳米孔测序的读长更长,其对耐药基因的比对定位更精确,因此在耐药检测方面的准确度更高。

### 6.3 检测结果验证

如果检出的微生物符合疾病特征,则可能是引起感染的病原微生物,但不能只根据reads的多少进行确认,还应考虑序列在基因组上的覆盖度、特异性等因素,并通过交叉污染系数考察同一批样本的交叉污染情况。另外,还可通过PCR等方法对病原微生物进行验证,如呼吸道样本中的流感病毒、腺病毒及COVID-19等,粪便样本中的志贺菌、沙门菌及诺如病毒等,脑脊液中的肠道病毒、单纯疱疹病毒及西尼罗病毒等,血液中的布鲁菌、巴尔通体及人类免疫缺陷病毒等。如果检出reads多的某种未命名微生物,应高度警惕新物种的出现<sup>[19]</sup>。

### 6.4 无菌部位样本检出微生物种群的解读

无菌部位脓肿样本可见多种病原微生物共检出现象。如,脑脓肿、颈间隙脓肿、咽旁脓肿、口腔脓肿等部位样本所检出的微生物reads均可能达到阳性阈值,且多数为严格厌氧菌与兼性厌氧菌共生。此类疾病由一个种群的微生物或一个微生物生态系统引起,与Koch

法则一种病原菌引起一种疾病不同。尽管这种种群致病理论还需进行深入探讨,但随着深度测序技术的广泛应用,这种现象可能将在临床上得到更多的验证<sup>[35]</sup>。在一份无菌部位来源的临床样本(尤其脓肿)中检出微生物种群(包括不同类别或同类不同种属)不应轻易视为污染。如果这些微生物的存在符合临床诊断,应给予抗菌药物全覆盖。

### 6.5 不可培养或难培养微生物的结果验证

mNGS的检测范围为样本中所有病原微生物的核酸序列,包括不可培养或难培养微生物,这类病原微生物不能通过传统培养方法再现,且同样缺乏血清学或抗原检测方法。除病毒、螺旋体、立克次体、寄生虫外,这些微生物可通过核酸检测方法进行验证,例如一代测序技术<sup>[19]</sup>。

### 6.6 致病菌、定植菌和污染菌的判读

当确定条件致病菌为病原菌时,应结合患者的免疫状态、基础疾病及样本来源综合考虑。若出现大量背景菌或杂菌序列而无主导微生物时,应首先考虑样本污染,其次考虑条件致病菌<sup>[19]</sup>。如果是外科手术或其他有创操作后的无菌部位样本,菌种单一,reads可能不多时,应结合临床考虑院内感染,此时应与背景菌区分,不可一味认为样本受到污染。对于不同的样本类型,同样的reads可能有截然不同的解读方式<sup>[36]</sup>。mNGS检测结果为阴性,虽对排除感染有意义,但也应结合临床表现作出正确的解读<sup>[37]</sup>。

### 6.7 高度传染性微生物的处理要求

针对具有高度传染性的特殊病原微生物,实验室应根据卫生行政部门的相关规定制定特殊报告程序,检测结果应上报疾病预防控制中心,如出现疑似O1群或O139群霍乱弧菌、鼠疫耶尔森菌、埃博拉病毒或新型病原微生物等,应尽快采用其他方法验证,如PCR、血清学方法等,如果验证结果与测序结果一致,应迅速报告给临床和疾病预防控制中心<sup>[19]</sup>。

**推荐意见 6:** 由于纳米孔测序读长较长,且采用PCR-free的测序过程,提高了原始样本的序列保真度,少数序列所反映的病原检测结果的准确性相比短读长的NGS更高。因此,对于纳米孔测序检出reads较少的病原微生物,也应结合患者临床表现、病原微生物特性、样本类型及实验室环境等情况综合评估。

## 7 小结

本共识对于纳米孔测序应用于感染性疾病病原微生物检测的各个流程进行了规范建议,希望能促进该技术的临床应用和良性发展。目前,纳米孔测序历经多代更迭,性能也趋于优化与稳定,但进一步提升准确度、降低测序成本仍然是其主要挑战。相信随着纳米孔测序平台的不断完善与测序成本的不断下降,纳米孔测序利用平台自身灵活便携、适合院内外检测的独特优势,将

