

DOI:10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20257147

· 综述 ·

第三代测序技术在病原微生物耐药性分析中的应用

刘佩婷¹, 张嘉梁¹, 李子阳^{1,2,3}, 胡敏^{1,2,3}

(1. 中南大学湘雅二医院检验医学科, 长沙 410011; 2. 分子诊断技术湖南省工程研究中心, 长沙 410011; 3. 湖南省感染性疾病分子诊断临床医学研究中心, 长沙 410011)

[摘要] 抗微生物药物耐药性对人类健康产生了严重威胁,是导致感染相关病死率升高的主要原因。合理、及时地使用抗微生物药物对改善感染患者预后至关重要,但过度或不规范用药会加速病原微生物耐药性的获得,促进新型耐药机制的产生,最终导致“超级耐药菌”的出现。因此,耐药性的早期识别对感染性疾病的快速诊断和精准治疗至关重要。随着分子诊断技术的发展,第三代测序技术(TGS)因其长读长、操作简便和检测快速等优势,为微生物耐药性检测提供了创新解决方案,显著促进了耐药性的早期诊断和实时监测。本文系统综述了 TGS 在微生物耐药性检测中的研究进展,分析其在病毒、细菌和真菌耐药性快速检测中的应用优势与不足,为病原微生物感染的早期诊治提供新的研究视角。

[关键词] 第三代测序; 抗微生物耐药性; 纳米孔测序; 病原体; 感染; SMRT 测序; TGS

[中图分类号] R446

Application of third-generation sequencing technique in the analysis of antimicrobial resistance of pathogenic microorganisms

LIU Peiting¹, ZHANG Jialiang¹, LI Ziyang^{1,2,3}, HU Min^{1,2,3} (1. Department of Laboratory Medicine, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China; 2. Molecular Diagnostic Technology Hunan Engineering Research Center, Changsha 410011, China; 3. Hunan Provincial Clinical Medical Research Center for Molecular Diagnosis of Infectious Diseases, Changsha 410011, China)

[Abstract] Antimicrobial resistance poses a serious threat to human health and is the main cause for the increase in infection-related mortality. Rational and timely use of antimicrobial agents is crucial for improving the prognosis of infected patients, however, overdose and inappropriate use of antimicrobial agents can accelerate the acquisition of drug resistance of pathogenic microorganisms, promote the emergence of new resistance mechanisms, and ultimately lead to the emergence of “superbugs”. Therefore, early identification of antimicrobial resistance is of significant importance for the rapid diagnosis and precise treatment of infectious diseases. With the development of molecular diagnostic techniques, third-generation sequencing (TGS) technique offers innovative solutions for detecting microbial resistance due to its advantages in long read length, easy operation, and rapid detection, significantly promoting early diagnosis and real-time monitoring of antimicrobial resistance. This review systematically summarizes the research progress of TGS in microbial resistance detection, analyzes its advantages and limitations in rapid detection of resistance in viruses, bacteria, and fungi, thus provides new perspectives for the early diagnosis and treatment of pathogenic microbial infections.

[Key words] third-generation sequencing; antimicrobial resistance; Nanopore sequencing; pathogen; infection; SMRT sequencing; TGS

[收稿日期] 2024-10-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82102499);湖南省自然科学基金项目(2021JJ40840)

[作者简介] 刘佩婷(2002-),女(汉族),云南省普洱市人,医学检验师,主要从事测序技术在病原微生物中的应用研究。

[通信作者] 李子阳 E-mail: 507509@csu.edu.cn; 胡敏 E-mail: huminjk@csu.edu.cn

抗微生物药物耐药 (antimicrobial resistance, AMR) 是指细菌、真菌、病毒等病原微生物由于固有耐药性或者通过水平基因转移等途径对抗微生物药物产生高度耐受性的特性。近年来, AMR 发生率呈逐年上升趋势, 对人类健康造成严重危害。据统计, 2019 年全球与 AMR 相关的死亡人数约为 495 万, 其中 127 万例死亡归因于 AMR^[1]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 已将其列为全球十大公共卫生威胁之一^[2]。因此, AMR 的精准防控亟需建立快速、准确、全面的耐药性检测技术体系^[3]。

抗菌药物敏感性试验 (antimicrobial susceptibility testing, AST) 是临床 AMR 检测的金标准, 包括纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法等方法。虽然这些方法准确率高, 但其依赖微生物培养的特性导致检测周期较长 (通常 ≥ 48 h), 且对难培养病原体的检测及耐药机制解析能力有限。分子诊断技术或基于物理学的检测技术 [如聚合酶链式反应 (PCR)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)] 虽检测时间短、灵敏度高, 却无法获取最低抑菌浓度 (MIC) 值, 且仅能针对已知耐药基因进行靶向检测。

