

纳米孔测序在肿瘤并发感染中的应用

刘 熙, 刘 馨, 蔡静静, 杜亚茜, 李鸿生, 周永春
(昆明医科大学第三附属医院分子诊断中心, 云南 昆明 650118)

[摘要] **目的** 评估纳米孔测序在肿瘤患者并发感染性疾病中的临床应用价值, 为肿瘤患者感染性疾病的快速、灵敏诊断提供新的检测方法。**方法** 收集 2022 年 7 月至 8 月云南省肿瘤医院 36 例疑似感染的肿瘤患者样本 46 份, 利用纳米孔测序鉴定样本中的病原微生物。**结果** 纳米孔测序细菌检出率 72.22%, 真菌检出率 31.48%, 病毒检出率 42.59%。细菌和真菌检出率均较微生物培养法(23.91% 和 10.87%)明显升高($\chi^2 = 23.19$, $P < 0.0001$; $\chi^2 = 13.14$, $P = 0.0003$)。纳米孔测序结果与微生物培养结果比较, 检出的细菌和真菌种属明显增多。**结论** 纳米孔测序鉴定病原微生物具有检出率高, 检测病原菌种属广, 诊断快速的优势, 在肿瘤并发感染性疾病的诊断中具有潜在的临床应用价值。

[关键词] 纳米孔测序; 肿瘤; 感染; 病原微生物; 微生物培养

[中图分类号] R44 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2023)07-0009-07

Application of Nanopore Sequencing in Tumor with Infection

LIU Xi, LIU Xin, CAI Jingjing, DU Yaxi, LI Hongsheng, ZHOU Yongchun
(The Molecular Diagnosis Center, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical application value of nanopore sequencing in tumor patients with concurrent infectious diseases and to provide a new detection method for rapid and sensitive diagnosis of infectious diseases in tumor patients. **Methods** Samples of inpatients with suspected infections from July to August 2022 at Yunnan Cancer Hospital were collected, and pathogenic microorganisms in the samples were identified using nanopore sequencing. **Results** Forty-six samples from 36 patients with suspected infection were collected. Nanopore sequencing detected 72.22% of bacteria, 31.48% of fungi, and 42.59% of viruses. Both bacterial and fungal detection rates were significantly higher ($\chi^2 = 23.19$, $P < 0.0001$; $\chi^2 = 13.14$, $P = 0.0003$) than the results by microbiological culture method (23.91% and 10.87%). The nanopore sequencing results showed significantly more bacterial and fungal species detected compared to microbial culture results. **Conclusions** Nanopore sequencing for the identification of pathogenic microorganisms has the advantages of high detection rate, wide detection of pathogenic genera, and rapid diagnosis. It has potential clinical application in the diagnosis of tumor-associated infectious diseases.

[Key words] Nanopore sequencing; Tumor; Infection; Pathogenic microorganisms; Microbial culture

感染是恶性肿瘤患者死亡的主要原因, 大约有 60% 的恶性肿瘤患者死于直接感染或感染相关并发症^[1-2]。肿瘤患者由于自身免疫力低、机体耐受性差, 加之侵入性的手术操作、长期的放化

疗、免疫、靶向治疗等综合抗肿瘤治疗导致肿瘤患者具有更高的感染率; 低免疫状态使机会致病菌增多, 致病菌构成复杂, 经验性抗生素的使用易引起多重耐药菌感染。另外, 肿瘤热、肿瘤坏

[收稿日期] 2023-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81860513); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202201AY070001-164)

[作者简介] 刘熙(1983~), 女, 云南玉溪人, 医学博士, 主治医师, 主要从事微生物的高通量测序研究工作。

[通信作者] 周永春, E-mail: chungui7625@163.com

死吸收热与肿瘤合并感染引起的发热不易鉴别,导致肿瘤并发的感染容易被忽视,最终严重影响患者的预后^[3]。有研究报道每延误1h,有效抗感染治疗脓毒血症的死亡率将上升7%^[4]。因此,准确、快速地鉴定出病原微生物是及时控制感染,降低死亡率的关键。