在现场病原微生物检测、临床感染微生物学诊断以及实时病原微生物监测等领域中具有日益广阔的应用前景。

## 8 附则

### 8.1 共识制定利益声明

本共识外审专家和起草成员均填写了利益声明表,所有作者均声明不存在利益冲突。

### 8.2 共识更新计划

本共识计划在2~3年间更新版本。

### 8.3 致谢

感谢浙江迪谱诊断技术有限公司张郁对本共识涉及的技术路线及方法验证所作的贡献。

## 《纳米孔测序在病原微生物检测中的应用专家共识》

### 编写组

#### 执笔专家

张述耀 主任药师(暨南大学附属广州红十字会医院临床精准治疗中心)

侯铁英 主任医师[华中科技大学协和深圳医院(南山医院)]

黎小妍 主任药师(中山大学附属第六医院药学部)

钟诗龙 研究员(广东省人民医院药学部)

黄彬 主任医师(中山大学附属第一医院检验科)

伍俊妍 主任药师(中山大学孙逸仙纪念医院药学部)

#### 专家组成员(按姓氏拼音排序)

陈杰 主任药师(中山大学附属第一医院药学部)

高分飞 教授(汕头大学医学院药理研究室)

耿燕 主任医师(西安交通大学第二附属医院检验科)

郭惠民 教授(浙江迪谱诊断技术有限公司技术部)

何艳玲 主任药师(广州中医药大学金沙洲医院药学部)

洪文昕 主任医师(暨南大学附属广州红十字会医院感染科)

侯铁英 主任医师[华中科技大学协和深圳医院(南山医院)]

黄彬 主任医师(中山大学附属第一医院检验科)

李慧灵 主任医师(中国人民解放军总医院海南医院热带医学科)

李玮 主任医师(河南省人民医院神经内科)

黎小妍 主任药师(中山大学附属第六医院药学部)

李艳丽 主任医师(商丘市第一人民医院呼吸介入科)

李亦蕾 主任药师(南方医科大学南方医院药学部)

林朝仙 主任药师(汕头潮南民生医院药学部)

雷艳丽 副主任药师(毕节市第二人民医院药学部)

刘家云 主任技师(空军军医大学第一附属医院检验科)

马燕 主任医师(山东省立第三医院儿科)

梅清华 主任药师(广东省第二人民医院药学部)

梅世月 主任医师(河南省儿童医院儿科医学研究所)

彭劼 主任医师(南方医科大学南方医院感染科)

彭亮 主任技师(广州医科大学附属第五医院检验科)

邱凯锋 主任药师(中山大学孙逸仙纪念医院药学部)

王景浩 主任药师(暨南大学附属第一医院药学部)

王若伦 主任药师(广州医科大学附属第二医院药学部)

王晓琴 主任技师(西安交通大学第一附属医院检验科)

伍俊妍 主任药师(中山大学孙逸仙纪念医院药学部)

吴仕波 主任医师(宁波市医疗中心李惠利医院呼吸内科)

严海燕 主任技师(中山大学孙逸仙纪念医院深汕中心医院检验科)

严鹏科 主任药师(广州医科大学附属第三医院药学部)

杨立业 主任技师(阳江市人民医院精准医学检验中心)

喻志强 主任技师(南方医科大学第十附属医院/东莞市人民医院检验科)

曾赤佳 主任技师(复星禅城医院检验科)

曾泗宇 主任药师(广东省第二人民医院药学部)

张丽红 主任技师(绍兴市人民医院检验科)

张锐 主任医师(暨南大学附属广州红十字会急诊ICU)

张述耀 主任药师(暨南大学附属广州红十字会医院临床精准治疗中心)

张章 教授(暨南大学药学院)

赵荣生 主任药师(北京大学第三医院药学部)

郑磊 主任技师(南方医科大学南方医院检验科)

郑志华 主任药师(广东省药学会)

钟洪兰 主任药师(广州市胸科医院药学部)

钟诗龙 主任药师(广东省人民医院药学部)

周华 主任医师(浙江大学医学院附属第一医院呼吸与危重症科)

主有峰 主任医师(暨南大学附属广州红十字会医院重症ICU)

邹尚荣 主任药师(广州医科大学附属市八医院)

## 参考文献

[1] 刘晔,许小毛. 基于纳米孔测序技术的临床检测研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(3): 296-299.

