

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250888

• 规范与共识 •

## 纳米孔测序技术创新与规范化应用专家共识

《纳米孔测序技术创新与规范化应用专家共识》编写专家委员会, 中国医药生物技术协会生物诊断技术分会, 中国医师协会检验医师分会临床分子诊断学组, 中国医师协会精准医学专业委员会

**[摘要]** 纳米孔测序技术凭借其长读长、实时分析、直接测序及便携性等优势, 在病原诊断和精准医学领域展现出巨大的应用潜力。然而, 该技术在临床转化过程中仍面临实验流程标准化、数据分析规范化及结果解读一致性等方面存在不足的挑战。本共识基于最新研究进展和循证医学证据, 围绕病原微生物快速检测、精准诊断应用、规范化流程与质量控制3个维度, 阐述了纳米孔测序技术的适宜应用范围和技术规范性要求。共识强调了该技术在危急重症感染诊断、微生物耐药基因检测、甲基化分析和核酸大片段变异识别中的应用价值, 并对实验室条件、实验操作及生物信息学分析流程提出了建议和展望, 为推动纳米孔测序技术创新发展和合理应用提供专业意见和积极建议。

**[关键词]** 纳米孔测序; 病原诊断; 精准医学; 规范化应用; 专家共识

**[引用本文]** 《纳米孔测序技术创新与规范化应用专家共识》编写专家委员会, 中国医药生物技术协会生物诊断技术分会, 中国医师协会检验医师分会临床分子诊断学组, 等. 纳米孔测序技术创新与规范化应用专家共识[J]. 海军军医大学学报, 2026, 47(4): 435-446. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250888.

### Expert consensus on innovation and standardized application of nanopore sequencing technology

Expert Committee of *Expert consensus on innovation and standardized application of nanopore sequencing technology*, Branch of Bio-Diagnostic Technology of China Medicinal Biotech Association, Clinical Molecular Diagnostic Group of Laboratory Physician Branch of Chinese Medical Doctor Association, Precision Medicine Committee of Chinese Medical Doctor Association

**[Abstract]** Nanopore sequencing technology, featured by its long read lengths, real-time analysis, direct sequencing, and high portability, shows great potential in pathogen diagnosis and precision medicine. However, its clinical translation is still limited by deficiencies in the standardization of experimental protocols, data analysis pipelines, and the consistency of result interpretation. Based on recent research and evidence-based medicine, this consensus elaborates on the appropriation scope and technical normative requirements of nanopore sequencing technology from 3 aspects: rapid detection of pathogenic microorganisms, application in precision diagnosis, and establishment of standardized procedures and quality control. It clarifies the key value of this technology in the diagnosis of acute and critical infections, detection of microbial resistance genes, methylation analysis, and identification of large nucleic acid fragment variations. Recommendations and prospects are also proposed for laboratory conditions, experimental operations, and bioinformatics analysis processes, aiming to promote the innovation and rational application of nanopore sequencing technology.

**[Key words]** nanopore sequencing; pathogen diagnosis; precision medicine; standardized application; expert consensus

**[Citation]** Expert Committee of *Expert consensus on innovation and standardized application of nanopore sequencing technology*, Branch of Bio-Diagnostic Technology of China Medicinal Biotech Association, Clinical Molecular Diagnostic Group of Laboratory Physician Branch of Chinese Medical Doctor Association, et al. Expert consensus on innovation and standardized application of nanopore sequencing technology[J]. Acad J Naval Med Univ, 2026, 47(4): 435-446. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250888.

纳米孔测序 (nanopore sequencing) 技术基于电流信号生物传感机制, 通过高频采样记录电压驱动下核酸分子 (DNA 或 RNA) 以单链形式穿过嵌合在电绝缘性聚合物膜上的纳米级生物或固态孔道时引起的特征性电流阻碍信号, 并利用深度学习算法实时解码出序列信息<sup>[1]</sup>。与二代测序相比, 纳米

孔测序可以不依赖 PCR 扩增或化学标记<sup>[2]</sup>, 不仅避免了扩增偏倚, 还能直接检测甲基化等修饰碱基<sup>[3]</sup>。

相对于 PacBio 等长读长技术平台, 纳米孔测序仪构造简单、体积小且方便移动<sup>[2,4]</sup>, 具备边测序边分析的实时数据产出能力, 允许用户在获得有效结果后中止测序, 并通过芯片清洗实现重复利

[收稿日期] 2025-12-23

[接受日期] 2026-01-22

通信作者 (Corresponding author): 文文, 海军军医大学第三附属医院, 上海 200438, E-mail: wenwen\_smmu@163.com

用,降低了单次运行成本,也扩展了现场检测等应用场景。该技术的另一个优势是可获得百万碱基数的超长读长<sup>[5]</sup>,提升了基因组拼接、组装及结构变异检测的效率。此外,为了克服纳米孔测序在单碱基准确率和同聚物分辨上的挑战,研究人员探索了独特的优化路径,如设计带有双电流限制区的膜蛋白纳米孔和结合了生物纳米孔与化学合成优势的NanoTag技术——纳米孔边合成边测序(nanopore sequencing by synthesis, NSS)。这些技术的积累和改进为纳米孔测序技术的实践应用奠定了基础。

在当前的临床实践中,感染性疾病的病原体诊断常面临“速度慢”和“检不出”等痛点。传统培养结合质谱鉴定的方法耗时较长,且对苛养菌、病毒及真菌的检出率低(血培养阳性率通常<40%)<sup>[6]</sup>;二代测序虽然具备通量高、成本日益下降的优势,但建库流程相对烦琐、检测周转周期(turn-around time)长且难以解析复杂的耐药序列。此外,基因片段的融合和复杂的染色体结构变异(structural variation)往往是某些疾病表型的关键驱动因素,而二代测序难以发现和揭示相关的分子标志物和潜在规律。

纳米孔测序平台可以不依赖体积庞大、环境要求严苛的配套仪器,仅凭手持微小设备即可在资源受限的实验室甚至野外环境开展作业。纳米孔测序具备边测序边读取的能力,能够在较短时间输出和识别关键数据,缩短了从样本到结果的周转时间,在急重症感染快速病原学诊断、新发突发疫情病原体筛查鉴定等场景中具有重要的应用价值。此外,结合生物信息学分析,纳米孔测序技术还为精准捕捉结构变异<sup>[7]</sup>、甲基化修饰和耐药基因<sup>[8]</sup>等分子特征提供了候选解决方案。

尽管优势明显,目前纳米孔测序的技术创新仍然存在一些瓶颈问题亟待突破,如纳米孔道阻塞、测序单次读取准确率和重复序列识别错误率较高等,在实际应用和临床转化中也面临实验流程标准化、数据分析规范化及结果解读一致性等方面存在的挑战。这些问题一定程度制约了相关设备和试剂获得医疗器械注册准入的进程,亟须行业内专家和从业人员凝聚共识,进一步推动纳米孔测序技术的革新和规范化应用。

本共识汇聚多学科专家意见,结合国内外最新研究成果与相关团体标准,旨在强化纳米孔测序技

术创新方向,明确在不同场景下的应用价值与推荐等级,为该技术的规范化应用提供指引和依据。

## 1 共识制定方法

1.1 编写专家委员会组建 本共识由中国医药生物技术协会生物诊断技术分会、中国医师协会检验医师分会临床分子诊断学组及中国医师协会精准医学专业委员会共同发起,编写专家委员会分为顾问组、专家组与秘书组,由来自临床医学、临床检验医学、病原微生物学、生物信息学及测序技术领域领域的专家组成,全体成员均已签署利益冲突声明,承诺相关商业利益不影响共识观点的客观性与公正性。