目前临床上常用的病原微生物鉴定方法主要包括直接显微镜检测、病原体特异性抗原检测、病原体的分离培养和血清学检测。分离培养是病原微生物检测最直接最关键的手段^[5]。但由于人体内外微环境的差异、微生物自身的生长习性决定了微生物的体外培养困难,或周期长,且大部分微生物无法培养。近年来,随着基因测序技术的发展,以Illumina为代表的高通量测序为病原微生物的鉴定提供了新的思路,但其读长短,操作复杂,上机时间长等缺点日益凸显^[6]。2014年,英国牛津纳米孔(oxford nanopore technologies, ONT)公司第一台纳米孔测序仪MinION以单分子测序、长读长(>500 bp)、实时测序的优势为高通量病原微生物测序运用于临床感染性疾病的诊断提供了可能^[5,7]。

本研究应用ONT公司的纳米孔测序仪GridION对云南省肿瘤医院住院的疑似感染患者样本进行病原微生物鉴定,与同期同种类型标本的微生物培养结果比较,综合评价纳米孔测序病原微生物鉴定的临床应用价值,为肿瘤患者并发感染性疾病的早期、准确、快速诊断提供可靠的检测方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2022年7月至8月于云南省肿瘤医院住院,疑似感染的36例肿瘤患者样本54份。血液样本采集双侧肘静脉血各2 mL。除血液外的标本采集后立即于冰袋低温转运箱送到实验室,取样到检测时间不超过24 h,超24 h样本至于-80℃保存。排除可疑污染的样本。另外,将上述36例患者中与纳米孔测序同类型标本且相同日期送检的46份病原微生物培养样本作为对照组。另8份样本无同期微生物培养结果,无法比较。本研究获云南省肿瘤医院伦理委员会批准(伦审编号: KYLX2022185),入组患者均签署了知情同意书。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器包括北京天根生化科技有限公司的TGGrinder H24组织研磨均质仪(0SE-TH-01);杭

州朗基科学仪器有限公司提供的三通道PCR仪(T30);Thermo Fisher公司生产的qubit 4荧光定量仪(Q33226)和ONT公司的GridION X5纳米孔测序仪。主要试剂核酸提取或纯化试剂盒(DG001-1),测序反应通用试剂盒(DG005, DG006, DG007),清洗液(DG004-2)均购自武汉臻熙医学检验实验室有限公司。测序芯片(FLO-MIN106)和MinKNOW 21.10.8软件由ONT公司提供。

1.3 实验方法

血液样本通过低速离心后转移上层血浆及中间白细胞层至研磨管,再进行高速离心后弃上清至300 μL沉淀的方法尽量去除宿主细胞核酸。黏稠样本取300 μL添加30 μL核酸保护剂促进液化;不黏稠的样本取1 mL高速离心,弃上清,留管底300 μL沉淀。预处理后样本加入裂解液和核酸保护剂放置于组织研磨均质仪研磨,离心后采用磁珠法依照试剂盒说明书提取核酸并纯化。提取的核酸通过逆转录为cDNA。根据测序反应通用试剂盒说明书,不同样本类型选择不同的引物(包括M01, M02, M03-1, M03-2, M05和M06)进行PCR扩增,扩增产物通过qubit定量后进行混样、末端修复和接头连接。配制文库体系,在自检合格的芯片上上样,最后上机测序。根据每次芯片自检的有效纳米孔数,测序时间6 h至12 h,平均测序8 h,下机数据达到1.73 GB至3.36 GB,平均一次上机数据量为2.4 GB,保证每份样本有效Reads数不低于2万条。下机数据与16S rDNA/ITS序列数据库(<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci>)和病毒参考序列数据库(<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/viral>)分别进行比对。

病原微生物培养对照组的血液样本用需氧和厌氧培养瓶各采集静脉血10 mL,其他样本采用灭菌试管无菌采集,送云南省肿瘤医院病原微生物室进行微生物培养。

1.4 统计学处理

实验数据采用Microsoft Excel收集整理。应用Venn 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)作图,并运用Graph Pad Prism 9.4.1应用软件做统计学分析。计数资料用例数或百分比表示,2种检测方法检出率的比较采用配对四格表 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本来源和样本类型

