

sist, 2018, 15: 93-98.

[48] ROULSTON K J, BHARUCHA T, TURTON J F, et al. A case of NDM-carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the UK [J]. JMM Case Rep, 2018, 5(9): e005130.

[49] WEI D D, WAN L G, LIU Y. Draft genome sequence of an NDM-1- and KPC-2-coproducing hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from burn wound infections[J]. Genome Announc, 2018, 6(13): e00192-18.

[50] LEE C R, LEE J H, PARK K S, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 895.

[51] OLIVA A, SCORZOLINI L, CASTALDI D, et al. Double carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a patient with pneumonia: a case report [J]. J Infect, 2017, 74(1): 103-106.

[52] GU D X, HUANG Y L, MA J H, et al. Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from an infant with diarrhea in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(8): 5099-5100.

[53] HUANG Y H, CHOU S H, LIANG S W, et al. Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(8): 2039-2046.

(收稿日期: 2021-09-12 修回日期: 2022-01-11)

• 综 述 •

高通量测序用于结核病诊断的研究进展

王 玺 综述, 兰 箭[△] 审校
重庆医科大学附属第二医院呼吸与危重症医学科, 重庆 400000

摘 要: 结核病是一类常见的感染性疾病, 它具有传染性、隐匿性和慢性化的特点, 早期诊断有利于阻断结核病传播, 并减少耐药结核发生率。目前应用于临床的结核病检测方法在早期诊断方面有明显的局限性。高通量测序又称为二代测序或下一代测序(NGS), 作为新兴的基因测序方法, 有望提高结核病早期诊断率。NGS 不仅能快速检出结核分枝杆菌复合群, 也能进行耐药结核菌的分子分型, 这有助于制订有效的抗结核治疗方案。由于缺少大规模临床研究和统一标准, 高通量测序作为结核病的检测方法还需要进一步评估和规范。

关键词: 高通量测序; 结核病; 结核分枝杆菌; 耐药结核; 早期诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 07. 022 **中图法分类号:** R446. 5

文章编号: 1673-4130(2022)07-0868-06 **文献标志码:** A

Research progress of high-throughput sequencing in the diagnosis of tuberculosis WANG Xi, LAN Jian[△]

Department of Respiratory and Critical Medicine, the Second Affiliated Hospital of
Chongqing Medical University, Chongqing 400000, China

Abstract: Tuberculosis is a kind of common infectious disease, which has the characteristics of infectivity, concealment and chronicity. Early diagnosis is very important to block the transmission of tuberculosis and reduce drug-resistant tuberculosis. However, the current detection methods are not ideal for the early diagnosis of tuberculosis. High-throughput sequencing, also known as second-generation sequencing or next-generation sequencing(NGS), as a new method of gene sequencing, is expected to improve the rate of early diagnosis of tuberculosis. It can not only quickly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex, but also carry out molecular typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, which is helpful to develop an effective anti-tuberculosis treatment plan. Due to the lack of large-scale clinical studies and unified standards, high-throughput sequencing as a detection method for tuberculosis needs to be further evaluated and standardized.

Key words: high-throughput sequencing; tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; drug-resistant tuberculosis; early diagnosis

结核病是结核分枝杆菌感染所致的疾病, 人型结核菌为人类主要致病型。结核分枝杆菌可以感染机

[△] 通信作者, E-mail: lanjian69@sina. com。
本文引用格式: 王玺, 兰箭. 高通量测序用于结核病诊断的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(7): 868-872.