1.2 文献检索与筛选 采用系统综述的方法,检索了PubMed、Embase、Cochrane Library、Web of Science、中国知网(CNKI)、万方数据知识服务平台及维普中文科技期刊数据库。检索关键词包括纳米孔测序(nanopore sequencing)、病原检测(pathogen detection)、精准医学(precision medicine)、耐药基因(antimicrobial resistance)等,文献检索截止日期为2025年10月。纳入标准:关于纳米孔测序技术在临床病原诊断及精准医疗应用的随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)、系统评价、meta分析、观察性研究、专家意见及基础研究;排除标准:数据不完整、重复发表或质量评估不达标的文献。

1.3 证据质量分级与推荐强度标准 本共识参考推荐分级的评估、制定与评价(grading of recommendations assessment, development and evaluation; GRADE)系统的原则,结合临床实际应用场景,制定了如下证据质量分级与推荐强度标准。

1.3.1 证据质量分级 依据研究设计类型及质量,将证据等级划分为4类。I a/b级:来自高质量RCT及其meta分析或系统评价的证据,以及现行规范、指南、共识。II a/b级:来自方法学/诊断性研究的证据。III级:来自病例对照研究或观察性研究的证据。IV级:来自专家意见、基础研究或病例报告的证据。

1.3.2 推荐强度分级 综合考虑证据质量、临床获益与风险、卫生经济学成本及患者接受度,将推荐意见分为3个等级。强推荐:明确显示实施该技术/

策略利大于弊,或弊大于利。即使证据质量级别较低(Ⅲ/Ⅳ级),若临床获益显著且风险可控,也可能形成强推荐。条件推荐:利弊关系不确定,或证据质量较高但存在不一致性,需根据具体临床情境(如患者免疫状态、医疗资源可及性)进行决策。弱推荐:现有证据提示可能获益,但证据尚不充分或利弊相当,建议在特定条件下或作为补充手段使用。

1.4 共识达成与投票 共识制定采用德尔菲法(Delphi method)结合面对面专家会议的形式。经过以下4步最终达成本共识。(1)初稿撰写:由秘书组基于文献证据整理形成共识初稿。(2)专家咨询:通过邮件函询方式征求专家组意见,对初稿进行3轮修订。(3)线上讨论:召开线上专家研讨会,对关键推荐意见进行一轮集中审议和修改。(4)投票表决:针对每条推荐意见进行匿名投票。投票选项设为“同意”“不确定”“不同意”。推荐意见通过标准为赞同率(同意票数/总票数×100%)达到80%以上;对于未达成一致的条款,经修改后进行下一轮投票,直至达成共识。

## 2 感染性疾病病原体快速检测

2.1 病原体感染的快速诊断 病原微生物的快速、精准鉴定对指导抗感染治疗、降低死亡率至关重要。脓毒症患者给予有效抗生素治疗的时机每延迟1h,其生存率即下降7.6%<sup>[9]</sup>。对于脓毒症、重症肺炎或中枢神经系统感染的患者,传统培养方法耗时长且阳性率较低,而纳米孔测序可快速对鼻咽分泌物、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、血液、脑脊液、尿液、感染性渗出液等样本进行检测。

### 2.1.1 呼吸道感染

推荐意见1:对于呼吸道感染患者的样本(如BALF),尤其是免疫功能低下或病情危重者,采用纳米孔靶向测序或纳米孔宏基因组测序作为补充诊断手段以避免遗漏混合感染,诊断策略的选择应综合考虑诊断目的、目标人群特点、医疗资源可及性以及患者具体情况。(证据等级:Ⅱa级;推荐等级:条件推荐)

呼吸道样本中宿主DNA背景较高,常导致微生物序列占比偏低。采用皂苷法等宿主DNA去除方法处理BALF样本后进行纳米孔测序,可显著增

加微生物信号比例(从1%提升至48%)<sup>[10]</sup>,从而提高病原体检出率。

对低丰度病原体进行纳米孔测序时,样本类型的选择对确保检测性能至关重要。针对呼吸道标本进行非结核分枝杆菌的纳米孔靶向测序检测时,BALF为首选样本,其检测灵敏度最高,达90.1%;其次为痰液,灵敏度为78.6%;而肺穿刺液灵敏度较低,仅为50.0%。因此,开展呼吸道样本纳米孔测序时优先推荐选用BALF和痰液,以充分发挥实时、快速检测的技术优势;同时,对低质量样本所得的阴性结果,应审慎判读,避免漏检<sup>[11]</sup>。

此外,针对呼吸道感染中传统培养难以检出的真菌病原体,纳米孔测序具有显著优势。在重症或免疫功能受损患者中,曲霉菌、地方性真菌(如组织胞浆菌)及耶氏肺孢子菌的早期识别是临床痛点<sup>[12]</sup>,而纳米孔测序凭借长读长优势可直接跨越真菌基因组复杂重复区域,实现对上述苛养或缓慢生长真菌的快速精准鉴定,有效弥补常规检测方法的不足。

在呼吸道病原体检测中,仅依靠单一病原体检测往往会遗漏合并感染。有学者提出“双流程”(dual-process)策略<sup>[13]</sup>,即将纳米孔靶向测序和无偏倚宏基因组测序相结合,相较于单一检测方法,该策略在诊断复杂性下呼吸道感染时能显著提高病毒和曲霉菌的检出率。在新型冠状病毒感染患者中,采用纳米孔测序(如RespiCoV方案<sup>[14]</sup>)不仅能准确检出新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2),还能在24.7%的qPCR阴性样本中检出流感病毒、腺病毒等合并感染病原体<sup>[15]</sup>。

需注意的是,实验室报告提供的菌种相对丰度、测序深度及覆盖度等指标仅是微生物学线索,临床医生应结合患者的具体临床症状(如临床肺部感染评分)、影像学检查等进行综合判读,以区分定植菌与致病菌<sup>[16]</sup>,从而指导抗感染方案。

### 2.1.2 血流感染

推荐意见2:对于疑似血流感染的危重患者,快速病原体识别或传统血培养结果阴性时,建议采用纳米孔靶向测序作为辅助诊断工具;对于不明原因的复杂、疑难或罕见感染,推荐使用纳米孔宏基因组测序。(证据等级:Ⅱa级;推荐等级:强推荐)

临床上,感染性疾病传统诊断路径常受检测

周期较长的限制,易导致早期使用广谱抗生素的依据不够充分。常规血培养、菌种鉴定和药敏试验出具报告平均需要2~3 d。经流程优化后,纳米孔靶向测序可直接对血培养样本进行检测,全程仅需6~16 h即可出具报告<sup>[17-19]</sup>,能够为急诊和ICU患者提供更及时的病原学依据,指导临床治疗方案的选择。

一项前瞻性队列研究( $n=387$ )结果显示,纳米孔靶向测序对血流感染的阳性检出率为69.5%,显著高于传统血培养(33.9%, $P<0.01$ ),其诊断血流感染的灵敏度为84.0%(95%CI 79.5%~87.7%),特异度达90.1%<sup>[20]</sup>。除常见细菌外,纳米孔靶向测序还扩展了病原谱筛查范围,不仅提高了对毛霉菌等苛养或缓慢生长真菌的检出能力,还能同步识别常规血培养无法涵盖的病毒(如EB病毒)和非典型病原体(如恙虫病东方体)<sup>[20-22]</sup>。