该研究54份样本来自疑似感染的36例肿瘤

患者。男性患者 20 例, 女性患者 16 例。年龄 14 到 93 岁。患者来自重症监护室(53.70%), 神经外科(14.81%), 血液科(14.81%), 其他科室(16.67%)。其中肺癌 11 例, 血液系统肿瘤 8 例, 消化系统肿瘤 7 例, 神经系统肿瘤 7 例, 其他包括妇科肿瘤、泌尿系肿瘤等 3 例。诊断为疑似或确诊肺部感染患者 21 例, 确诊脓毒血症 10 例, 腹腔感染 2 例, 尿路感染 1 例, 颅内感染 2 例, 发热原因待查 7 例。36 例患者中有感染相关手术操作史者 14 例, 放化疗史 13 例, 其他 9 例包括不明原因发热和重度骨髓抑制患者。54 份标本涵盖血液(59.25%)、痰液(29.62%)、肺泡灌洗液(1.85%)、脑脊液(3.70%)、胸腹腔引流液(5.56%) 5 种样本类型, 见图 1 ~ 图 3。

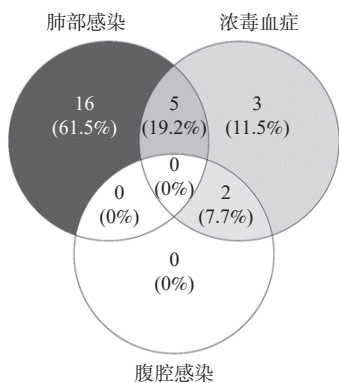


图 1 患者感染情况
Fig. 1 Patient infection status

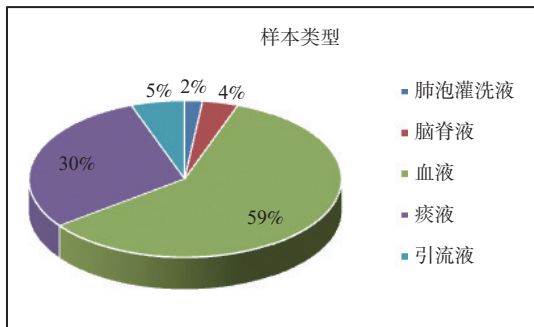


图 2 可疑感染样本类型
Fig. 2 Types of suspected infected samples.

2.2 纳米孔测序微生物检出率

所有样本中纳米孔测序细菌检出率 72.22%, 真菌检出率 31.48%, 病毒检出率 42.59%。其中痰液样本中细菌检出率高达 81.25%, 真菌检出率达 62.5%, 病毒检出率为 31.25%。血液样本中细菌检出率为 62.5%, 真菌检出率为 12.5%, 病毒检出率为 43.75%, 见图 4。

2.3 纳米孔测序结果与微生物培养结果的比较

相同患者有 46 份同类型样本同期送病原微生物培养。纳米孔测序结果与微生物培养结果比较,

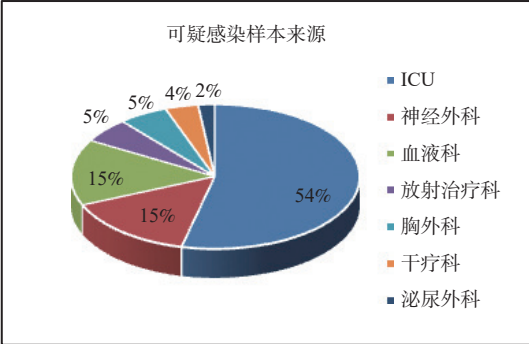


图 3 感染样本科室来源
Fig. 3 Source of infected samples

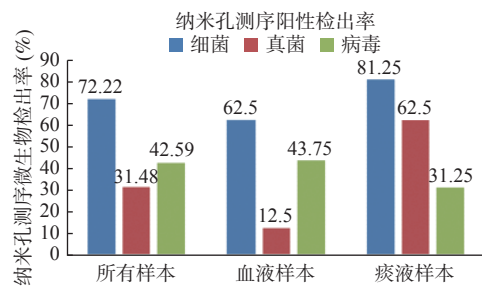


图 4 纳米孔测序病原微生物检测率
Fig. 4 Detection rate of pathogenic microorganisms by nanopore sequencing