随着测序技术和生物信息学的快速发展, 高通量测序技术已广泛应用于 AMR 检测。基于二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 平台的宏基因组测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 可从临床标本中直接鉴定多种病原体, 并同时获得细菌耐药基因信息, 基于 NGS 平台的全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 还能鉴定新型耐药基因及突变位点。但基于二代测序平台的 mNGS 因其短读长特性 (150~300 bp), 复杂基因组区域 (如耐药基因串联重复序列、质粒接合区) 组装错误率升高, 难以准确识别耐药基因组织结构及水平转移路径^[4], 在 AMR 的检测应用中存在缺陷, 如无法检出全部耐药基因, 无法确定耐药基因的来源 (尤其是来源于质粒上的耐药基因) 以及基因型和表型不符等问题; 此外, 基于 NGS 平台的 WGS 对标本纯培养的依赖及高昂成本进一步限制其临床应用。

随着测序技术的迭代更新, 第三代测序技术 (third-generation sequencing, TGS): 包括太平洋生物科学公司 (Pacific Bioscience, PacBio) 的单分子实时测序 (single-molecule real-time sequencing, SMRT)^[5] 和牛津纳米孔技术公司 (Oxford Nano-

pore Technologies, ONT) 的纳米孔测序技术^[6] 已取得突破性进展。TGS 又称长读长测序 (long-read sequencing, LRS), 与 NGS 相比具有通量高、速度快、读长长、成本低、实时测序等多种优点^[7]。长读长是 TGS 最显著的技术特征, 凭借读长优势, 其可跨越复杂基因组区域实现耐药基因的精准定位, 同时无需 PCR 扩增即可检测表观遗传修饰。临床研究表明, TGS 在耐药基因水平转移追踪^[8-9], 低频突变检出^[10] 及新发耐药机制解析^[11-12] 方面具有独特价值, 为感染性疾病的精准诊疗提供了重要分子依据^[13-14]。

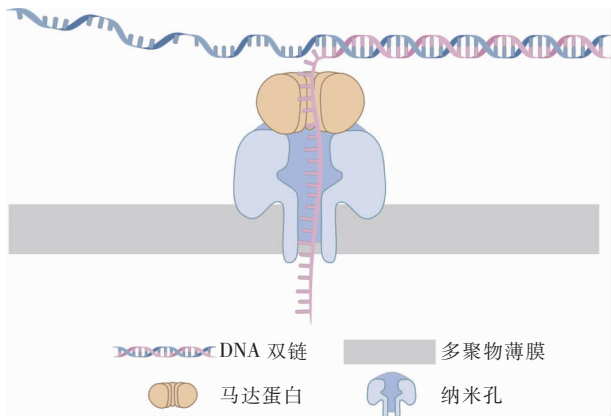
近年来, TGS 在检测通量和准确性方面的持续提升^[15], 为在临床微生物检测领域的应用拓展了广阔前景。本综述将系统介绍当前具有代表性的 TGS, 并着重阐述其在病原微生物耐药性分析中的临床应用进展。

1 TGS

1.1 纳米孔测序技术 纳米孔测序技术是基于纳米孔对 RNA/DNA 进行测序, 与以往基于光信号的“边合成边测序”策略不同, 其采用的是利用电信号进行“边解旋边测序”^[16], 工作原理为: 在马达蛋白的作用下, 双链 DNA 解螺旋成为单链 DNA, 并被马达蛋白切割为单碱基逐个通过纳米孔通道, 碱基通过时会使电荷发生变化, 从而影响通过纳米孔的电流强度, 由于碱基具有化学结构差异, 所以不同碱基会产生不同的电流强度, 最终通过电子设备对电流强度进行检测进而获得碱基序列信息, 完成测序 (见图 1)。纳米孔测序技术具有鲜明的特点, (1) 超长读长: 纳米孔测序技术是根据待测核酸分子通过纳米孔引起的电流信号波动进行测序, 因此原则上其测序长度不受技术本身的限制, 取决于核酸分子长度, 最大读长可达 2.2 Mb^[17]; (2) 直接核酸分析: 纳米孔可对 DNA/RNA 直接测序^[18-19], 无需 PCR 扩增和逆转录, 不仅节约了操作时间和测序成本, 还可实现核苷酸修饰的直接检测; (3) 便携性与实时性: 纳米孔测序设备简单便携, 如 MinION 测序仪重量约 100 g, USB 连接电脑后就可开始测序工作, 该设备可在实验室外的野外、极地、海洋、太空等各种复杂环境进行实时测序; (4) 单分子分辨率: 可检测低频突变 ($<1\%$)、结构变异及融合基因。

然而, 早期纳米孔测序存在总体测序错误率高的缺点, 错误率高达 30%~40%^[20], 但其测序错误

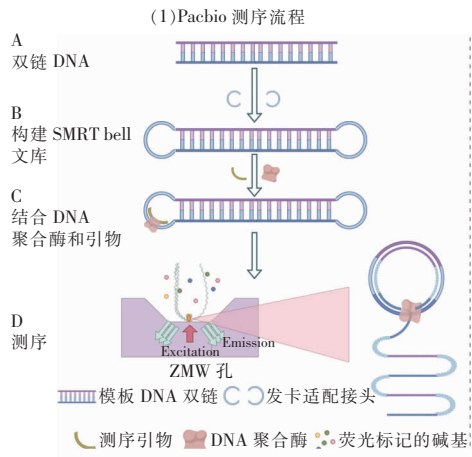
随机发生,可通过增加覆盖度降低错误率。随着设备硬件的迭代更新,纳米孔和建库方案的改进^[21-22]以及数据处理算法的优化^[23],使用纳米孔测序的准确率可达 99%^[24]。