在临床策略选择方面,对于疑似非罕见病原体感染(如常见革兰氏阴性杆菌、葡萄球菌),推荐使用多重PCR扩增的纳米孔靶向测序,以兼顾检测灵敏度与成本控制。对于不明原因的复杂感染,推荐使用纳米孔宏基因组测序;然而,由于纳米孔宏基因组测序易检出非急性血流感染致病微生物,需审慎解读结果。对于血培养阴性但高度疑似血流感染的病例,纳米孔游离DNA测序可作为补充诊断手段,用于识别其他相关感染<sup>[23]</sup>。

虽然目前纳米孔测序相关试剂、耗材尚未实现规模化量产,在临床病原微生物鉴定中成本相对较高,但其凭借高灵敏度和快速诊断优势,可降低患者死亡率、缩短住院时长,为特定脆弱人群、高危患者带来临床获益<sup>[24-25]</sup>,该应用价值有待更大规模前瞻性研究进一步验证。

### 2.1.3 中枢神经系统感染

推荐意见3:对于常规检测方法未能确诊的疑似中枢神经系统感染(如脑膜炎、脑炎)患者,建议采用纳米孔靶向测序或宏基因组测序进行脑脊液检测。(证据等级:II a级;推荐等级:条件推荐)

中枢神经系统感染样本(如脑脊液)中的病原体载量通常极低且病原谱复杂(涵盖细菌、病毒、真菌、寄生虫),传统培养和脑膜炎/脑炎检测试剂盒覆盖范围有限。研究表明,纳米孔测序可作为传统培养阴性细菌性脑膜炎病例的重要补充检测手段,提高病原学诊断率<sup>[26]</sup>。一项针对中枢神经系

统感染开发的纳米孔靶向测序试剂盒能准确检测17种常见病原体,检测限低至100 CFU/mL,其检测结果与二代测序的宏基因组测序结果高度一致,同时报告周期缩短至8 h<sup>[27]</sup>。

### 2.1.4 新发突发疫情的现场检测

推荐意见4:在疫情地区、方舱医院或资源受限的现场,采用PCR对已知病原体进行诊断的同时,推荐使用基于纳米孔测序技术的移动检测平台对样本进行病原体筛查鉴定、初步溯源和谱系鉴定,为早期防控提供参考。(证据等级:II b级;推荐等级:强推荐)

在应对新发突发疫情时,检测时效性至关重要,而现场条件受限的场景是纳米孔测序技术最为适宜的应用场景之一。研究表明,利用纳米孔测序设备结合多重PCR扩增子测序,可在采样后8 h内获得近乎完整的汉坦病毒基因组序列<sup>[28]</sup>,为快速诊断和制定疫情防控决策提供依据。同时,对于低丰度、高致病性病原体或涉及重大治疗决策的变异位点/病原体,建议使用Sanger测序或qPCR等正交验证方法进行验证<sup>[29]</sup>。

针对SARS-CoV-2,纳米孔测序设备因便携、低成本及快速周转等特性,成为常规诊断的有效补充手段<sup>[30]</sup>。扩增子测序结合便携式纳米孔测序设备可在4 h内完成对流感病毒及冠状病毒(含SARS-CoV-2)的检测<sup>[31]</sup>,该方法适用于传染病流行地区的病原体现场监测。

研究表明,在预设场景演练中,纳米孔测序仪可以成功检出双盲样本中的所有目标病原体(包括炭疽杆菌、鼠疫耶尔森菌近缘种等),凸显了该技术在疫情现场应急响应中的价值;相较于其他建库方法,无PCR扩增的快速建库方法可使菌群相对丰度偏离程度降至最低<sup>[32]</sup>。因此,在病原体核酸载量高且背景核酸载量低的情况下,推荐采用非扩增建库测序流程。

### 2.2 耐药基因与质粒检测

耐药菌的快速识别对指导抗生素精准使用至关重要,短读长测序往往难以判断耐药基因在细菌内部的定位,也难以确定其宿主归属,而纳米孔测序的技术优势有助于解决这一问题。

#### 2.2.1 识别关键耐药基因

推荐意见5:临床微生物实验室在出具血培养阳性报告后,具备条件的单位可采用纳米孔靶向测序技

术进行快速复核,实现病原体精准鉴定,并同步预测关键耐药基因(如 *bla*<sub>KPC</sub>、*mecA*、*vanA*等)。(证据等级:Ⅲ级;推荐等级:弱推荐)

多项研究表明,对阳性血培养物直接进行纳米孔测序不仅能实现高效且准确的病原体物种鉴定,还可通过识别关键耐药基因预测病原体的耐药表型,与常规表型药敏试验结果的一致性可达90%以上<sup>[22,33]</sup>。

纳米孔测序可用于检测碳青霉烯酶基因(如 *bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>)、甲氧西林耐药基因(*mecA*)及万古霉素耐药基因(*vanA/B*)<sup>[34]</sup>。对于金黄色葡萄球菌,基于扩增子的纳米孔测序可在10 min内达到3 000×以上的测序深度,能够灵敏检测万古霉素中介金黄色葡萄球菌(*vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*)相关突变基因(如 *walK*、*graR*)<sup>[35]</sup>。

需注意,耐药基因存在与否不一定能够完全预测耐药表型,后者受基因表达、基因拷贝数和翻译后修饰影响<sup>[36]</sup>。开展耐药基因纳米孔测序检测前,建议就检测价值、局限性和费用等与患者或家属进行充分知情沟通。后续仍需积累充分的临床验证数据,以建立健全的耐药基因数据库并优化检测算法,进一步提高纳米孔测序技术的灵敏性和特异性。

对于某些抗生素(如哌拉西林-他唑巴坦)或铜绿假单胞菌耐药性的识别,目前仍存在一定的重大误差率(very major error;即将耐药误判为敏感的严重错误)<sup>[19]</sup>,建议结合药敏试验结果进行综合判断。

### 2.2.2 解析耐药质粒的完整结构及传播机制

推荐意见6:对于多重耐药菌,特别是碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌,可利用纳米孔测序解析耐药质粒的完整结构及传播机制。(证据等级:Ⅲ级;推荐等级:弱推荐)

纳米孔测序凭借长读长优势,可实现质粒序列的完整组装,清晰解析携带耐药基因的质粒图谱<sup>[37]</sup>。同时,纳米孔测序能够识别插入序列介导的基因转移机制(如IS6家族介导*optrA*基因传播),区分耐药性源于垂直传播(克隆扩增)或水平转移(质粒接合)<sup>[38]</sup>,结合传统药敏试验等所测的表型数据,对感染溯源判断及防控措施制定具有重要意义。

### 2.3 特殊病原体检测和变异株监测

推荐意见7:在结核病高负担地区或疑似耐药结核病例中,建议将纳米孔靶向测序作为疑似结核分枝杆菌感染样本的一线诊断工具之一,并持续优化技术流程以提升临床适用性。(证据等级:Ⅰa级;推荐等级:弱推荐)