纳米孔测序法细菌和真菌检出率分别较微生物培养法(23.91%和10.87%)明显升高($\chi^2 = 23.19$, $P < 0.0001$; $\chi^2 = 13.14$, $P = 0.0003$)。2 种方法比较细菌和真菌鉴定符合率分别为 28.27% 和 76.09%。其中细菌阳性符合率均为 8.70%; 细菌阴性符合率为 19.57%, 真菌阴性符合率达 67.39%。细菌的漏检率和不一致率分别为 8.70% 和 6.52%; 真菌漏检率和不一致率均为 2.17%, 见图 5、图 6。纳米孔测序在 54 份样本中检测出

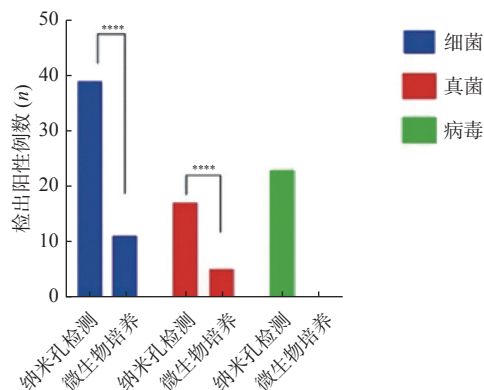


图 5 不同检测方法病原微生物阳性检出例数的比较
Fig. 5 Comparison of the number of positive cases of pathogenic microorganisms detected by different detection methods

**** $P < 0.001$.

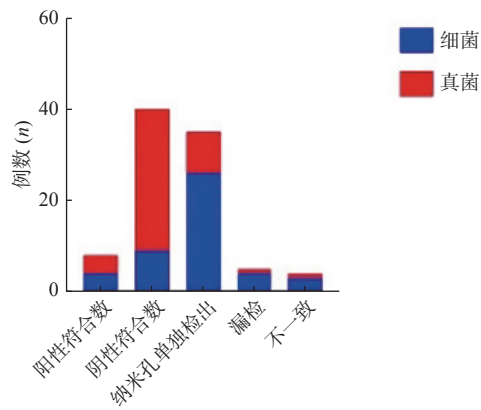


图 6 纳米孔测序与微生物培养结果对比

Fig. 6 Comparison of results with nanopore sequencing and microbial culture

的细菌主要包括屎肠球菌、肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌等 27 种，真菌包括白色念

珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌等 11 种、病毒主要包括 EB 病毒、人巨细胞病毒、细环病毒等 7 种。较 46 份微生物培养的样本中检出的细菌(9 种)和真菌(3 种)种属明显增多，见表 1、表 2。

2.4 纳米孔检出 reads 数

同时将测序 4 h 的数据与下机数据比较显示 89.74% 的细菌可在 4 h 时得到有效 Reads 数，100% 的真菌 4 h 数据可提示感染的真菌种属。而 47.83% 的病毒在测序 4 h 后获得了有效 Reads 数。

2.5 与临床相关感染指标

考察临床常用的检测和监测感染的指标，包括外周血白细胞数、中性粒细胞数，C 反应蛋白 (C reactional protein, CRP)，降钙素原 (procalcitonin, PCT)，G 试验，GM 试验。白细胞数、中

表 1 纳米孔测序检出的病原微生物种属(n)

Tab. 1 Pathogenic microbial species detected by nanopore sequencing (n)