注:在 ONT 测序中,任意长度的 DNA(紫色表示正向链,蓝色表示反向链),一端或两端预装马达蛋白。将 DNA 与马达蛋白结合并加载到流通池中进行测序。流通池包含嵌入合成膜中的数千个蛋白质纳米孔,马达蛋白将 DNA 分子带向这些纳米孔。然后,测序接头插入纳米孔的开口,马达蛋白开始解开双链 DNA。施加电流,该电流与运动蛋白协同作用,以每秒约 450 个碱基的速率驱动带负电荷的 DNA 通过孔。当 DNA 穿过孔隙时,不同的碱基引起的电流变化不同,通过测量电流变化来实时分析不同分子穿过纳米孔,即可绘制测序结果。

图 1 纳米孔测序原理示意图

1.2 Pacbio SMRT 测序技术 Pacbio SMRT 测序



注:(1)为 Pacbio 原理示意图(HiFi 模式)。在 SMRT 测序时,片段化的 DNA 两端连接上发卡接头(浅蓝色),形成哑铃状分子,此时 SMRT bell 文库构建完成。文库构建完成后,测序引物与发卡适配接头发生互补配对,同时,SMRT bell 分子与 DNA 聚合酶结合,并加载到 SMRT 芯片上进行测序。每个 SMRT 芯片上可以包含 800 万个 ZMW 孔。测序时,一个 ZMW 孔底部只能容纳一条 SMRT bell 分子和一个 DNA 聚合酶,ZMW 孔直径只有 10~50 nm,当一束光从孔底部穿透时,只能照亮很小的一部分区域,所以在这个区域内,与 DNA 链结合的碱基所携带的荧光会被激活而检测到,而背景荧光可以大大降低。然后,磷酸盐连接的荧光团从碱基上裂解,而碱基作为新 DNA 链的一部分不会因发生脱落而释放到缓冲液中,从而防止在随后的光脉冲期间受到荧光干扰。每个 DNA 碱基对应不同的颜色(T:绿色;C:蓝色;G:黄色;A:红色);(2)为 Illumina 原理示意图。

技术采用的是基于光信号的“边合成边测序”测序手段,关键部分是零模波导(zero-mode waveguide, ZMW)孔,该孔直径 10 nm,仅能容纳一个 DNA 聚合酶分子和一个 SMRT bell 分子,并且从 ZMW 孔底部射出的激发光无法穿过小孔进入上方的溶液中激发游离碱基产生荧光,从而实现检测单个核苷酸信号而不受背景干扰(见图 2)。Pacbio 测序有其优点,(1)长读长:Pacbio 测序读长较长,最大读长可达 64.5 kb^[5],但是与纳米孔测序不同,Pacbio 的读长取决于聚合酶的活性,随着 DNA 聚合酶的活性在激光照射下逐渐减弱,合成反应会终止,所以 DNA 链的测序长度是有限的^[25];(2)碱基修饰检测:当 DNA 序列中存在甲基化等修饰时,相邻碱基之间的测序时间会延长,所以可以通过 2 个碱基之间的测序时间判断碱基修饰的数量和位置。但是也有其技术局限性:(1)与 NGS 相比,Pacbio 测序在测序通量方面具有明显不足,但随着设备不断改进,2022 年底,Pacbio 最新测序仪 Revio 的 SMRT cell 中 ZMW 孔从最初的 15 万个增加到 800 万个,测序通量增加的同时,测序成本大幅降低;(2)Pacbio 测序与纳米孔测序类似,早期存在高错误率(可达 15%)问题。为控制错误率,Pacbio 测序通过环状一致性测序(circular consensus sequencing, CCS)策略生成高精度读长(HiFi reads),在覆盖度达30×时,准确率可达 99.99%^[5,26],但成本也同步上升。

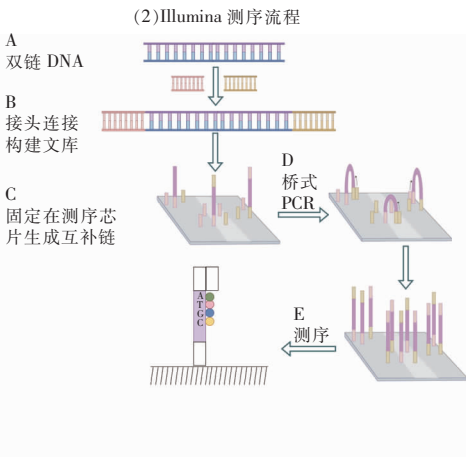


图 2 Pacbio(HiFi 模式)与 Illumina 原理示意图

2 TGS 在病原体耐药基因检测中的应用

快速、准确的病原微生物耐药性检测可以有效指导临床制定正确的治疗方案,从而改善患者预后。传统检测方法和 NGS 技术由于存在培养依赖性、读长短(150~300 bp)等局限性,难以满足复杂耐药机制的解析需求。TGS 技术凭借长读长、实时分析和无需 PCR 扩增等优势,可获取完整病原微生物基因组,这对明确病原微生物基因组特征、识别耐药基因、毒力基因及其所在的基因环境具有重要意义,随着 TGS 的迅速发展,其在保持测序速度优势的同时,测序准确性也不断提升。下文将系统阐述 TGS 在病原微生物耐药基因检测中的临床应用及未来发展前景。