对于缓慢生长(如分枝杆菌)、难以培养(如胞内菌)或生物安全风险高(如布鲁氏菌)的病原体,纳米孔测序技术提供了快速病原学确诊的新途径。

一项纳入32项研究的系统评价和meta分析表明,纳米孔测序在结核分枝杆菌鉴定及其耐药性诊断中综合性能优异,汇总灵敏度为88.61%(95%CI 83.81%~92.12%),特异度为93.18%(95%CI 85.32%~96.98%),AUC值达0.932,提示该技术在结核病及耐药性诊断中具有较高的准确性<sup>[39]</sup>。专门开发的纳米孔测序TBseq方案(靶向扩增结核分枝杆菌基因组特定区域),在829例患者中实现了90.9%的结核分枝杆菌检测灵敏度和93.0%的特异度,均优于传统培养方法和Xpert MTB/RIF Ultra(超敏结核分枝杆菌及利福平耐药基因检测),还可同步实现7种一线及二线抗结核药物的耐药性检测,单样本测序成本约为400元,全流程检测周转周期缩短至16 h<sup>[40]</sup>。对于条件有限的实验室,可将重组酶聚合酶等温扩增技术与纳米孔测序平台整合<sup>[41]</sup>,构建便携式分子诊断体系,从而在资源受限环境下实现病原体的快速筛查和鉴定。

在加纳等疟疾流行区,纳米孔测序监测平台由于适用于干血斑样本检测,能够有效追踪环孢子蛋白(circumsporozoite protein, *csp*)基因多样性及抗疟药耐药标记<sup>[42]</sup>,为疫苗效果评估提供本地化数据支撑。

针对不明原因发热或有蚊虫叮咬史的患者,纳米孔宏基因组测序能检出PCR易漏检的新发或罕见病毒。研究表明,相较于传统靶向PCR,纳米孔宏基因组测序能更全面地揭示样本中的病毒群落(virome),成功检出克里米亚-刚果出血热病毒和荆门痹病毒等高致病性病毒,并提供全基因组序列用于系统发育分析,提示其可能成为新发虫媒传染病早期预警的重要技术手段之一<sup>[43]</sup>。

### 3 精准诊断

#### 3.1 甲基化修饰检测

推荐意见 8: 对于基因组印记病或肿瘤早筛样本的液体活检, 纳米孔原生 DNA/RNA 测序可作为甲基化修饰检测的有效替代或补充方案。(证据等级: II b 级; 推荐等级: 条件推荐)

亚硫酸氢盐测序 (bisulfite sequencing) 被认为是甲基化修饰检测的金标准, 但其需要采用强化学试剂处理, 易导致 DNA 严重降解, 难以获取完整长片段信息<sup>[44]</sup>。

纳米孔原生 DNA/RNA 测序是指在不经 PCR 扩增和化学标记的情况下测定天然 DNA/RNA 分子。目前研究人员正在探索将纳米孔测序技术应用于基因组印记病 (如 Temple 综合征) 及结直肠癌、头颈癌等肿瘤的检测和精准诊断<sup>[45-46]</sup>。采用纳米孔原生 DNA/RNA 测序无需亚硫酸氢盐处理, 可直接检测甲基化修饰<sup>[47-48]</sup>。纳米孔测序在甲基化图谱上与亚硫酸氢盐测序结果高度一致, 尤其在 CpG 岛和启动子区域表现突出<sup>[49]</sup>; 然而, 鉴于肿瘤早筛 (尤其是液体活检) 对低丰度肿瘤信号具有高灵敏度要求, 纳米孔测序结果在这一场景下的应用仍需审慎评估。尽管纳米孔技术具备检测成本低于传统方法、DNA 起始需求量低 (部分研究中仅需  $\geq 25$  ng 的福尔马林固定石蜡包埋样本, 或低至  $0.1 \times$  测序深度的全基因组甲基化修饰检测即可完成分析<sup>[50-51]</sup>) 等优势, 但如何在大规模背景噪声中稳定检出微量致病信号, 仍是其实现临床转化前亟待解决的关键挑战。

3.2 复杂结构变异检测 人类基因组中存在大量重复序列和复杂结构变异, 二代测序因读长短难以跨越此类区域, 常导致大片段结构变异漏检或组装错误。纳米孔测序可有效检测二代测序难以覆盖的复杂基因组变异和表观遗传修饰, 为肿瘤精准医疗和罕见病诊断提供了新手段。

纳米孔全基因组测序为临床提供了检测复杂结构变异的新手段。与核型分析、荧光原位杂交、染色体微阵列分析和二代全外显子组测序相比, 纳米孔测序能够跨越重复区域和复杂断裂点, 直接捕捉倒位、易位、大片段缺失等复杂结构变异的完整结构<sup>[52-53]</sup>。临床样本验证结果显示, 采用低测序深度 ( $4 \sim 8 \times$ ) 纳米孔全基因组测序可提高复杂结构变

异的检出率, 例如在已知的复杂不平衡结构变异中, 纳米孔测序可检测出 83% (5/6) 的变异, 而常规核型或短读长测序常遗漏这些变异; 在 1:100 稀释的样本中, 其也能稳定检出倒位、易位等结构变异, 提示纳米孔测序在低丰度变异检测中具有优势<sup>[54]</sup>。

3.3 其他疾病精准诊断相关应用 短串联重复序列 (short tandem repeat) 是由 2~6 个碱基对作为核心单位重复排列而成的序列, 与神经退行性疾病 (如脊髓小脑共济失调和脆性 X 综合征) 之间存在较强的致病关联。二代测序在检测常规短片段的短串联重复序列方面表现优异, 而纳米孔测序能够直接获取长片段的短串联重复序列区域<sup>[55]</sup>, 避免 PCR 扩增偏好性, 并通过专用算法从原始信号中精确计算重复次数, 且其准确性与 DNA 印迹法相当甚至更高, 尤其在检测大片段扩展突变时更具可靠性<sup>[56-58]</sup>。在操作层面, 纳米孔测序简化了工作流程, 无需片段分离、杂交或毛细管电泳等烦琐步骤, 实现了从样本到结果的单步检测, 从而降低了实验复杂度与时间成本<sup>[59]</sup>。

目前, 常规遗传检测对疑似单基因疾病的诊断率低于 50%<sup>[60]</sup>, 主要受限于既往测序技术对结构变异、重复序列扩增的表观遗传改变等的识别能力不足。多项研究表明, 纳米孔测序可为约 1/4 的未确诊遗传病患者找到明确病因<sup>[61-63]</sup>。一项香港基因组计划前瞻性研究中, 在二代测序已获得 24% (125/520) 明确诊断的基础上, 引入纳米孔测序可使确诊率提升 4% (21/520)<sup>[64]</sup>。这些研究表明, 纳米孔测序有望为遗传病的精准诊断与产前检测提供新的技术手段。

### 4 实验室、平台和操作规范

#### 4.1 实验室和现场检测条件要求

推荐意见 9: 开展纳米孔测序的实验室应符合生物安全通用要求, 至少应包括试剂准备区、样本制备区、文库制备区及测序区, 防止交叉污染。针对野外、现场等即时测序场景, 应制定相应的移动平台建设标准。(证据等级: Ia 级; 推荐等级: 强推荐)

规范的实验室分区 (试剂准备、样本制备、扩增/测序) 是防止气溶胶污染、确保检测特异性的基础, 特别是对于基于 PCR 扩增的纳米孔测序流程, 极微量的扩增产物污染即可能导致假阳性结果。依据《医疗机构临床基因扩增检验实验室管

理办法》<sup>[65]</sup>及《实验室生物安全通用要求:GB 19489—2008》<sup>[66]</sup>,物理隔离和单向气流是标准配置,用于现场检测的移动实验室应额外满足环境适应性和稳定性要求。