体除毛发、指甲以外的任何部位,其中以肺部感染最常见。结核病位列全球第 13 大死因,据《2021 全球结核病报告》显示,2020 年全球结核潜伏感染人群接近 20 亿,新发患者 987 万,发病率为 127/10 万;我国估算的新发患者数为 84.2 万,发病率为 59/10 万,在 30 个结核病高负担国家中我国高居第 2 位,仅次于印度^[1]。目前结核病的辅助诊断方法很多,涉及病原学、影像学、分子生物学、免疫学以及病理学等,但诊断效能欠佳。结核菌培养是确诊结核病的金标准,但灵敏度仅为 45%~60%^[2-4],临床诊断往往需要联合多种方法进行检测分析,并常常采取诊断性抗生素治疗方式来辅助临床判断,导致结核病诊断的延误和治疗的延后,因此提高检测方法的灵敏度和特异度对结核病的防控意义重大。NGS 采用基因测序方法能快速检出病原微生物,本文就 NGS 应用于结核病诊断的研究进展进行综述。

1 NGS 概述

基因组测序共经历了三代技术发展。一代测序的优点是准确度高、容易掌握,缺点是耗时长、过程复杂、费用高。二代测序,也就是 NGS,它以循环微阵列法为原理,包括样本处理、核酸提取、基因文库生成和生物信息学途径分析几个步骤^[5]。NGS 一次能对高达几百万条的 DNA 分子测序,使物种的基因组或转录组测序变得容易。NGS 用于病原学的检测包括靶向下一代测序(tNGS)、宏基因组下一代测序(mNGS)、全基因组测序(WGS)等。tNGS 是对富集后的目的 DNA 序列进行高通量测序,只能用于核酸序列已知的病原体的检测;mNGS 是直接提取样本中全部微生物群落基因的 DNA 进行测序,理论上一次性可以检出全部的微生物序列;WGS 是对整个基因组进行检测,可以检测编码区、非编码区、调控区,以及一些结构变异。相对于一代测序,NGS 的准确性略有降低,但通量高、耗时短、成本低,更适用于临床使用。三代测序是以单分子测序技术为基础的新一代测序方式,不需要经过 PCR 扩增,主要分为单分子荧光测序技术和纳米孔测序技术,近年来三代测序逐渐控制了成本,但在精度上仍需进行更多的研究与验证^[6-7],目前较少应用于临床。

NGS 包括 DNA 测序和 RNA 测序,DNA 测序可检测除 RNA 病毒以外的病原微生物,RNA 测序可检测 RNA 病毒,同时还可以反映病原微生物转录活性^[8]。mNGS 可以检测来自人类、动物、食品和环境的各种标本,在不预先了解病原体类型的情况下能直接检出所有微生物序列,包括病毒、细菌、真菌和寄生虫。由于不同病原微生物有不一样的生长条件,常规的标准培养往往不能培养出标本中的所有病原微生物,所以 NGS 将来有可能成为微生物实验室的主导技术^[9-10]。NGS 还能对艾滋病、结核病、流感、脊髓灰

质炎、疟疾等传染性疾病预防监测^[11-12]。多项研究指出,在感染性疾病中 mNGS 的灵敏度高于传统培养法^[13-14],尤其是用于血液、支气管肺泡灌洗液和痰液标本的检测^[15]。在肺部感染性疾病的病原学检测中,NGS 比传统方法检测范围更广、检出率更高、耗时更短,且能明显提高了真菌感染的诊断率^[16-18]。相较于普通病原菌,结核分枝杆菌更难培养,因此 NGS 用于检测结核分枝杆菌的检测是极具前景的。

2 常用的结核病检测方法

目前关于结核病的检测方法很多,包括涂片法、培养法、病理活检、影像学检查以及结核分枝杆菌核酸检测、纯化蛋白衍生物(PPD)试验、 γ 干扰素释放试验(IGRA)、结核抗体检测等,确诊结核病常常需要上述检测方法的联合使用^[19]。