2.1 细菌耐药基因检测 近年来,越来越多的研究者致力于探索 TGS 在细菌耐药性研究中的应用,发现与 NGS 相比,TGS 在细菌 AMR 检测方面具有多项优势。

2.1.1 耐药基因的全面检测 NGS 在耐药基因检测中存在基因覆盖度低,难以获得完整耐药基因序列的局限性。TGS 凭借其长读长特性,能够有效克服这些技术限制。Zhang 等^[27]采用 MinION 测序仪,通过多重 PCR 扩增和测序获取淋球菌 13 个耐药基因的全长序列,其耐药位点鉴定准确率达 99.2%,该研究证实,TGS 可通过降低序列组装复杂度,显著提高抗菌药物抗性基因(antimicrobial resistance gene, ARG)的注释精度。

TGS 的应用价值不仅体现在已知耐药基因检测方面,在新发耐药机制研究领域更展现出突破性潜力。Zarske 等^[11]采用纳米孔测序技术,首次鉴定弯曲杆菌 *tet*(O)嵌合基因及多拷贝耐药基因簇,发现其定位与 NGS 的 WGS 预测结果存在系统性偏差。Liu 等^[12]运用 TGS 技术,解析头孢地尔异质性耐药肺炎克雷伯菌(ST11 型)基因组特征,证实 *bla*_{SHV-12} 基因拷贝数扩增可能驱动耐药表型演化,为碳青霉烯类抗生素耐药机制研究提供了新证据。

另一方面,当病原体载量较低时,NGS 较大概率无法检出耐药基因,TGS 通过技术创新可能突破 NGS 技术瓶颈,(1)灵敏度优势验证:2022 年,Zhang 等^[28]对 Illumina 和 ONT 两个平台在肺炎患者支气管肺泡灌洗液中的检测性能进行评估(与传

统培养技术相比),结果表明,三种方法(Illumina、ONT 和培养)与临床病因学诊断的符合率分别为 56.1%、57.6%、24.2%;在诊断性能方面,ONT 的受试者工作特征(ROC)曲线下面积高于 Illumina (0.81 VS 0.73);(2)靶向富集策略:Serpa 等^[29]对下呼吸道感染危重患者的下呼吸道标本进行检测,发现利用 Cas9 靶向测序技术,实现低丰度 AMR 基因富集效率提升 2 500 倍,但需关注灵敏度提升伴随的假阳性率升高;(3)全基因组检测效能:Low 等^[30]证实纳米孔 WGS 在眼内炎病原检测中灵敏度达 100%,显著优于 16S rRNA 测序(75%)及 Illumina WGS(78%)。上述研究为 TGS 技术在耐药基因检测中的应用提供了关键试验依据,但其临床应用仍需优化靶向富集策略以平衡灵敏度与特异度。

2.1.2 耐药基因来源的确定(尤其是来源于质粒上的耐药基因) 质粒作为 ARG 的重要载体,通过水平基因转移驱动多重耐药菌的进化与传播。NGS 因短读长限制,难以解析复杂质粒结构(如嵌合质粒或巨型质粒),导致耐药基因宿主溯源及传播路径追踪效能受限。TGS 凭借长读长和单分子分辨率的优势,能够对高重复,高 CG 含量的序列进行检测,实现质粒全序列的无偏倚组装,为耐药基因定位及流行病学研究提供关键技术支撑^[31]。

Botelho 等^[32]利用纳米孔 WGS 技术,在假单胞菌中鉴定出新型巨质粒 pJBCL41(约 400 kb),该质粒编码 NDM-1 型碳青霉烯酶并携带多重耐药基因岛,揭示了质粒介导的碳青霉烯耐药跨种传播风险。Liu 等^[8]基于 TGS 技术,解析耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌(CR-hvKP)中 *bla*_{KPC-2}-*rm**pA* 的融合质粒,发现其通过启动子变异(P9T-P13T)实现毒力与耐药表型协同进化。此外,Vinué 等^[9]通过纳米孔测序技术证实,单个质粒可携带 β-内酰胺酶基因(*bla*_{CTX-M-15})和氨基糖苷类耐药基因[*aac*(6')-Ib-cr],并通过基因剂量累积效应导致广谱耐药表型。上述研究表明,TGS 可精准定位耐药基因的遗传背景(染色体或质粒),为耐药菌的分子流行病学研究及疾病防控提供关键证据。Che 等^[33]创新性地应用纳米孔 mNGS 解析污水处理厂中的耐药基因特征,首次实现环境标本中 ARG 与宿主的关联分析,突破了传统纯培养技术的局限性。

2.1.3 耐药基因型与表型一致性的确定 通过耐药基因检测预测耐药表型,可解决传统药敏试验耗

时长、检测药物种类有限及耐药机制不明等问题,对临床抗菌药物的精准、快速和有效使用具有重要意义。耐药基因型与表型的精准关联是指导临床精准用药的关键挑战。NGS 在耐药基因型与表型一致性分析中存在局限性,主要表现为:同一耐药基因型在不同细菌中可调控不同表型,而同一耐药表型可能由多种耐药基因共同调控。