当条件受限时,若实验流程涉及不可避免的开盖操作,必须充分评估生物安全风险。为提升操作的一致性与防污染能力,建议采用封闭式全自动工作站,将连续、复杂的步骤整合到自动化平台上,这不仅能大幅降低人为误差,还能通过物理封闭最大程度隔绝气溶胶污染,从而确保实验结果可靠性和生物安全性。针对野外、现场等即时测序场景,应建立相应的移动平台建设标准,如配置一体化、封闭式的卡匣式工作站,并制定相应的环境监控与应急处理方案,以实现全程污染可控检测。

#### 4.2 核酸提取与文库构建

推荐意见 10: 对于拟开展纳米孔测序的样本,建议采用温和的核酸提取方法以保留长片段 DNA。针对复杂临床样本(如 BALF、福尔马林固定石蜡包埋样本),应优化提取工艺以去除杂质。文库构建时,应根据应用场景选择合适的建库试剂盒(如无 PCR 扩增建库或扩增子建库),并严格控制连接效率和文库浓度。(证据等级: Ib 级;推荐等级: 强推荐)

样本质量直接决定测序读长和数据产出,核酸提取后的样本应在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  或  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温条件下、按照平台要求的时限保存,以确保核酸完整性与稳定性。最大程度保留完整核酸分子是实现长读长测序的先决条件。

研究表明,采用温和的核酸提取方式(如磁珠法并避免剧烈涡旋)可显著提高 N50 值,从而提高结构变异检测灵敏度和基因组组装连续性<sup>[5]</sup>。然而,不同微生物类别的核酸释放效率差异显著,真菌和分枝杆菌等细胞壁坚韧的菌株需要进行特异性破壁处理。因此,对疑似真菌或分枝杆菌感染的样本应增加必要的预处理步骤,以优化破壁效率并加强核酸分子保护<sup>[67]</sup>。

对于复杂临床样本,残留的污染物(如多糖、蛋白质)会阻塞纳米孔,降低测序产量,因此需进行纯化处理。无 PCR 扩增建库方法能保留核酸分子的修饰信息且无扩增偏好,适用于表观遗传学研究;而扩增子建库则适用于低载量病原体检测<sup>[68]</sup>。推荐意见 11: 在文库制备过程中,每个批次必须包

含空白对照、阳性外部对照和阴性外部对照,以监控试剂污染及环境微生物干扰。(证据等级: Ia 级;推荐等级: 强推荐)

高通量测序尤其是宏基因组测序具有较高的灵敏度,但容易因“试剂组”(kitome)或环境背景微生物 DNA 污染而出现假阳性结果。设置阴性对照(无模板对照)可以识别并去除背景噪声,对于低生物量样本(如脑脊液)的检测尤为关键<sup>[69]</sup>。设置阳性对照(已知浓度的标准菌株或模拟样本)则用于监控核酸提取效率、文库构建成功率及测序过程稳定性,确保检测系统的性能达标<sup>[70]</sup>。

#### 4.3 数据分析与报告

推荐意见 12: 数据分析应采用经过验证的标准化流程;针对纳米孔测序技术的特点,应使用专门的碱基识别算法和比对工具;报告生成应结合测序深度、覆盖度、Q 值及临床背景进行综合解读;对于检出的致病变异或病原体,必要时应通过正交验证方法(如 Sanger 测序、qPCR)进行验证。(证据等级: Ib 级;推荐等级: 强推荐)

4.3.1 纳米孔测序相关数据库构建 目前,适配纳米孔测序的参考资源体系已日趋成熟,形成以美国国家生物技术信息中心 RefSeq、中国国家生物信息中心-国家基因组科学数据中心为核心的综合数据基座,并整合了 FDA-ARGOS、SILVA、CARD 等高质量专用数据库及 EPI2ME、Galaxy 等集成化云端分析平台<sup>[71]</sup>。然而,现有资源仍存在数据库适配性不足、关键病原数据缺失、物种分类注释偏差及数据隐私标准不统一等瓶颈<sup>[72]</sup>。为了充分发挥纳米孔测序即时检测和现场测序的优势,亟须构建以高质量参考基因组数据库为核心、融合多维数据与标准化云端流程的分析体系,通过版本化管理与本地化软件开发,实现病原体的快速检出与功能注释,以满足临床与现场应用需求<sup>[71]</sup>。

4.3.2 序列分析 纳米孔测序数据具有特有的误差模式(如同聚物误差和插入缺失偏差),传统二代测序的生物信息学分析工具难以完全适用。minimap2 是目前长读长基因组 DNA 序列比对的公认金标准工具<sup>[73-74]</sup>,RNA 测序则推荐使用基因组映射与比对程序(Genomic Mapping and Alignment Program, GMAP)<sup>[75]</sup>,两者能有效处理长序列中的错误和剪接位点。随着 Guppy、Dorado 等碱基识别算法的迭代,纳米孔测序的准确率已显著提

升,但临床报告仍需设置严格的质控阈值(如 $Q$ 值、序列覆盖度)。由于测序可能出现假阳性结果,对耐药基因、罕见突变等影响临床决策的关键变异,有必要采用 Sanger 测序或 qPCR 进行正交验证以保障医疗安全<sup>[76]</sup>。

**4.3.3 质量控制措施** 纳米孔测序虽具备长读长优势,但仍存在特定的系统性误差(如部分平台的同聚物测序噪声),亟须建立区分场景的精细化质控标准。

针对单核苷酸变异/插入缺失进行检测时,需重点监控碱基质量(base quality)及同聚物区域的读段一致性,并设置严格的最小支持读段数与链偏向阈值,避免测序结果错误;针对结构变异/单核苷酸变异进行检测时,质控重点应聚焦于断点的跨越读段证据与局部覆盖度的一致性,据此确立可操作的样本放行标准<sup>[77]</sup>。此外,建议在生物信息分析流程中强化位点过滤策略,并综合利用变异丰度、比对质量<sup>[78]</sup>,同时构建基于健康人群的正常样本库作为背景噪声模型<sup>[79]</sup>,从而在大规模候选变异中精准识别并剔除批次特异性或平台系统性的假阳性,确保临床报告的准确性与可靠性。

**4.3.4 数据安全性和隐私保护** 人类样本测序数据,尤其是长读长基因组数据,具有高度个体识别性,建议构建全流程的隐私保护与伦理合规体系。在采集端应确立知情同意的核心地位,确保受试者对数据用途充分知情;存储与传输端须严格遵循数据本地化与跨境传输安全评估要求;使用端厘清科研与商业利用的法律边界,切实维护个人隐私权益<sup>[80-81]</sup>。

#### 4.4 性能确认

推荐意见 13: 实验室在开展临床检测前,必须对测序平台进行全面确认(包括生物信息分析平台、分析性能和临床性能),包括但不限于准确性、重复性、灵敏度(检测限)、特异度和抗干扰能力等。(证据等级: Ia 级;推荐等级: 强推荐)

根据《临床实验室改进修正案》(*Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA*)和美国病理学家学会(College of American Pathologists, CAP)制定的临床实验室质量管理国际认证体系,以及中国《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识》<sup>[82]</sup>等相关规范,所有实验室自建项目在临床应用前必须经过严格的方法学性能确

认。使用公认标准参考物质(如 NA12878<sup>[83-84]</sup>)进行定期校准,可客观评估测序平台系统误差,监控测序仪状态随时间的变化,确保不同批次检测结果的一致性和可比性<sup>[85]</sup>。若出现系统误差、质控偏移、不明原因污染或数据失真等问题,应立即进行校正。同时应推动建立适用于纳米孔测序平台的室内质控与室间质评标准,鼓励实验室定期参与权威机构组织的室内质控或室间质评,保证对实验室检测性能的持续监测与验证。