涂片法的依据是结核分枝杆菌的抗酸特性,是指将样本进行涂片、染色,根据染色情况判定结果。该法简便、快捷,但灵敏度受样本质量的影响大,且不能鉴别结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌^[20]。培养法特异度高,但由于结核分枝杆菌生长缓慢,不管是罗氏固体培养基(2~4 周)还是改良液体培养基(1~2 周),都无法避免培养周期长的问题,不能快速得到结果^[19]。阳性培养标本还需要进一步进行耐药表型分析,即结核分枝杆菌药敏试验(DST),以了解结核分枝杆菌是否存在耐药,但需耗时 2~4 周。在结核病高负担国家,培养法的低效能限制了其在早期诊断中的临床应用^[12]。病理活检也是诊断结核病的方法之一,结核病的病理改变表现为上皮细胞样肉芽肿性炎,光学显微镜下可见大小不等、数量不同的坏死性和非坏死性的肉芽肿,同时需要在病变区找到病原菌,并采用抗酸染色方法来确定^[19]。但部分患者活检难度大,且增加了诊治风险,从而限制了临床上的广泛开展。胸部 X 片是临床筛查肺结核的最常用方法,但容易漏检,相比之下,胸部 CT 可以发现更小、更隐匿的病灶。肺结核病灶具有多形性的特点,容易出现空洞、硬结及钙化灶,常位于上叶尖后段及下叶背段,但影像学不典型者也并非罕见,常常需要与其他病原菌感染相鉴别,因此影像学检查只能作为诊断结核的辅助证据。

核酸检测技术的发展在一定程度上弥补了传统病原学检查的局限性,灵敏度和特异度均有所提高。常用方法包括聚合酶链式反应(PCR)、环介导等温扩增反应(LAMP)、利福平耐药快速检测(Xpert MTB/RIF)等。LAMP 无法对检测结果进行耐药性判断^[21],而 Xpert MTB/RIF 可同时用于结核病的诊断和耐利福平结核菌的判断^[1]。LAMP 与 Xpert MTB/RIF 在结核病的诊断中有较好的一致性,明显优于涂片法^[22-23];在临床诊断患者中,两者灵敏度与培养法接近,特异度高于培养法;但在有抗结核活性

药物暴露史的患者中,两者灵敏度优于培养法^[22]。抗结核药物通过抑制细胞壁、蛋白质、酶的合成等原理降低结核分枝杆菌菌株活性^[24-27],而核酸可以较长时间保留在死亡菌株中,同时也说明分子生物学方法不能替代结核菌培养用于药物疗效监测。由于 LAMP 操作简单、成本低,当 Xpert MTB/RIF 由于条件限制不能开展时,LAMP 可以取代涂片显微镜检查,提高结核病诊断能力^[22]。此外,核酸检测技术还应用于耐药结核的基因型分析,包括基于反向杂交的线探针分析(LPA)和半定量 Xpert MTB/RIF^[28],但临床上的应用不如表型分析广泛。

结核分枝杆菌感染人体后会发生一系列免疫反应,基于此的检验方法有 PPD 试验和 IGRA。PPD 试验是基于Ⅳ型超敏反应的皮肤试验,根据硬结及水泡的情况在试验后 72 h 判定结果,该法干扰因素较多,有出现假阳性或假阴性可能,且不能区分活动性感染与潜伏感染,灵敏度较低。IGRA 包括结核菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT)和酶联免疫吸附测定(ELISA),它们都有很高的灵敏度,且 T-SPOT 法特异度稍高于 ELISA 法,且同样不能区分活动性感染与潜伏感染^[29]。血清结核分枝杆菌抗体在体内存在时间很长,即使结核病痊愈后仍可以检测到,尽管检测敏感度在 70%左右,但不能作为判断结核病活动性的指标^[30]。

3 NGS 在结核病诊断中的应用

3.1 NGS 检测结核分枝杆菌 多项研究报道,NGS 检测结核分枝杆菌的特异度高达 98%以上,而灵敏度明显优于传统培养法和 Xpert MTB/RIF^[31-33]。NGS 在不同部位来源的样本检测中也存在差异,肺样本的检测灵敏度明显高于肺外样本,分别为 58.5%和 43.1%;痰液检测灵敏度为 52.3%,略低于培养法的 60.9%;但在培养阴性的支气管肺泡灌洗液和浆膜腔液体样本中,NGS 阳性检出率仍有 28.8%,提示 NGS 有利于菌阴结核病的诊断^[32],且 NGS 对肺外结核的诊断效率仍高于传统培养法和 Xpert MTB/RIF^[37-36]。NGS 检测需要 32~36 小时,液体培养基培养法需要 14~55 天,虽然涂片法只需 1~2 天,但它的灵敏度及特异度均不如 NGS,因此 NGS 有利于活动性肺结核的早期诊断^[32]。