TGS 通过单分子表观标记检测能力,为耐药表型与基因型一致性研究提供了新的研究维度。(1)适应性耐药盲区:研究^[34]表明,亚抑制浓度的抗菌药物暴露可诱导 DNA 修饰的动态变化,从而导致暂时性耐药表型,此类现象可通过 TGS 实时监测;(2)表观遗传调控耐药表型:研究^[35]表明,SMRT 技术可系统检测 DNA 甲基化位点(如 m6A 和 m4C),从而揭示表观遗传修饰对 β -内酰胺酶表达的调控机制。

虽然 TGS 相较于 NGS 在细菌基因型与表型一致性检测方面有了一定突破,但 TGS 在确定耐药基因型与表型一致性方面仍需开展大标本观察性研究,以提供更多证据评估其诊断效能。

2.1.4 病原体及其耐药基因的快速检测 有研究比较了基于 Illumina 和纳米孔测序平台的 WGS 在结核分枝杆菌耐药基因突变检测和耐药表型预测中的表现。结果显示,两种测序平台在耐药基因检测和耐药表型预测方面具有高度一致性。然而,纳米孔测序在时效性方面具有显著优势,纳米孔 WGS 的测序时间可缩短至 5~72 h(通量足够时可随时终止测序),而 Illumina WGS 则需要固定的 48 h^[36-38]。这一优势使其更适用于临床急危重症感染的快速诊断。

此外,纳米孔 mNGS 在病原体快速鉴定方面展现出显著优势,Chen 等^[39]开发了一种基于纳米孔 mNGS 的检测流程,可在 5 h 内准确检测呼吸机相关肺炎的病原体及其 ARG。Serpa 等^[29]采用 CAS9 系统靶向富集病原体基因,Charalampous 等^[40]利用皂角法实现>99.99%的宿主 DNA 去除率,两项研究均成功将纳米孔测序技术应用于细菌性下呼吸道感染病原体快速鉴定,并准确检测到相关 ARG。此外,Charalampous 等^[40]的研究将分析周期缩短至 6 h(快速模式)或 8 h(常规模式),显著提高检测时效性。

上述研究表明,TGS 无论是在 mNGS 还是

WGS 检测策略中的应用,均能实现耐药基因的准确快速鉴定,不仅有助于临床减少广谱抗菌药物的使用,更展现出广阔的应用前景。

尽管 TGS 可快速鉴定耐药基因,但其无法直接获取 MIC 值仍是临床转化的主要瓶颈。最新研究通过技术联用策略成功突破了这一限制。Zhang 等^[41]报道了 1 例高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)所致肝脓肿病例,通过联合纳米孔测序与微流控药敏芯片技术,将诊断-治疗周期缩短了 72 h。在该案例中,TGS 检测到氨基糖苷类[*aac*(3)-IIa]和头孢菌素类(*bla*_{SHV-12})耐药基因,而表型分析仅显示 β -内酰胺酶活性,提示可能存在转录沉默或翻译后修饰等调控机制。此外,2024 年一项多中心研究显示,基于 ONT 的靶向测序(tNGS)在结核分枝杆菌检测中,可检测到贝达喹啉耐药相关 *rpoB* His445Tyr 突变和利奈唑胺耐药相关 *rrl* A2819C 突变,这些耐药位点未被 WHO 推荐的任何快速分子诊断技术(包括 Xpert MTB/XDR)覆盖^[42]。

2.2 真菌耐药基因检测 随着耐药机制研究的深入,已证实耐药表型的产生常涉及多重分子机制协同作用及新型基因突变,这一规律在真菌耐药性演化中亦得到充分体现。近期临床研究显示,纳米孔测序技术已成功应用于耳念珠菌耐药机制解析及流行病学溯源^[43]。该研究通过纳米孔 WGS 对临床分离菌株进行分析,基于测序数据构建了院内菌株与全球流行株的遗传进化图谱。值得注意的是,研究者鉴定出 1 株对棘白菌素类和 5-氟胞嘧啶同时耐药的多重耐药菌株。通过纳米孔测序首次证实其耐药表型分别与 FKS1 基因(S639F)和 FUR1 基因(T225C)的特异性点突变相关,而短读长测序技术未能有效识别上述突变位点。此外,TGS 凭借其跨越复杂重复序列的技术优势,可精准解析真菌基因组中的串联重复区域真菌^[44],为耐药相关基因簇的结构变异研究提供了关键技术支撑。上述研究结果表明,TGS 在真菌耐药性分子机制研究中具有独特的应用价值。随着测序技术的不断发展,WGS 在真菌耐药性监测中的应用日益广泛,而便携式测序设备(如纳米孔测序仪)的临床推广,将显著提高抗真菌耐药性的实时检测效能。