## 5 总结和展望

本共识系统梳理了纳米孔测序技术在病原快速检测、耐药分析、精准诊断及规范化操作等领域的最新证据与专家意见,明确了其在急危重症感染诊断、新发突发疫情现场检测、复杂基因组变异解析等场景下的应用价值与推荐等级。本共识的制定旨在为临床实践、实验室建设与技术转化提供基于循证医学的专业指引,推动该技术的规范化与合理化应用。同时,本共识基于当前(截至 2025 年 10 月)的临床证据与技术发展水平,部分推荐意见可能随着新技术、新研究的涌现而需要动态更新,在实际应用中需结合具体临床情境、资源可及性与技术迭代情况审慎决策。

纳米孔测序技术的创新发展将依托多学科交叉创新,逐步突破精度、通量与稳定性之间的“不可能三角”,实现从“可用”到“精准高效”的跨越。未来在孔道工程领域,将持续优化纳米孔蛋白结构,并设计新型蛋白-固态复合孔,以平衡稳定性与信号分辨率,同时开发抗污染涂层和孔道阻塞自动清除技术。集成化传感系统将向多模态、传感与信号处理一体化方向发展。在算法与人工智能驱动方面,将利用深度学习直接从原始信号中完成序列和表观修饰预测,减少中间环节误差,同时开发轻量级算法以适配便携设备的边缘计算需求。此外,通过微流控芯片集成实现样本处理自动化,可达成“样本进-结果出”的全自动测序流程。通过在多个核心瓶颈上取得实质性突破,纳米孔测序设备将实现更高的集成度、自动化与智能化水平,显著降低设备对使用环境与专业操作的依赖,推动安全、快速、精准的测序能力向现场、基层乃至资源有限地区延伸,真正实现全场景即时检测与分析。

## 编写专家委员会成员

顾问组:王红阳(海军军医大学国家肝癌科学中心)、贾伟平(上海交通大学医学院)、王健伟(中国疾病预防控制中心)

专家组(按姓氏笔画顺序排列):王辉(北京大学人民医院)、王升启(军事科学院军事医学研究院)、文文(海军军医大学第三附属医院)、白净卫(清华大学药学院)、刘家云(空军军医大学第一附属医院)、刘善荣(海军军医大学第一附属医院)、杜鲁涛(山东大学第二医院)、李鹏(中国人民解放军疾病预防控制中心)、肖传乐(中山大学中山眼科中心)、应斌武(四川大学华西医院)、汪德鹏(复旦大学生命科学学院基因技术教育部工程研究中心)、宋宏彬(中国人民解放军疾病预防控制中心)、张晓鹏(军事科学院军事医学研究院)、陈鸣(陆军军医大学第一附属医院)、周洲(中国医学科学院阜外医院)、周宏伟(南方医科大学深圳医院)、赵翔(中国疾病预防控制中心)、顾兵(广东省人民医院检验科)、黄亿华(中国科学院生物物理研究所)

秘书组:曹琦琪(海军军医大学第三附属医院)、王阳芷(中国科学院生物物理所)、黄威翰(海军军医大学第三附属医院)

## [参考文献]

- [1] WANG Y, ZHAO Y, BOLLAS A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications[J]. Nat Biotechnol, 2021, 39(11): 1348-1365. DOI: 10.1038/s41587-021-01108-x.
- [2] CHEN P, SUN Z, WANG J, et al. Portable nanopore-sequencing technology: trends in development and applications[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1043967. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1043967.
- [3] LAU B T, ALMEDA A, SCHAUER M, et al. Single-molecule methylation profiles of cell-free DNA in cancer with nanopore sequencing[J]. Genome Med, 2023, 15(1): 33. DOI: 10.1186/s13073-023-01178-3.
- [4] TOUNSI W A, LENIS V P, TAMMI S M, et al. Rh blood group D antigen genotyping using a portable nanopore-based sequencing device: proof of principle[J]. Clin Chem, 2022, 68(9): 1196-1201. DOI: 10.1093/clinchem/hvac075.
- [5] JAIN M, KOREN S, MIGA K H, et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(4): 338-345. DOI: 10.1038/nbt.4060.
- [6] 郑皓, 陈小萍, 卢金星. 血流感染病原体分子检测技术研究进展[J]. 疾病监测, 2020, 35(11): 1047-1054. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2020.11.018.
- [7] GLINOS D A, GARBORCAUSKAS G, HOFFMAN P, et al. Transcriptome variation in human tissues revealed by long-read sequencing[J]. Nature, 2022, 608(7922): 353-359. DOI: 10.1038/s41586-022-05035-y.
- [8] OGUNLEYE A O, GHOSH P, GUEYE A B, et al. Nanopore sequencing-driven mapping of antimicrobial resistance genes in selected *Escherichia coli* isolates from pigs and poultry layers in Nigeria[J]. Antibiotics (Basel), 2025, 14(8): 827. DOI: 10.3390/antibiotics14080827.
- [9] KUMAR A, ROBERTS D, WOOD K E, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock[J]. Crit Care Med, 2006, 34(6): 1589-1596. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.
- [10] WU N, RANJAN P, TAO C, et al. Rapid identification of pathogens associated with ventilator-associated pneumonia by nanopore sequencing[J]. Respir Res, 2021, 22(1): 310. DOI: 10.1186/s12931-021-01909-3.
- [11] CHENG L P, WANG L, WANG Y F, et al. Nanopore-targeted sequencing: a new and effective technique for the diagnosis of non-tuberculous mycobacteria pulmonary disease[J]. Int J Med Microbiol, 2025, 320: 151663. DOI: 10.1016/j.ijmm.2025.151663.
- [12] POVOA P, COELHO L, CARRATALA J, et al. How to approach a patient hospitalized for pneumonia who is not responding to treatment? [J]. Intensive Care Med, 2025, 51(5): 893-903. DOI: 10.1007/s00134-025-07903-3.
- [13] GUO Y, LI Z, LI L, et al. A dual-process of targeted and unbiased nanopore sequencing enables accurate and rapid diagnosis of lower respiratory infections[J]. EBioMedicine, 2023, 98: 104858. DOI: 10.1016/j.ebiom.2023.104858.
- [14] BRINKMANN A, UDDIN S, ULM S L, et al. RespiCoV: simultaneous identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and 46 respiratory tract viruses and bacteria by amplicon-based Oxford-nanopore MinION sequencing[J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0264855. DOI: 10.1371/journal.pone.0264855.
- [15] WANG M, FU A, HU B, et al. Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses[J]. Small, 2020, 16(32): 2002169. DOI: 10.1002/sml.202002169.
- [16] ZHANG J, GAO L, ZHU C, et al. Clinical value of metagenomic next-generation sequencing by Illumina and nanopore for the detection of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid in suspected community-acquired pneumonia patients[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1021320. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1021320.
- [17] TAXT A M, AVERSHINA E, FRYE S A, et al. Rapid identification of pathogens, antibiotic resistance genes and plasmids in blood cultures by nanopore sequencing[J]. Sci Rep, 2020, 10: 7622. DOI: 10.1038/s41598-020-64616-x.