LIU Y, XU X M. Research progress of nanopore sequencing in the clinic[J]. Chin J Lab Med, 2022, 45(3): 296-299.

[2] LI J, WANG H Q, MAO L F, et al. Rapid genomic characterization of SARS-CoV-2 viruses from clinical specimens



- using nanopore sequencing[J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1) : 17492.
- [ 3 ] ZHAO N, ZHOU N, FAN H F, et al. Mutations and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 among imported COVID-19 from abroad in Nanjing, China[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:851323.
- [ 4 ] LIN Q Q, YAO Y K, LI X, et al. The application of nanopore targeted sequencing for pathogen diagnosis in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pneumonia: a prospective multicenter study[J]. *Infect Dis*, 2024, 56 (2) : 128-137.
- [ 5 ] ZHAO M N, ZHANG Y Y, CHEN L, et al. Nanopore sequencing of infectious fluid is a promising supplement for gold-standard culture in real-world clinical scenario[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14:1330788.
- [ 6 ] 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, 等. 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, 7(2):107-120.  
Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Microbiology and Immunology, Society of Clinical Microbiology and Infection of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare, et al. Chinese expert consensus on metagenomics next-generation sequencing application on pathogen detection of infectious diseases[J]. *Chin J Lab Med*, 2021, 7(2):107-120.
- [ 7 ] 《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.  
Editorial Board of the Chinese Journal of Infectious Diseases. Clinical practice expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing[J]. *Chin J Infect Dis*, 2020, 38(11):681-689.
- [ 8 ] 高通量测序共识专家组, 初乃惠, 黄海荣, 等. 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, 9(3):175-182.  
Expert Group on Consensus for Highthroughput Sequencing, CHU N H, HUANG H R, et al. Expert consensus on the application of high-throughput sequencing technology in the diagnosis of mycobacterial diseases[J]. *Chin J Infect Dis*, 2023, 9(3):175-182.
- [ 9 ] WANG Y H, ZHAO Y, BOLLAS A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(11):1348-1365.
- [ 10 ] MOSS E L, MAGHINI D G, BHATT A S. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38 (6) : 701-707.
- [ 11 ] CRETU STANCU M, VAN ROOSMALEN M J, RENKENS I, et al. Mapping and phasing of structural variation in patient genomes using nanopore sequencing [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):1326.
- [ 12 ] LEGER A, AMARAL P P, PANDOLFINI L, et al. RNA modifications detection by comparative Nanopore direct RNA sequencing[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):7198.
- [ 13 ] TOURANCHEAU A, MEAD E A, ZHANG X S, et al. Discovering multiple types of DNA methylation from bacteria and microbiome using nanopore sequencing[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(5):491-498.
- [ 14 ] HANSEN S, DILL V, SHALABY M A, et al. Serotyping of foot-and-mouth disease virus using Oxford nanopore sequencing[J]. *J Virol Methods*, 2019, 263:50-53.
- [ 15 ] HOENEN T. Sequencing of Ebola virus genomes using nanopore technology[J]. *Bio Protoc*, 2016, 6(21):e1998.
- [ 16 ] 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/T 640—2018[S/OL]. (2018-12-11) [2024-06-19]. <https://www.antpedia.com/standard/1154253251.html>. The National Health Commission. Collection and transport of samples for clinical microbiology test: WS / T 640-2018[S/OL]. (2018-12-11)[2024-06-19]. <https://www.antpedia.com/standard/1154253251.html>.
- [ 17 ] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(20):3192-3200.  
Chinese Preventive Medicine Association Hospital Infection Control Branch. Guidelines for collection and submission of clinical microbial specimens[J]. *Chin J Nosocomiology*, 2018, 28(20):3192-3200.
- [ 18 ] 马虹, 杨修军, 隋达伟, 等. 病原微生物实验室的生物安全管理[J]. *中国卫生工程学*, 2010, 9(2):156-157.  
MA H, YANG X J, SUI D W, et al. Biosafety management of pathogenic microorganism laboratory[J]. *Chin J Public Health Eng*, 2010, 9(2):156-157.
- [ 19 ] 中华医学会检验医学分会, 鲁辛辛, 王成彬, 等. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 6(12):1181-1195.  
Chinese Society of Laboratory Medicine, LU X X, WANG C B, et al. Expert consensus on clinical standardized application of metagenomics next-generation sequencing for detection of pathogenic microorganisms[J]. *Chin J Lab Med*, 2020, 6(12):1181-1195.
- [ 20 ] WICK R R, JUDD L M, GORRIE C L, et al. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing[J]. *Microb Genom*, 2017, 3(10):e000132.
- [ 21 ] COSTER W D, D'HERT S, SCHULTZ D T, et al. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(15):2666-2669.
- [ 22 ] ROBERTS L W, ENOCH D A, KHOKHAR F, et al.