然而,目前 TGS 在真菌耐药基因检测中的应用仍存在明显局限性。主要技术瓶颈包括:真菌基因组结构复杂性(如大基因组容量、高频有性重组),耐

药基因数据库不完善,以及缺乏标准化分析流程。当前临床实践中,真菌耐药基因检测仍主要依赖于实时荧光定量 PCR 或靶向药物作用位点的 Sanger 测序技术。

2.3 病毒耐药基因检测 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)和人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等病毒与多种疾病进展密切相关,在抗病毒治疗过程中易产生耐药突变,导致临床疗效下降。由于病毒体外培养技术要求严苛且周期长,传统耐药性研究方法存在明显局限性。现有分子诊断技术(如 PCR、NGS)虽可检测部分已知耐药突变,但其靶向区域多局限于常见病原体的有限基因位点,对高变异 RNA 病毒的耐药突变谱解析能力明显不足。TGS 的出现,使得无需培养即可实现病毒全基因组耐药突变的高灵敏度检测,同时支持耐药突变的动态追踪与分子溯源研究。Takeda 等^[45]采用 SMRT 测序技术对 6 例未获得持续病毒学应答的 HCV 感染者血清标本进行分析,首次证实 TGS 可通过解析 HCV 单倍型连锁突变模式,精准评估耐药相关变异的协同进化特征,并追踪多重耐药克隆的起源与演化路径。该研究表明,与 NGS 相比,TGS 在耐药突变连锁分析和病毒进化树构建方面具有明显优势。

此外,Xu 等^[46]2021 年的研究进一步验证了 TGS 的临床应用潜力,该研究对 180 份呼吸道标本进行纳米孔 mNGS,结果显示对甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)的检测灵敏度和特异度分别达 83%、93%,并证实 H3N2 亚型对奥司他韦的耐药性与神经氨酸酶基因 S331R 突变显著相关。2023 年,Williams 等^[47]采用 24 h 快速纳米孔 WGS,成功完成 128 份 IAV 阳性标本的基因组组装,其中 75.8% 标本获得了完整的 8 节段基因组数据。值得注意的是,该研究通过对 1 例免疫功能低下患者的连续标本监测,发现奥司他韦耐药突变的动态累积过程,并修正了 PCR 分型失败的标本结果,有效排除了禽流感病毒交叉感染的风险。上述研究结果表明,TGS 技术能够实时识别新发变异和耐药突变,为抗病毒药物的精准调控和疫苗靶点的优化提供了关键分子证据^[46]。

在 HIV 耐药性研究中,有病例联合抗逆转录病毒治疗后病毒载量急剧升高,通过 TGS 技术证实其

耐药性反弹源于优势耐药单倍型的动态更替^[48-49]。类似地,Snell 等^[10]和 Sjaarda 等^[50]利用纳米孔测序技术,在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)持续感染患者中检测到传统测序方法无法识别的低频耐药变异(如瑞德西韦耐药相关突变),证实 TGS 在低频耐药突变检测中的技术优势。

TGS 的另一核心优势在于其可直接解析 RNA 病毒转录组特征。2020 年,Kim 等^[51]应用纳米孔直接 RNA 测序技术,率先绘制了 SARS-CoV-2 RNA 的全长转录组图谱,并鉴定出 41 个保守的 RNA 修饰位点,为阐明 SARS-CoV-2 复制机制和宿主互作模式提供了重要线索。然而,临床标本中病毒 RNA 丰度低且降解率高的问题,严重限制了直接 RNA 测序的基因组解析深度^[51-53]。目前研究主要集中于 RNA 转录后修饰(如 m6A)的功能解析^[54-56],TGS 在耐药性检测中的临床应用仍需进一步优化。

3 总结与展望

TGS 凭借其长读长、实时测序和直接 RNA 测序等核心优势,正在重塑病原微生物耐药性研究的范式。在细菌耐药性研究中,TGS 可精准识别移动遗传元件(如质粒、整合性接合元件)介导的耐药基因水平转移,并解析多重耐药基因簇的共定位特征;对于真菌耐药性研究,该技术跨越复杂重复序列的能力为阐明唑类耐药相关基因(如 CYP51A)的串联扩增机制提供了关键技术支撑;而在病毒耐药性研究中,TGS 不仅能追踪高变异 RNA 病毒(如 HIV、HCV)的低频耐药突变动态,还能直接解析 RNA 修饰对耐药表型的调控机制。这些突破性进展表明,TGS 在耐药基因检测、分子流行病学溯源和新型耐药机制研究中具有独特价值,为临床精准用药和感染防控策略的制定提供了分子水平的决策依据。

然而,TGS 的临床转化仍面临多重技术挑战:(1)核酸质量依赖性。呼吸道拭子(病毒)、组织活检标本(真菌)及脓液标本(细菌)中核酸的高降解率导致读长分布偏倚,影响耐药突变检测灵敏度。(2)数据分析复杂性。细菌移动遗传元件定位、真菌大基因组组装和病毒准种重建均需要专用算法支持,现有分析工具(如 Flye、Medaka)在混合感染情况下假阳性率较高。(3)成本-效益问题。虽然测序成本