检出细菌种属	检出例数	检出真菌种属	检出例数	检出病毒例数	检出例数
铜绿假单胞菌	3	白色念珠菌	3	人疱疹病毒6型	3
肺炎链球菌	4	热带念珠菌	3	人类疱疹病毒1型	2
血液链球菌	1	葡萄牙棒孢酵母	2	EB病毒	10
大肠埃希氏菌	1	似平滑念珠菌	3	人巨细胞病毒	6
肺炎克雷伯菌	2	克柔念珠菌	3	人疱疹病毒7型	1
屎肠球菌	6	耶氏肺孢子菌	1	细环病毒	5
戈登链球菌	1	限制性马拉色菌	1	JC病毒	1
内氏放线菌	2	解脂耶氏酵母菌	1	人类疱疹病毒1型	2
口腔链球菌	1	清酒念珠菌	1		
杰氏棒杆菌	2	光滑念珠菌	1		
鲍曼不动杆菌	4	酿酒酵母	1		
荧光假单胞菌	2				
蜡样芽孢杆菌	1				
蕈状芽孢杆菌	1				
棉子糖球菌	1				
阴道加德纳菌	2				
副流感嗜血杆菌	2				
产气克雷伯菌	1				
金黄色葡萄球菌	3				
维隆气单胞菌	1				
产碱假单胞菌	1				
缓症链球菌	1				
阿氏肠杆菌	1				
枯草芽孢杆菌	1				
斯氏假单胞菌	1				
路登葡萄球菌	1				
栖稻假单胞菌	1				

54份样本中共检测出细菌27种，9份样本同时检出2种细菌；真菌11种，3份样本同时检出2种真菌；病毒7种，5份样本同时检出2种病毒，1份样本同时检出3种病毒。

表 2 微生物培养检出的微生物种属(n)
Tab. 2 Pathogenic microbial species detected by microbial culture (n)

检出细菌种属	检出例数	检出真菌种属	检出例数
耐碳青霉烯铜绿假单胞菌	1	白色念珠菌	2
革兰氏阳性杆菌	1	克柔念珠菌	1
鲍曼不动杆菌	1	光滑念珠菌	3
耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌	1		
产酸克雷伯菌	1		
超广谱B内酰胺酶大肠埃希菌	1		
耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌	1		
肠膜明串珠菌	1		
超广谱B内酰胺酶肺炎克雷伯菌	1		
肺炎克雷伯	1		
阴沟肠杆菌	1		

46份样本中共检测出细菌9种, 每一份样本均只检出1种细菌; 真菌3种, 1份样本同时检出2种真菌。

性粒细胞数, CRP 和 PCT 值与鉴定出病原微生物与否则以及病原微生物的种属无相关性。54 份样本中 GM 试验结果均为阴性。3 份样本中 G 试验阳性, 纳米孔测序分别在其中 2 份腹腔引流液中检测到限制性马拉色菌和白色念珠菌, 1 份血液样本中检测出热带念珠菌。同期有 2 份同类型样本行微生物培养, 仅 1 份腹腔引流液标本中培养出白色念珠菌。

3 讨论

纳米孔测序概念的提出最早是在 20 世纪 80 年代, 随着纳米孔和马达蛋白相关技术的不断革新, 2014 年 ONT 公司推出了第一台纳米孔测序仪 MinION, 在 2015 年开始商业化的应用^[8]。纳米孔测序技术依赖于纳米级生物蛋白质孔, 纳米孔作为一个生物传感器, 嵌在电阻聚合物膜中并置于电解质溶液环境里, 当给予恒定的电压产生穿过纳米孔的离子电流时, 带负电的单链 DNA 或 RNA 分子从纳米孔一侧穿到带正电一侧, 不同碱基通过纳米孔产生不同的离子电流变化, 最后通过计算机将电流信号的变化转换为碱基序列^[9]。基于上述纳米孔测序原理, 使纳米孔测序具有单分子、长读长和实时测序的优势, 在人类基因组测序, 生物和植物等基因组的组装, 感染、遗传和肿瘤等疾病的诊治方面有广阔的应用前景^[10-13]。本研究对纳米孔测序用于肿瘤患者并发感染性疾

病病原微生物的鉴定进行了初步探讨。

肿瘤患者并发的感染以呼吸道和手术操作相关感染为主, 这一特征与综合性医院住院患者院内感染以下呼吸道感染(32.6%)和手术部位相关感染(20.1%)为主一致^[3]。疑似感染样本主要来自重症监护室, 重症监护室是危急重症感染患者的最终选择, 同时也是引起院内感染的重要因素之一^[14]。重症感染的患者易并发脓毒血症, 通常为原发感染病灶和血液的双重可疑感染样本, 甚至是多部位样本的多次送检。本研究中来自重症监护室的 11 例(11/12)患者为双重送样, 4 例患者在双样本中均检测到致病菌, 其中 3 例检出的致病菌不同, 仅 1 例相同。一方面提示肿瘤患者低免疫力状态引起的重症感染往往为多重感染, 另一方面多重送样有助于明确致病菌, 全面评估病情。