- [18] WANG K, LI P, LIN Y, et al. Metagenomic diagnosis for a culture-negative sample from a patient with severe pneumonia by nanopore and next-generation sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 182. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00182.
- [19] HARRIS P N A, BAUER M J, LÜFTINGER L, et al. Rapid nanopore sequencing and predictive susceptibility testing of positive blood cultures from intensive care patients with sepsis[J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12(2): e0306523. DOI: 10.1128/spectrum.03065-23.
- [20] HAN D, YU F, ZHANG D, et al. Molecular rapid diagnostic testing for bloodstream infections: nanopore targeted sequencing with pathogen-specific primers[J]. *J Infect*, 2024, 88(6): 106166. DOI: 10.1016/j.jinf.2024.106166.
- [21] LIU P Y, WU H C, LI Y L, et al. Comprehensive pathogen identification and antimicrobial resistance prediction from positive blood cultures using nanopore sequencing technology[J]. *Genome Med*, 2024, 16(1): 141. DOI: 10.1186/s13073-024-01416-2.
- [22] LIU Y, XU Y, XU X, et al. Metagenomic identification of pathogens and antimicrobial-resistant genes in bacterial positive blood cultures by nanopore sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1283094. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1283094.
- [23] NIELSEN M E, SØGAARD K K, KARST S M, et al. Application of rapid nanopore metagenomic cell-free DNA sequencing to diagnose bloodstream infections: a prospective observational study[J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13(5): e0329524. DOI: 10.1128/spectrum.03295-24.
- [24] JI Y, GU J, XIAO S, et al. Prognostic value of Nanopore sequencing-based metagenomics next-generation sequencing in clinical infectious cases: a retrospective observational study[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2026, 114(1): 117092. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2025.117092.
- [25] ZHAO M, OUYANG Y, MEI J, et al. Enhancing pathogens detection in suspected geriatric bloodstream infections using Nanopore-targeted sequencing[J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13(1): e0155424. DOI: 10.1128/spectrum.01554-24.
- [26] VAN DONG D, LINH L T K, NGA N T T, et al. Evaluating the diagnostic utility of 16S Oxford nanopore technology sequencing in patients with central nervous system infections and its usefulness in antimicrobial stewardship[J]. *J Infect Dis*, 2025, 232(2): e309-e317. DOI: 10.1093/infdis/jiaf280.
- [27] SHI Y, LIN Z, CHEN Z, et al. High-throughput and efficient assay for central nervous system infection with targeted nanopore sequencing technology[J]. *Infect Drug Resist*, 2025, 18: 5461-5471. DOI: 10.2147/IDR.S540638.
- [28] PARK K, LEE S H, KIM J, et al. Multiplex PCR-based nanopore sequencing and epidemiological surveillance of *Hantaan orthohantavirus* in *Apodemus agrarius*, republic of Korea[J]. *Viruses*, 2021, 13(5): 847. DOI: 10.3390/v13050847.
- [29] MA L, ZHU C, YAN T, et al. Illumina and nanopore sequencing in culture-negative samples from suspected lower respiratory tract infection patients[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1230650. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1230650.
- [30] BULL R A, ADIKARI T N, FERGUSON J M, et al. Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6272. DOI: 10.1038/s41467-020-20075-6.
- [31] MEKI I K, AHN K B, DUNDON W G, et al. Novel multiplex family-wide PCR and nanopore sequencing of amplicons (FP-NSA) approach for surveillance of influenza- and coronaviruses in humans and animals[J]. *Genome Med*, 2025, 17(1): 123. DOI: 10.1186/s13073-025-01550-5.
- [32] TYLER A D, MCALLISTER J, STAPLETON H, et al. Field-based detection of bacteria using nanopore sequencing: method evaluation for biothreat detection in complex samples[J]. *PLoS One*, 2023, 18(11): e0295028. DOI: 10.1371/journal.pone.0295028.
- [33] SERPA P H, DENG X, ABDELGHANY M, et al. Metagenomic prediction of antimicrobial resistance in critically ill patients with lower respiratory tract infections[J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 74. DOI: 10.1186/s13073-022-01072-4.
- [34] QIAO J, GE H, XU H, et al. Detection of IMP-4 and SFO-1 co-producing ST51 *Enterobacter hormaechei* clinical isolates[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 998578. DOI: 10.3389/fcimb.2022.998578.
- [35] MOLLER A G, PETIT R A 3<sup>rd</sup>, DAVIS M H, et al. Development of an amplicon nanopore sequencing strategy for detection of mutations conferring intermediate resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* strains[J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(1): e0272822. DOI: 10.1128/spectrum.02728-22.
- [36] FORDE B M, DE OLIVEIRA D M P, FALCONER C, et al. Strengths and caveats of identifying resistance genes from whole genome sequencing data[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2022, 20(4): 533-547. DOI: 10.1080/14787210.2022.2013806.
- [37] TURTON J F, PIKE R, PERRY C, et al. Wide distribution of *Escherichia coli* carrying IncF plasmids containing *bla*<sub>NDM-5</sub> and *rmtB* resistance genes from hospitalized patients in England[J]. *J Med Microbiol*, 2022, 71(8): 001569. DOI: 10.1099/jmm.0.001569.
- [38] LIU S, YANG X, LI R, et al. IS6 family insertion sequences promote *optrA* dissemination between plasmids varying in transfer abilities[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, 108(1): 132. DOI: 10.1007/s00253-023-12858-w.