持续降低,但临床验证所需的深度测序和生物信息学分析资源仍限制其规模化应用。

针对上述挑战,最新研究提出了多维解决方案:(1)技术联用策略。通过结合靶向富集技术(如多重 PCR、CRISPR-Cas 9 探针)与 NGS 验证,可提高低丰度耐药突变的检测特异性。(2)算法创新。基于机器学习的自适应组装工具(如 Canu)及耐药数据库(CARD、MEGARes)的持续更新,将提升复杂基因组的注释准确性。(3)临床路径优化。建立 TGS 与表型药敏试验(如 MIC)的联合判读标准,结合便携式测序仪(如 MinION)开发,有望实现从标本到报告的床旁快速检测。

未来研究应重点关注以下方向:(1)开发针对低质量临床标本的核酸稳定技术(如微流控单细胞封装方法);(2)构建多组学驱动的 AI 预测模型(如 AlphaFold-Drug),解码未知耐药机制的结构基础;(3)推动 TGS 技术纳入国际抗微生物耐药性监测体系(如 GLASS、CDC AR Lab Network),促进其临床转化应用。通过多学科协作与技术创新,TGS 有望重塑耐药性研究范式,为全球 AMR 防控提供关键技术支持。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. Lancet, 2022, 399(10325): 629 – 655.

[2] World Health Organization. WHO implementation handbook for national action plans on antimicrobial resistance: guidance for the human health sector[M]. Geneva: World Health Organization, 2022.

[3] Burnham CAD, Leeds J, Nordmann P, et al. Diagnosing antimicrobial resistance[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(11): 697 – 703.

[4] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(6): 333 – 351.

[5] Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Science, 2009, 323(5910): 133 – 138.

[6] Jain M, Fiddes IT, Miga KH, et al. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer[J]. Nat Methods, 2015, 12(4): 351 – 356.

[7] Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications[J]. Nat Rev Genet,

2020, 21(10): 597 – 614.

[8] Liu LZ, Lou NJ, Liang QQ et al. Chasing the landscape for intrahospital transmission and evolution of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Sci Bull (Beijing), 2023, 68(23): 3027 – 3047.

[9] Vinu   L, Sater MRA, Herriott IC, et al. Plasmids and genes contributing to high-level quinolone resistance in *Escherichia coli* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56(1): 105987.

[10] Snell LB, Alcolea-Medina A, Charalampous T, et al. Real-time whole genome sequencing to guide patient-tailored therapy of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection [J]. Clin Infect Dis, 2023, 76(6): 1125 – 1128.

[11] Zarske M, Luu HQ, Deneke C, et al. Identification of knowledge gaps in whole-genome sequence analysis of multi-resistant thermotolerant *Campylobacter spp* [J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 156.

[12] Liu C, Yi J, Lu M, et al. Dynamic within-host cefiderocol heteroresistance caused by *bla*_{SHV-12} amplification in pandrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11[J]. Drug Resist Updat, 2024, 73: 101038.

[13] Cohen KA, Manson AL, Desjardins CA, et al. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges[J]. Genome Med, 2019, 11(1): 45.

[14] Kathirvel K, Rudhra O, Rajapandian SGK, et al. Characterization of antibiotic resistance and virulence genes of ocular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains through complete genome analysis[J]. Exp Eye Res, 2021, 212: 108764.

[15] Shin SC, Ahn DH, Kim SJ, et al. Advantages of single-molecule real-time sequencing in high-GC content genomes [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68824.

[16] Jain M, Olsen HE, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. Genome Biol, 2016, 17(1): 239.

[17] Payne A, Holmes N, Rakyan V, et al. BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files[J]. Bioinformatics, 2019, 35(13): 2193 – 2198.

[18] Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Taylor MK, et al. Rapid sequencing of multiple RNA viruses in their native form[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 260.

[19] Simpson JT, Workman RE, Zuzarte PC, et al. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing [J]. Nat Methods, 2017, 14(4): 407 – 410.

[20] Mikheyev AS, Tin MMY. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer[J]. Mol Ecol Resour, 2014, 14(6): 1097 – 1102.

[21] Jain M, Tyson JR, Loose M, et al. MinION analysis and reference consortium: phase 2 data release and analysis of R9.0 chemistry[J]. F1000Res, 2017, 6: 760.

[22] Seki M, Katsumata E, Suzuki A, et al. Evaluation and application of RNA-seq by MinION[J]. DNA Res, 2019, 26(1): 55 – 65.