据文献统计, 导致人感染性疾病的微生物有 1415 种, 其中细菌 538 种, 真菌 307 种, 病毒 217 种, 原生动物 66 种, 蠕虫 287 种, 且大多数微生物是无法进行分离培养的^[15]。纳米孔测序对病原菌包括细菌、真菌和病毒的检出率和检出的病原微生物种属均明显高于微生物培养。痰液样本细菌检出率最高, 可能与呼吸道感染的高发生率有关, 开放性标本也是导致痰液细菌高检出率的原因。吴泽刚等^[16]应用纳米孔测序鉴定血液感染中的病原菌, 结果示细菌和真菌检出率分别为 41.8% 和 11.2%。本研究中血液样本的细菌检出率为 62.5% 较其明显增高, 是否与研究对象是血液原发感染人群和其他部位感染引起菌血症人群不同有关, 有待进一步探讨。血液样本真菌检出率为 12.5%, 与研究报道基本一致。

肿瘤患者的低免疫状态是导致感染的重要因素^[2-3]。细菌是最常见的感染病原体, 主要是革兰氏阳性菌, 如葡萄球菌、链球菌、肠球菌, 且由于医源性暴露和预防性抗生素的使用常伴有耐甲氧西林(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA) 和耐万古霉素(vancomycin-resistant enterococci, VRE)耐药^[17]。本研究结果亦提示肿瘤患者并发感染的细菌主要以屎肠球菌、肺炎链球菌常见, 真菌种类相对丰富, 病毒以 EB 病毒为主。在耐药菌和药敏鉴定方面, 病原微生物的分离培养同时可获得部分药物敏感信息, 对临床治疗有一定提示作用。而本研究中的纳米孔测序仅针对微生物种属的鉴定, 尚未涉足耐药基因的检测。高通量测序对耐药基因的检测以及耐药基因与耐

药表型的相关性值得深入研究。

本研究进一步比较了纳米孔测序和微生物培养在多种类型样本中的细菌鉴定完全符合率(28.27%)较刘晔等^[18]报道的单一肺泡灌洗液样本中的纳米孔测序与细菌培养结果 33.3% 的一致率低。可能与呼吸道病原菌培养检出率高和肺泡灌洗液样本背景菌相对较少有关。值得注意的是虽然纳米孔测序在病原微生物检出率和种属鉴定上均明显优于微生物培养,但其仍存在一定的漏检率(细菌 8.70%, 真菌 2.17%)和不一致率。文献报道在不同样本中纳米孔测序与微生物培养细菌的漏检率从 3.6% 到 21.1% 不等^[16, 19]。除了样本类型干扰外,可能与微生物测序强人源背景和纳米孔测序精确度较 Illumina 平台低相关^[11, 20]。

实时测序没有固定的最小运行时间,可以即时对数据进行信息学分析是纳米孔测序的另一优势^[20]。本研究中纳米孔测序时长 6~12 h, Jana Batovska 等^[21]报道采用 MinION 对虫媒病毒进行测序,上机测序 10 min 即可产生 12% 的病毒 Reads, 1 h 后 Reads 数增加到 32.2%, 在 10 h 后可得到 87.3% 的目的病毒 Reads。在纳米孔测序技术检测呼吸道病原体中,叶福强等^[22]也报道测序开始 8 min 后, MinION 产出第 1 条人呼吸道腺病毒 7 型序列,测序 5 h,可获得至少 50% 的目标序列,测序 9 h 得到 78.95% 的目标序列。本研究中纳米孔测序样本制备 6~8 h,上机测序 6~12 h,测序 5 min 后便可在计算机端获得数据,4 h 得到可分析的微生物鉴定信息,这种高效的微生物鉴定对于感染的早期精准诊断,第一剂抗生素的选择和扭转危急重症感染患者预后有重要的意义。