WGS 通过检测单核苷酸多态性(SNP)的多寡,可以用来评估和鉴别结核病患者是否合并感染、复发或者再感染。如果变量位置显示具有不同等位基因的群体共存,则可以在大量测序数据中检测到合并感染^[37-38]。对复发结核患者前后两次的标本进行检测,也可判断是复发还是再次感染。一项摩尔多瓦的研究对患者进行基因测序显示,在多个耐药结核样本之间的 SNP 差异不超过 10 个,从基因层面证实了人与人之间的传播^[39]。痰液和支气管肺泡灌洗液都可以

作为 NGS 检测的样本,但痰液更容易被污染,在变异分析中会引入更大的偏差,出现不真实的 SNP。对于痰稀少的疑似肺结核病例,支气管肺泡灌洗液或肺组织是更好的结核分枝杆菌检测标本,但这类标本都包含大量的人类基因,需进行严格的质量控制以减少宿主基因组的影响^[40]。由于部分标本的黏液含量高,结核分枝杆菌可能发生聚集而分布不均,导致结核菌计数不准确,因此样本需要预处理,通过耗尽其他细胞 DNA 来均化和富集结核杆菌,以提高 NGS 诊断率^[41]。除此之外,抗结核治疗会显著降低 NGS 的检出率,这提示 NGS 样本需要在经验性治疗前收集,并且样本如果在检测或运输过程中被污染同样会降低 NGS 诊断率^[33-34]。另外,由于结核分枝杆菌是胞内菌,体液中的病原体含量较少,在检测过程中需对细胞进行破壁处理,这可能会破坏遗传物质,导致检出率降低。

3.2 NGS 对耐药结核菌的识别 结核病疫情难控制的原因和耐药菌株的增加密切相关,耐药结核患者数量增加的主要原因是适当的治疗和耐药结核分枝杆菌分离株的社区传播。在基因组水平上,结核分枝杆菌的耐药性是由单个或多个结核分枝杆菌基因的遗传变异造成的。NGS 用于鉴别结核分枝杆菌分离株的分子分型技术,有基于 IS6110 的限制性片段长度多态性分析(IS6110-RFLP)、分枝杆菌散布重复单位-可变数目串联重复序列测定(MIRU-VNTR)、WGS 等。IS6110-RFLP 分型在 20 世纪 90 年代是公认的结核病基因分型的金标准^[42],但它费力耗时,对操作人员要求高,而且对 IS6110 拷贝数在 5 个或以下的菌株没有足够的分辨能力^[43]。2009 年欧洲疾病预防控制中心(ECDC)提出将 MIRU-VNTR 作为结核病基因分型的金标准。MIRU-VNTR 分型结果格式简单,以 DNA 扩增为基础,不需要对结核分枝杆菌进行培养,并缩短了实验室检测时间^[44]。2019 年,ECDC 提议在一些优先病原体的监测和暴发调查中使用 WGS。一项评估 WGS 在实验室诊断分枝杆菌性能的研究显示,93%的分枝杆菌与常规实验室鉴定结果一致,93%的结核分枝杆菌复合群药敏预测与 DST 结果相符合^[45]。WGS 用于分子分型可获得高分辨能力的精确遗传信息,但目前微生物数据库尚缺乏广度和精度,且没有统一的解读标准,因此普及推广面临着挑战^[43,46]。

由于结核病耐药是由结核分枝杆菌基因突变引起的,因此使用 NGS 进行耐药监测有很大优势。NGS 的成本与 DST 相当,且耗时短,它可以识别所有可能导致耐药的突变,不管是已知的还是未知的,同时还可以区分改变表型的耐药突变和不改变表型的沉默突变^[28,41,47]。在利福平耐药的检测上,Xpert MTB/RIF 检测耐利福平结核菌的特异度(99.5%)比