- [39] CARANDANG T H D C, CUNANAN D J, CO G S, et al. Diagnostic accuracy of nanopore sequencing for detecting *Mycobacterium tuberculosis* and drug-resistant strains: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 11626. DOI: 10.1038/s41598-025-90089-x.
- [40] YU S, LIU N, XIE Z, et al. Nanopore sequencing for precise detection of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance: a retrospective multicenter study in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2025, 63(4): e0181324. DOI: 10.1128/jcm.01813-24.
- [41] GLIDDON H D, FRAMPTON D, MUNSAMY V, et al. A rapid drug resistance genotyping workflow for *Mycobacterium tuberculosis*, using targeted isothermal amplification and nanopore sequencing[J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(3): e0061021. DOI: 10.1128/Spectrum.00610-21.
- [42] GIRGIS S T, ADIKA E, NENYEWODEY F E, et al. Drug resistance and vaccine target surveillance of *Plasmodium falciparum* using nanopore sequencing in Ghana[J]. *Nat Microbiol*, 2023, 8(12): 2365-2377. DOI: 10.1038/s41564-023-01516-6.
- [43] ERGUNAY K, DINCER E, JUSTI S A, et al. Impact of nanopore-based metagenome sequencing on tick-borne virus detection[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1177651. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1177651.
- [44] LIU Y, ROSIKIEWICZ W, PAN Z, et al. DNA methylation-calling tools for Oxford nanopore sequencing: a survey and human epigenome-wide evaluation[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 295. DOI: 10.1186/s13059-021-02510-z.
- [45] KATSMAN E, ORLANSKI S, MARTIGNANO F, et al. Detecting cell-of-origin and cancer-specific methylation features of cell-free DNA from nanopore sequencing[J]. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 158. DOI: 10.1186/s13059-022-02710-1.
- [46] CARVALHO C M B, COBAN-AKDEMIR Z, HIJAZI H, et al. Interchromosomal template-switching as a novel molecular mechanism for imprinting perturbations associated with Temple syndrome[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 25. DOI: 10.1186/s13073-019-0633-y.
- [47] ZHANG J, XIE S, XU J, et al. Cancer biomarkers discovery of methylation modification with direct high-throughput nanopore sequencing[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 672804. DOI: 10.3389/fgene.2021.672804.
- [48] GILPATRICK T, LEE I, GRAHAM J E, et al. Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4): 433-438. DOI: 10.1038/s41587-020-0407-5.
- [49] DOSHI R, KINNEAR E, CHATTERJEE S, et al. Reliable investigation of DNA methylation using Oxford nanopore technologies[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 15900. DOI: 10.1038/s41598-025-99882-0.
- [50] FEINBERG-GORENSHTEIN G, GRUNWALD A, VERMEULEN C, et al. Brain tumor classification from FFPE samples using nanopore methylation sequencing[J]. *NAR Cancer*, 2025, 7(4): zcaf038. DOI: 10.1093/narcan/zcaf038.
- [51] EUSKIRCHEN P, BIELLE F, LABRECHE K, et al. Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(5): 691-703. DOI: 10.1007/s00401-017-1743-5.
- [52] ROMAGNOLI S, BARTALUCCI N, VANNUCCHI A M. Resolving complex structural variants via nanopore sequencing[J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1213917. DOI: 10.3389/fgene.2023.1213917.
- [53] 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: 1326. DOI: 10.1038/s41467-017-01343-4.
- [54] LEUNG H C M, YU H, ZHANG Y, et al. Detecting structural variations with precise breakpoints using low-depth WGS data from a single Oxford nanopore MinION flowcell[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4519. DOI: 10.1038/s41598-022-08576-4.
- [55] DE BOER E N, SCHEPER A J, HENDRIKSEN D, et al. Nanopore long-read sequencing as a first-tier diagnostic test to detect repeat expansions in neurological disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(7): 2850. DOI: 10.3390/ijms26072850.
- [56] SITARČÍK J, VINAŘ T, BREJOVÁ B, et al. WarpSTR: determining tandem repeat lengths using raw nanopore signals[J]. *Bioinformatics*, 2023, 39(6): btad388. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad388.
- [57] FANG L, LIU Q, MONTEYS A M, et al. DeepRepeat: direct quantification of short tandem repeats on signal data from nanopore sequencing[J]. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 108. DOI: 10.1186/s13059-022-02670-6.
- [58] GIESSELMANN P, BRÄNDL B, RAIMONDEAU E, et al. Analysis of short tandem repeat expansions and their methylation state with nanopore sequencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(12): 1478-1481. DOI: 10.1038/s41587-019-0293-x.
- [59] MIURA G. Counting short tandem repeats[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(1): 31. DOI: 10.1038/s41592-019-0724-0.
- [60] ALFARES A, ALORAINI T, SUBAIE L A, et al. Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing[J]. *Genet Med*, 2018, 20(11): 1328-1333. DOI: 10.1038/gim.2018.41.
- [61] SINHA S, RABEA F, RAMASWAMY S, et al. Long read sequencing enhances pathogenic and novel variation discovery in patients with rare diseases[J]. *Nat*

- Commun, 2025, 16: 2500. DOI: 10.1038/s41467-025-57695-9.
- [62] RUDAKS L I, STEVANOVSKI I, YEOW D, et al. Targeted long-read sequencing as a single assay improves the diagnosis of spastic-ataxia disorders[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2025, 12(4): 832-841. DOI: 10.1002/acn3.70008.
- [63] NEGI S, STENTON S L, BERGER S I, et al. Advancing long-read nanopore genome assembly and accurate variant calling for rare disease detection[J]. *Am J Hum Genet*, 2025, 112(2): 428-449. DOI: 10.1016/j.ajhg.2025.01.002.
- [64] LAM W K J, LAU C S, LUK H M, et al. The implementation of genome sequencing in rare genetic diseases diagnosis: a pilot study from the Hong Kong Genome Project[J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2025, 55: 101473. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2025.101473.
- [65] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法: 卫办医政发[2010]194号[EB/OL]. (2010-12-06) [2025-12-23]. <https://www.nhc.gov.cn/zwzgzl/pyzgl/201012/49981.shtml>.
- [66] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室 生物安全通用要求: GB 19489—2008[S/OL]. (2008-12-26) [2025-12-23]. <http://c.gb688.cn/bzgk/gb/showGb?type=online&hcno=EB3B94B543F6E4CD18C044DE6AB64CEC>.
- [67] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会. 靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2024, 104(48): 4375-4383. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20240927-02208.
- [68] TYLER A D, MATASEJE L, URFANO C J, et al. Evaluation of Oxford nanopore's MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10931. DOI: 10.1038/s41598-018-29334-5.
- [69] EISENHOFER R, MINICH J J, MAROTZ C, et al. Contamination in low microbial biomass microbiome studies: issues and recommendations[J]. *Trends Microbiol*, 2019, 27(2): 105-117. DOI: 10.1016/j.tim.2018.11.003.
- [70] 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.
- [71] 李文正, 张宁, 李卓越, 等. 纳米孔测序数据比对分析方法与参考数据库研究进展[J]. *生物工程学报*, 2026, 42(1): 77-92. DOI: 10.13345/j.cjb.250554.
- [72] CHORLTON S D. Ten common issues with reference sequence databases and how to mitigate them[J]. *Front Bioinform*, 2024, 4: 1278228. DOI: 10.3389/fbinf.2024.1278228.
- [73] LI H. New strategies to improve minimap2 alignment accuracy[J]. *Bioinformatics*, 2021, 37(23): 4572-4574. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab705.
- [74] LI H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(18): 3094-3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty191.
- [75] WU T D, WATANABE C K. GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 1859-1875. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti310.
- [76] GU W, MILLER S, CHIU C Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319-338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
- [77] LAPIERRE N, EGAN R, WANG W, et al. *De novo* nanopore read quality improvement using deep learning[J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(1): 552. DOI: 10.1186/s12859-019-3103-z.
- [78] WANG Z, TU M J, LIU Z, et al. A reference-guided iterative approach to polish the nanopore sequencing basecalling for therapeutic RNA quality control[J]. *Commun Biol*, 2025, 8(1): 1406. DOI: 10.1038/s42003-025-08811-4.
- [79] SCHIMMICH C, GONDARD M, CAIGNARD G, et al. Host-pathogen protein interaction studies: quality control of cDNA libraries using nanopore sequencing[J]. *PLoS One*, 2025, 20(5): e0324917. DOI: 10.1371/journal.pone.0324917.
- [80] 石玉如, 戚应杰, 马筱玲. 病原体宏基因组测序本地化检测中存在的问题与解决方案[J]. *临床检验杂志*, 2025, 43(9): 641-644. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2025.09.01.
- [81] 霍柯言, 赵希, 张来玮. 传染病基因组测序研究中的隐私与数据保护[J]. *中国病原生物学杂志*, 2025, 20(8): 1105-1108. DOI: 10.13350/j.cjpb.250828.
- [82] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会, 中国肿瘤驱动基因分析联盟. 二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(26): 2057-2065. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.26.001.
- [83] HOSSEINI M, PALMER A, MANKA W, et al. Deep statistical modelling of nanopore sequencing translocation times reveals latent non-B DNA structures[J]. *Bioinformatics*, 2023, 39(39 Suppl 1): i242-i251. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad220.
- [84] BOWDEN R, DAVIES R W, HEGER A, et al. Sequencing of human genomes with nanopore technology[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1869. DOI: 10.1038/s41467-019-09637-5.
- [85] ZOOK J M, CATOE D, MCDANIEL J, et al. Extensive sequencing of seven human genomes to characterize benchmark reference materials[J]. *Sci Data*, 2016, 3: 160025. DOI: 10.1038/sdata.2016.25.