- Long-read sequencing reveals genomic diversity and associated plasmid movement of carbapenemase-producing bacteria in a UK hospital over 6 years[J]. *Microb Genom*, 2023, 9(7):mgen001048.
- [23] PETERSEN C, SØRENSEN T, WESTPHAL K R, et al. High molecular weight DNA extraction methods lead to high quality filamentous ascomycete fungal genome assemblies using Oxford Nanopore sequencing[J]. *Microb Genom*, 2022, 8(4):000816.
- [24] GUO Y F, LI Z Z, LI L J, et al. A dual-process of targeted and unbiased Nanopore sequencing enables accurate and rapid diagnosis of lower respiratory infections[J]. *EBio-Medicine*, 2023, 98:104858.
- [25] LI H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(18):3094-3100.
- [26] 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.
- [27] PRUITT K D, TATUSOVA T, MAGLOTT D R. NCBI reference sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(suppl\_1):D501-D504.
- [28] LAO H Y, WONG L L, HUI Y, et al. The clinical utility of Nanopore 16S rRNA gene sequencing for direct bacterial identification in normally sterile body fluids[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14:1324494.
- [29] XU Y F, LEWANDOWSKI K, LUMLEY S, et al. Detection of viral pathogens with multiplex nanopore MinION sequencing: be careful with cross-talk[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:2225.
- [30] 曹茂开, 汪美先. 科赫氏法则在现代医学中的新思考[J]. *医学与哲学*, 1991, 12(12):8-10.  
CAO M K, WANG M X. New thinking on Koch's rule in modern medicine[J]. *Med Philos*, 1991, 12(12):8-10.
- [31] MILLER S, NACCACHE S N, 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.
- [32] FAN S, WANG X J, HU Y F, et al. Metagenomic next-generation sequencing of cerebrospinal fluid for the diagnosis of central nervous system infections: a multicentre prospective study[J]. *BioRxiv*, 2019:658047.
- [33] 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用共识专家组, 中国研究型医院学会脓毒症与休克专业委员会, 中国微生物学会微生物毒素专业委员会, 等. 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识: 第一版[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(5):531-536.  
Consensus Expert Group on Clinical Application of Metagenomics Sequencing Technology in Moderate and Severe Infection, Sepsis and Shock Committee of Chinese Society of Research Hospitals, Microbial Toxin Committee of Chinese Society of Microbiology, et al. Expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing in the pathogen diagnosis in clinical moderate and severe infections: first edition[J]. *Chin Crit Care Med*, 2020, 32(5):531-536.
- [34] ALCOCK B P, HUYNH W, CHALIL R, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1):D690-D699.
- [35] SALZBERG S L, BREITWIESER F P, KUMAR A, et al. Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3(4):e251.
- [36] 缪青, 胡必杰, 陈翔, 等. 一种基于病原宏基因组二代测序的解读方法: CN110335656A[P]. 2019-10-15.  
MIAO Q, HU B J, CHEN X, et al. An interpretation method based on the second-generation sequencing of the pathogenic metagene: CN110335656A[P]. 2019-10-15.
- [37] 中华预防医学会. T/CPMA 010-2020 基于高通量测序的病原体筛查通用准则[S/OL]. (2020-07-01) [2024-06-19]. <https://www.antpedia.com/standard/sp/905822.html>.  
The Chinese Preventive Medical Association. T/CPMA 010-2020 common guidelines for pathogen screening based on high-throughput sequencing[S/OL]. (2020-07-01) [2024-06-19]. <https://www.antpedia.com/standard/sp/905822.html>.

(收稿日期:2024-01-26 修回日期:2024-06-20)

(编辑:孙冰)