NGS 高,但灵敏度较低(61.8%)^[34]。一项研究采用 NGS 检测了 1000 多份痰菌阳性样本,发现结核病患者对利福平、氟喹诺酮、吡嗪酰胺的耐药率低,但对利福平敏感患者对异烟肼的耐药率较高。如果使用 Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药性,将导致漏诊很多耐异烟肼结核病患者^[34]。这也说明了传统的分子技术不足以评估全部的耐药突变,需要进行多重分析。NGS 检测一线抗结核药物和部分二线抗结核药物耐药性的准确率很高^[48],表型结果与基因型结果的一致性较好,但由于抗药性遗传基础不完全清楚,故基因型方法还不能完全取代传统的表型方法^[12,48-49]。有报道分析了 88 株再培养的耐多药肺结核病(MDR-TB)菌株,比较 NGS 和一代测序对于吡嗪酰胺耐药的突变检测,两者结果符合率为 89%,NGS 不仅证实了一代测序检测到的吡嗪酰胺耐药的主要突变基因,即 *pncA* 基因,还发现了几个新的混合菌株突变,解决了部分基因型与表型结果不一致的问题^[50]。随着 NGS 更多应用于结核病的耐药性检测,以及基因序列数据信息的不断补充和完善,NGS 有望用于结核病耐药的定量解释,以指导制定后续治疗方案^[51]。与 DST 相比,WGS 可以了解不同地区的结核分枝杆菌耐药模式和在传播过程中不断获得的耐药性信息,这更有利于结核病疫情的控制^[52]。

4 总结和展望

我国是结核病高负担国家,由于传统检测方法的局限性,结核病的早期诊断和防控仍面临很大挑战。NGS 检测特异度高,且灵敏度高于培养法和 Xpert MTB/RIF,能快速检测样本中所有的微生物序列,在结核病的早期诊断和鉴别诊断上有很大的价值。NGS 可以对多种样本进行检测,对肺结核和肺外结核的诊断都有很大帮助;同时还能鉴别结核患者是合并感染、复发或者再感染;能识别所有可能导致耐药的突变,确定耐药菌株的传播模式,有利于阻断结核病的传播。

目前 NGS 缺乏全面且高精度的数据库,对检测出的基因阈值不能进行量化分级,对检测结果没有统一的解读标准,对操作没有统一的流程,这些都是 NGS 广泛推行面临的问题。虽然 NGS 在结核菌感染中的研究日益增多,但高中低风险区都缺乏多中心和大规模的前瞻性研究,使其诊断效能和可信度都大打折扣。NGS 是医学、分子生物学、生物信息学等多学科发展进步的成果,目前用于结核病的早期诊断和耐药结核的鉴定还欠成熟,其发展和完善还需要多学科的努力和协作。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021[R]. Geneva:WHO,2021.
[2] SHI C L, HAN P, TANG P J, et al. Clinical metagenomic

sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Infect,2020,81(4):567-574.
[3] LIU X, CHEN Y, OUYANG H, et al. Tuberculosis diagnosis by metagenomic next-generation sequencing on bronchoalveolar lavage fluid: a cross-sectional analysis[J]. Int J Infect Dis,2021,104(1):50-57.
[4] QIU C, PAN N, ZHOU Y, et al. Application value of SAT-TB combined with acid-Fast staining in the diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis[J]. Biomed Res Int,2020,2020:3620425.
[5] MIAO Q, MA Y, WANG Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. Clin Infect Dis,2018,67(suppl 2):S231-S240.
[6] LU H, GIORDANO F, NING Z. Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics,2016,14(5):265-279.
[7] WHITWORTH H S, BADHAN A, BOAKYE A A, et al. Clinical utility of existing and second-generation interferon- γ release assays for diagnostic evaluation of tuberculosis: an observational cohort study[J]. Lancet Infect Dis, 2019,19(2):193-202.
[8] 赵建玉,周倩倩,鲁辛辛,等.高通量测序技术在确认病原微生物中存在的问题与挑战[J].临床检验杂志,2021,39(1):6-11.
[9] CUMMINGS L A, HOOGESTRAAT D R, RASSOULIAN-BARRETT S L, et al. Comprehensive evaluation of complex polymicrobial specimens using next generation sequencing and standard microbiological culture[J]. Sci Rep,2020,10(1):5446.
[10] ROSSEN J W A, FRIEDRICH A W, MORAN-GILAD J, et al. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology[J]. Clin Microbiol Infect,2018,24(4):355-360.
[11] GOLDBERG B, SIGHTIG H, GEYER C, et al. Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics[J]. mBio,2015,6(6):e01888-15.
[12] MCNERNEY R, ZIGNOL M, CLARK T G, et al. Use of whole genome sequencing in surveillance of drug resistant tuberculosis[J]. Expert Rev Anti Infect Ther,2018,16(5):433-442.
[13] MIAO Q, MA Y, WANG Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. Clin Infect Dis,2018,67(suppl 2):S231-S240.
[14] ZHANG H C, AI J W, CUI P, et al. Incremental value of metagenomic next generation sequencing for the diagnosis of suspected focal infection in adults[J]. J Infect,2019,79(5):419-425.
[15] DUAN H, LI X, MEI A, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases[J]. BMC Infect Dis,2021,21(1):62.