- [23] Pagès-Gallego M, de Ridder J. Comprehensive benchmark and architectural analysis of deep learning models for nanopore sequencing basecalling[J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 71.
- [24] Sereika M, Kirkegaard RH, Karst SM, et al. Oxford nanopore R10. 4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing [J]. *Nat Methods*, 2022, 19(7): 823–826.
- [25] Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 341.
- [26] Travers KJ, Chin CS, Rank DR, et al. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(15): e159.
- [27] Zhang C, Xiu LS, Li YM, et al. Multiplex PCR and nanopore sequencing of genes associated with antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* directly from clinical samples[J]. *Clin Chem*, 2021, 67(4): 610–620.
- [28] 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.
- [29] Serpa PH, Deng XD, 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.
- [30] Low L, Nakamichi K, Akileswaran L, et al. Deep metagenomic sequencing for endophthalmitis pathogen detection using a nanopore platform[J]. *Am J Ophthalmol*, 2022, 242: 243–251.
- [31] Jain M, Koren S, Miga KH, et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 338–345.
- [32] Botelho J, Lood C, Partridge SR, et al. Combining sequencing approaches to fully resolve a carbapenemase-encoding megaplasmid in a *Pseudomonas shirazica* clinical strain[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 1186–1194.
- [33] Che Y, Xia Y, Liu L, et al. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 44.
- [34] Adam M, Murali B, Glenn NO, et al. Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria[J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 52.
- [35] Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(6): 461–465.
- [36] Hall MB, Rabodoarivelo MS, Koch A, et al. Evaluation of Nanopore sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing and outbreak investigation: a genomic analysis[J]. *Lancet Microbe*, 2023, 4(2): e84–e92.
- [37] Phelan JE, O’Sullivan DM, Machado D, et al. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 41.
- [38] Smith C, Halse TA, Shea J, et al. Assessing nanopore sequencing for clinical diagnostics: a comparison of next-generation sequencing (NGS) methods for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 59(1): e00583–20.
- [39] Chen T, Zhang L, Huang WH, et al. Detection of pathogens and antimicrobial resistance genes in ventilator-associated pneumonia by metagenomic next-generation sequencing approach[J]. *Infect Drug Resist*, 2023, 16: 923–936.
- [40] Charalampous T, Kay GL, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 783–792.
- [41] Zhang T, Huang XY, Xu TM, et al. Pyogenic liver abscess caused by extended-spectrum β -lactamase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* diagnosed by third-generation sequencing: a case report and literature review[J]. *J Int Med Res*, 2023, 51(10): 3000605231206296.
- [42] Colman RE, Seifert M, De la Rossa A, et al. Evaluating culture-free targeted next-generation sequencing for diagnosing drug-resistant tuberculosis: a multicentre clinical study of two end-to-end commercial workflows [J]. *Lancet Infect Dis*, 2025, 25(3): 325–334.
- [43] Rhodes J, Abdolrasouli A, Farrer RA, et al. Author correction: genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 104.
- [44] Fan X, Dai RC, Zhang S, et al. Tandem gene duplications contributed to high-level azole resistance in a rapidly expanding *Candida tropicalis* population [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8369.
- [45] Takeda H, Ueda Y, Inuzuka T, et al. Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45605.
- [46] Xu YF, Lewandowski K, Downs LO, et al. Nanopore metagenomic sequencing of influenza virus directly from respiratory samples: diagnosis, drug resistance and nosocomial transmission, United Kingdom, 2018/19 influenza season[J]. *Euro Surveill*, 2021, 26(27): 20000004.
- [47] Williams TGS, Snell LB, Alder C, et al. Feasibility and clinical utility of local rapid Nanopore influenza A virus whole genome sequencing for integrated outbreak management, genotypic resistance detection and timely surveillance[J]. *Microb Genom*, 2023, 9(8): mgen001083.
- [48] Huang DW, Raley C, Jiang MK, et al. Towards better precision medicine: PacBio single-molecule long reads resolve the interpretation of HIV drug resistant mutation profiles at explicit quasispecies (haplotype) level[J]. *J Data Mining Ge-*

nomics Proteomics, 2016, 7(1): 182.

[49] Monaco DC, Zapata L, Hunter E, et al. Resistance profile of HIV-1 quasiespecies in patients under treatment failure using single molecule, real-time sequencing[J]. AIDS, 2020, 34(15): 2201–2210.

[50] Sjaarda CP, Lau L, Simpson JT, et al. Prevalence of low-frequency, antiviral resistance variants in SARS-CoV-2 isolates in Ontario, Canada, 2020–2023[J]. JAMA Netw Open, 2023, 6(7): e2324963.

[51] Kim D, Lee JY, Yang JS, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome[J]. Cell, 2020, 181(4): 914–921. e10.

[52] Li KK, Lau B, Suárez NM, et al. Direct nanopore sequencing of human *Cytomegalovirus* genomes from high-viral-load clinical samples[J]. Viruses, 2023, 15(6): 1248.

[53] Zhao N, Cao JB, Xu JY, et al. Targeting RNA with next- and third-generation sequencing improves pathogen identification in clinical samples [J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(23): e2102593.

[54] Zhang YX, Jiang J, Ma JM, et al. DirectRMDb: a database of post-transcriptional RNA modifications unveiled from direct RNA sequencing technology[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1): D106–D116.

[55] Naarmann-de Vries IS, Zorbas C, Lemsara A, et al. Comprehensive identification of diverse ribosomal RNA modifications by targeted nanopore direct RNA sequencing and JACUSA2 [J]. RNA Biol, 2023, 20(1): 652–665.

[56] Zhong ZD, Xie YY, Chen HX, et al. Systematic comparison of tools used for m6A mapping from nanopore direct RNA sequencing[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1906.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:刘佩婷,张嘉梁,李子阳,等. 第三代测序技术在病原微生物耐药性分析中的应用[J]. 中国感染控制杂志, 2025, 24(9): 1324–1332. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20257147.

Cite this article as: LIU Peiting, ZHANG Jialiang, LI Ziyang, et al. Application of third-generation sequencing technique in the analysis of antimicrobial resistance of pathogenic microorganisms [J]. Chin J Infect Control, 2025, 24(9): 1324–1332. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20257147.