综上,纳米孔测序技术用于鉴定微生物相较于传统微生物培养优势明显,通过纳米孔测序能够在 24 h 内获取样本微生物信息,病原微生物检出率高,鉴定的病原微生物种属多。快速、有效的鉴定病原微生物种属,能够有效地指导临床抗生素的应用,满足临床需求,具有潜在的临床应用价值。

本研究亦存在一定局限性,回顾性分析了疑似感染样本的纳米孔测序结果,未对纳米孔测序结果进一步行 Sanger 测序或 PCR 验证;扩大样本量,丰富样本类型,前瞻性研究将为评价纳米孔测序在病原微生物鉴定中的敏感性和应用价值提供支撑。

[参考文献]

- [1] Zheng Y, Chen Y, Yu K, et al. Fatal infections among cancer patients: A population-based study in the United States[J]. *Infectious Diseases and Therapy*, 2021, 10(2): 871–895.
- [2] Zorina T, Styche A. Infectious diseases in cancer patients: An overview[M]. Shurin M R, Thanavala Y, Ismail N. In: *Infection and Cancer: Bi-Directorial Interactions*. Cham: Springer International Publishing, 2015: 295–311.
- [3] Huang G, Huang Q, Zhang G, et al. Point-prevalence surveys of hospital-acquired infections in a Chinese cancer hospital: from 2014 to 2018[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13(12): 1981–1987.
- [4] 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]. *Critical Care Medicine*, 2006, 34(6): 1589–1596.
- [5] Petersen L M, Martin I W, Moschetti W E, et al. Third-generation sequencing in the clinical laboratory: Exploring the advantages and challenges of Nanopore sequencing[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 58(1): e01315–e01319.
- [6] Ryan R W, Louise M J, Kathryn E H. Assembling the perfect bacterial genome using Oxford Nanopore and Illumina sequencing[J]. *Plos Computational Biology*, 2023, 19(3): e1010905.
- [7] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(1): 115–124.
- [8] Jain M, Olsen H E, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: Delivery of Nanopore sequencing to the genomics community[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 239.
- [9] Wang Y, Zhao Y, Bollas A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications[J]. *Nature biotechnology*, 2021, 39(11): 1348–1365.
- [10] 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.
- [11] 庄子, 孟雨桐, 刘润肠, 等. 纳米孔测序技术及其在病原

- 学诊断中的应用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(1): 1–12.
- [12] 闫冬明, 赵宁, 赵春春, 等. 纳米孔测序技术研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2020, 31(3): 380–384.
- [13] Ciuffreda L, Rodriguez-perez H, Flores C. Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2021, 19: 1497–1511.
- [14] Markwart R, Saito H, Harder T, et al. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis[J]. Intensive Care Medicine, 2020, 46(8): 1536–1551.
- [15] Taylo L H, Latham S M, Woolhouse M E. Risk factors for human disease emergence[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2001, 356(1411): 983–989.
- [16] 吴泽刚, 顾剑, 郑红云, 等. 纳米孔测序在血流感染中的应用[J]. 华西医学, 2022, 37(8): 1166–1169.
- [17] Holland T, Fowler V G Jr, Shelburne S A III. Invasive gram-positive bacterial infection in cancer patients[J]. Clinical Infectious Diseases, 2014, 59(suppl_5): S331–S334.
- [18] 刘晔, 孙高远, 李贺鑫, 等. 纳米孔测序技术在下呼吸道感染细菌性病原检测的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(4): 328–334.
- [19] Stefan C P, Hall A T, Graham A S, et al. Comparison of Illumina and Oxford Nanopore sequencing technologies for pathogen detection from clinical matrices using molecular inversion probes[J]. The Journal of Molecular Diagnostics: JMD, 2022, 24(4): 395–405.
- [20] Sheka D, Alabi N, Gordon P M K. Oxford Nanopore sequencing in clinical microbiology and infection diagnostics[J]. Briefings in Bioinformatics, 2021, 22(5): 1–18.
- [21] Batovska J, Lynch S E, Rodoni B C, et al. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 249: 79–84.
- [22] 叶福强, 李鹏, 韩一芳, 等. 基于纳米孔测序技术的呼吸道病原体快速确认[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 127–132, 150.