- [16] WANG J, HAN Y, FENG J, et al. Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis[J]. BMC Pulm Med, 2019, 19(1): 252.
- [17] XIE Y, DU J, JIN W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia; China, 2010-2018[J]. J Infect, 2019, 78(2): 158-169.
- [18] 陈涔, 李园园, 潘频华, 等. 二代测序技术在重症社区获得性肺炎诊断中的意义[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(4): 335-340.
- [19] 王黎霞, 成诗明, 周林, 等. 中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断: WS 288-2017[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(7): 642-652.
- [20] DATTA S, SHAH L, GILMAN R H, et al. Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis: a systematic review and pairwise and network meta-analysis[J]. Lancet Glob Health, 2017, 5(8): 760-771.
- [21] 林晶晶, 夏露, 刘旭晖, 等. 环介导等温扩增技术用于结核病诊断的价值评估[J]. 复旦学报(医学版), 2021, 48(1): 104-110.
- [22] KIM C K, CHO E A, SHIN D M, et al. Comparative evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for detecting pulmonary tuberculosis [J]. Ann Lab Med, 2018, 38(2): 119-124.
- [23] PHETSUKSIRI B, KLAYUT W, RUDEEANEKSIN J, et al. The performance of an in-house loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples in comparison with Xpert MTB/RIF, microscopy and culture[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2020, 62: e36.
- [24] UNISSA A N, SUBBIAN S, HANNA L E, et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Genet Evol, 2016, 45: 474-492.
- [25] STEPHENSON A L, WU W, CORTES D, et al. Tendon injury and fluoroquinolone use: a systematic review[J]. Drug Saf, 2013, 36(9): 709-721.
- [26] VIANNA J F, BEZERRA K, OLIVEIRA J, et al. Binding energies of the drugs capreomycin and streptomycin in complex with tuberculosis bacterial ribosome subunits [J]. Phys Chem Chem Phys, 2019, 21(35): 19192-19200.
- [27] LUAN G, DRLICA K. Fluoroquinolone-Gyrase-DNA cleaved complexes[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1703: 269-281.
- [28] HIRANI N, JOSHI A, ANAND S, et al. Detection of a novel mutation in the rpoB gene in a multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis isolate using whole genome next generation sequencing[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 22: 270-274.
- [29] WANG L, TIAN X D, YU Y, et al. Evaluation of the performance of two tuberculosis interferon gamma release assays (IGRA-ELISA and T-SPOT. TB) for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Clin Chim Acta, 2018, 479: 74-78.
- [30] 林志新, 王显胜, 徐建芳. 肺结核患者血清结核抗体 IgG 的影响因素的分析[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(4): 551-552.
- [31] ZHU N, ZHOU D, LI S. Diagnostic accuracy of metagenomic next-generation sequencing in sputum-scarce or smear-negative cases with suspected pulmonary tuberculosis[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 9970817.
- [32] JIN W, PAN J, MIAO Q, et al. Diagnostic accuracy of metagenomic next-generation sequencing for active tuberculosis in clinical practice at a tertiary general hospital [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(17): 1065.
- [33] ZHOU X, WU H, RUAN Q, et al. Clinical evaluation of diagnosis efficacy of active Mycobacterium tuberculosis complex infection via metagenomic next-generation sequencing of direct clinical samples[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 351.
- [34] KAYOMO M K, MBULA V N, ALONI M, et al. Targeted next-generation sequencing of sputum for diagnosis of drug-resistant TB: results of a national survey in Democratic Republic of the Congo[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10786.
- [35] CHEN P, SUN W, HE Y. Comparison of metagenomic next-generation sequencing technology, culture and GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis[J]. J Thorac Dis, 2020, 12(8): 4014-4024.
- [36] 孙雯雯, 顾瑾, 范琳. 宏基因组二代测序对不同类型结核病的诊断价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44(2): 96-100.
- [37] BRYANT J M, HARRIS S R, PARKHILL J, et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with Mycobacterium tuberculosis: a retrospective observational study[J]. Lancet Respir Med, 2013, 1(10): 786-92.
- [38] GUERRA-ASSUNCAO J A, HOUBEN R M, CRAMPIN A C, et al. Recurrence due to relapse or reinfection with Mycobacterium tuberculosis: a whole-genome sequencing approach in a large, population-based cohort with a high HIV infection prevalence and active follow-up[J]. J Infect Dis, 2015, 211(7): 1154-63.
- [39] WOLLENBERG K, HARRIS M, GABRIELIAN A, et al. A retrospective genomic analysis of drug-resistant strains of M. tuberculosis in a high-burden setting, with an emphasis on comparative diagnostics and reactivation and re-infection status[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 17.
- [40] ZHU N, ZHOU D, LI S. Diagnostic accuracy of metagenomic next-generation sequencing in sputum-scarce or smear-negative cases with suspected pulmonary tuberculosis[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 9970817.
- [41] VOTINTSEVA A A, BRADLEY P, PANKHURST L, et al. Same-day diagnostic and surveillance data for tuberculosis via whole-genome sequencing of direct respiratory samples[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(5): 1285-1298.
- [42] DEVAUX I, MANISSERO D, FERNANDEZ K, et al. Surveillance of extensively drug-resistant tuberculosis in Europe, 2003 – 2007 [J]. Euro Surveill, 2010, 15(11): 19518.

- (7):1-28.
- [3] 胡学锋,吴霜,翁贇琦,等.疟疾全球流行现状及我国输入性疫情分析[J].疾病监测,2021,36(10):1-6.
- [4] COLLINS W E,JEFFERY G M. Plasmodium ovale: parasite and disease[J]. Clin Microbiol Rev,2005,18(3):570-581.
- [5] MILNER D A. Malaria Pathogenesis [J]. Cold Spring Harb Perspect Med,2018,8(1):a025569.
- [6] OYEDEJI S I,AWOBODE H O,OJURONGBE O,et al. Molecular identification and characterization of plasmodium ovale curtisi in field isolates from symptomatic children in North-Central Nigeria [J]. Acta Parasitologica, 2021,66(3):915-924.
- [7] 朱学涛,胡文霞.恶性疟原虫感染一例[J].中华传染病杂志,2015,33(9):564-565.
- [8] 钱香,叶琴,芮刚,等. Sysmex 系列全自动血细胞分析仪异常散点图筛查疟原虫感染 2 例及文献复习[J]. 实用医学杂志,2018,34(4):687-688.
- [9] 王晓欧,陈小剑,舒旷怡,等.血液分析仪散点图异常对疟疾诊断的应用价值[J].中国现代医生,2011,49(36):80-81.
- [10] BUORO S,MANENTI B,SEGHEZZI M,et al. Abnormal scattergrams and cell population data generated by fully automated hematological analyzers: new tools for screening malaria infection[J]. Int J Lab Hematol,2018,40(3):326-334.
- [11] 唐凤,唐建霞,陆凤,等.万孚疟原虫检测试剂盒检测卵形疟原虫效果评价及影响因素分析[J].中国血吸虫病防治杂志,2016,28(2):146-150.
- [12] 胡旭初.进入疟疾研究的后基因组时代[J].国外医学(寄生虫病分册),2002,29(3):116-123.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.抗疟药使用规范:WS/T 485-2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [14] 戴燕,潘志文,张志英,等. XE-2100 血细胞分析仪嗜酸粒细胞异常散点图报警筛选疟原虫感染的研究[J].中华检验医学杂志,2008,31(7):763-766.
- [15] 吴冬妮,夏菁,李凯杰,等.万孚疟原虫检测试剂盒(RDTs)在湖北省输入性疟疾检测中的应用研究[J].公共卫生与预防医学,2020,31(3):46-49.
- [16] KOTEPUI M,MASANGKAY F R,KOTEPUI K U,et al. Misidentification of Plasmodium ovale as Plasmodium vivax malaria by a microscopic method:a meta-analysis of confirmed P. ovale cases[J]. Sci Rep,2020,10(1):21807.
- [17] World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria[M]. 3rd ed. Geneva:WHO,2015.
- (收稿日期:2021-09-12 修回日期:2021-12-28)
-
- (上接第 872 页)
- [43] EI P W,AUNG W W,LEE J S,et al. Molecular strain typing of Mycobacterium tuberculosis: a review of frequently used methods[J]. J Korean Med Sci,2016,31(11):1673-1683.
- [44] DE BEER J L,KODMON C,VAN DER WERF M J,et al. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011 [J]. Euro Surveill, 2014, 19 (11): 20742.
- [45] PANKHURST L J,DEL OJO ELIAS C,VOTINTSEVA A A,et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing:a prospective study[J]. Lancet Respir Med,2016;4(1):49-58.
- [46] 毕铭轶,汪春付,连建奇,等.宏基因组测序在感染性疾病中的应用与反思[J].中华临床感染病杂志,2019,12(5):379-384.
- [47] DAUM L T,KONSTANTYNOVSKA O S,SOLODIANKIN O S,et al. Next-Generation sequencing for characterizing drug resistance: conferring Mycobacterium tuberculosis genes from clinical isolates in the Ukraine[J]. J Clin Microbiol,2018,56(6):e00009-18.
- [48] NAMBIAR R,SHAH D,AJBANI K,et al. Evaluation of pyrosequencing for extensive drug resistance-defining anti-tuberculosis drugs for use in public healthcare[J]. Tuberculosis(Edinb),2018,110:86-90.
- [49] KO D H,LEE E J,LEE S K,et al. Application of next-generation sequencing to detect variants of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis:genotype-phenotype correlation[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob,2019,18(1):2.
- [50] MANINGI N E,DAUM L T,RODRIGUEZ J D,et al. Improved Detection by next-generation sequencing of pyrazinamide resistance in mycobacterium tuberculosis isolates[J]. J Clin Microbiol,2015,53(12):3779-3783.
- [51] TORNHEIM J A,STARKS A M,RODWELL T C,et al. Building the framework for standardized clinical laboratory reporting of next-generation sequencing data for resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis complex[J]. Clin Infect Dis,2019,69(9):1631-1633.
- [52] YANG C,LUO T,SHEN X,et al. Transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Shanghai, China: a retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation[J]. Lancet Infect Dis,2017,17(3):275-284.
- (收稿日期:2021-10-12 修回日期:2022-02-16)