

化,未能进一步进行内在分子生物学机制的研究,故无法阐明肠道微生态在肺腺癌的发生、发展中的具体作用;(3)由于双歧四联活菌片应用于肺腺癌的报道相对较少,文献中没有各阶段患者的最佳剂量作为参考。大剂量使用双歧四联活菌片是否效果更佳,其合并其他疾病的患者是否安全等问题还需要更多的基础实验研究来进行阐明。

综上所述,双歧四联活菌片在肺腺癌患者治疗中可以调节肠道微生态,提高患者免疫力,辅助抗肿瘤治疗,同时安全性较好。

参考文献

[1] 黄忠向. 肺癌的分子病理诊断现状及研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(24): 45-46.

[2] RECKAMP K L. Advances in immunotherapy for non-small cell lung cancer [J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2015, 13(12): 847-853.

[3] PUTNAM J B. Lung cancer[J]. Semin Surg Oncol, 2015, 18(2): 89-90.

[4] 刘冬祺, 陈润泽, 王东霞, 等. 肠道菌群与肿瘤的相关性[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(7): 128-131.

[5] 詹雅萍, 李娴, 朱香顺, 等. 双歧杆菌四联活菌辅助治疗对高尿酸血症的临床分析[J]. 临床荟萃, 2020, 35(4): 344-347.

[6] 郑跃杰, 黄志华. 关注菌群、微生物组与益生菌[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(2): 91-94.

[7] 崔鹤滕, 冀寿健, 徐倩, 等. 国际抗癌联盟-美国癌症联合委员会第七版与第八版肺癌分期系统对肺神经内分泌肿瘤预后价值的验证[J]. 癌症进展, 2019, 17(22): 2676-

2681.

[8] 袁丽, 杨悦. 药品不良反应/事件之“严重(Serious)”与“重度(Severe)”的界定研究[J]. 中国药物警戒, 2016, 13(8): 484-488.

[9] 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(8): 1982-1986.

[10] 管乐静, 王欣. 抗肿瘤药物在化疗中的不良反应及护理[J]. 全科护理, 2008, 6(32): 2969-2969.

[11] MARCUS J L, LEYDEN W A, CHAO C R, et al. Immunodeficiency, AIDS-related pneumonia, and risk of lung cancer among HIV-infected individuals[J]. Aids, 2017, 31(7): 989-993.

[12] 姜陈波, 杭铎. 双歧杆菌和乳酸菌 β -半乳糖苷酶转糖基作用的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 335-341.

[13] 金雷, 李蜀豫, 代凤玲, 等. 艾普拉唑四联疗法联合双歧杆菌在幽门螺杆菌补救方案中的疗效评价[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(4): 256-262.

[14] 李灼非, 邓兴明, 李粤, 等. 益生菌对结肠癌化疗及术后肠道菌群变化的影响以及与免疫功能下降的关系的研究[J]. 贵州医药, 2018, 42(12): 1478-1480.

[15] 高举梅, 刘毅, 刘冰, 等. 双歧杆菌四联活菌片对类风湿关节炎患者 TNF- α 和脂联素水平的影响[J]. 泰山医学院学报, 2017, 38(7): 761-764.

[16] 郑方义. 双歧杆菌四联活菌片在肝硬化伴肠功能紊乱治疗中的应用[J]. 中国乡村医药, 2015, 22(19): 13-14.

[17] 苏琴, 王琳琳, 李丽. 心理干预护理联合癌痛规范化治疗对晚期癌症患者生活质量的效果评价[J/CD]. 实用临床护理学电子杂志, 2018, 3(19): 144-146.

(收稿日期: 2021-09-12 修回日期: 2021-12-28)

• 短篇论著 •

1 例输入性罕见远期复发卵型疟原虫多重感染的实验室检测分析

薛卫斌¹, 王浩园², 张婷婷¹, 蒋莉娟¹, 蒋一斓¹, 罗福康¹ Δ

1. 重庆市第九人民医院医学检验科, 重庆 400700; 2. 西南大学医学研究院, 重庆 400700

摘要:目的 对 1 例疟疾复发患者通过实验室多种方法,并结合其临床症状,做出快速准确的诊断。方法 对患者进行血常规检查、疟疾快速诊断试剂盒(RDTs)检测和形态学检查,结合其临床症状进行初步诊断;再通过巢式 PCR 和一代测序的方法,诊断虫种并鉴定亚型。结果 通过血常规散点图和 RDTs 检测的结果,初步判断为疟原虫感染,且排除恶性疟疾的可能;形态学检查判断为卵形疟原虫多重感染,一代测序结果经 NCBI 中的核酸数据库比对后,鉴定为卵形疟原虫 *P. ovale curtisi* 亚型。结论 本实验室通过 3 种方法在短期内明确诊断此病例为输入性罕见远期复发卵型疟原虫多重感染,并鉴定出了虫种亚型。

关键词:疟原虫; 卵形疟; 多重感染; 远期复发

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 07. 026

中图法分类号:R38

文章编号:1673-4130(2022)07-0884-05

文献标志码:A

卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)是 4 种主要人体疟原虫之一,其分布范围较小,主要在热带西非流行,

Δ 通信作者, E-mail: 2860788276@qq. com。

通过受感染的按蚊 (*Anopheles*) 叮咬传播^[1-2]。卵型疟原虫感染导致的疟疾 (简称卵型疟) 在我国极为罕见, 近年来随着跨境人流量的增加, 输入性病例数量有所上升, 我国输入性疟疾病例主要来源于非洲, 占 87.81%, 且以恶性疟疾为主^[3]。由于卵形疟原虫的形态、感染的发作周期、再燃和复发机制都与间日疟原虫极为相似, 并且因复发卵形疟患者的原虫密度又较低^[4-5], 因此要作出正确的诊断难度大, 也容易漏诊和误诊。笔者对重庆市第九人民医院 (下称本院) 收治的 1 名输入性卵形疟远期复发的患者采用了几种实验室诊断方法进行检测, 最终确诊, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 患者为男性, 汉族, 46 岁, 四川省泸县人。2021 年 5 月 18 日, 自觉不适, 畏寒、发热; 此症状隔日发作, 并逐渐出现乏力、活动后气促, 于 2021 年 5 月 22 日发作后于本院进行治疗。入院时体温 40 °C, 呼吸 23 次/分, 心率 144 次/分, 血压 141/87 mm Hg。神志清楚, 精神一般, 对答切题, 全身浅表淋巴结未扪及, 肝、脾肋下未扪及。

患者既往病史: 2016 年 6 月至 2019 年 3 月, 患者曾在位于非洲中部西海岸的加蓬共和国工作, 为初次发病。在当地进行了检查疟疾快速诊断试剂盒 (RDTs) 检测为阳性, T1、T2 阳性情况未知, 形态学检查未做, 当地医生结合症状诊断为恶性疟原虫感染导致的疟疾 (简称恶性疟), 用喹啉、青蒿琥酯抗疟治疗, 并用其他药物进行了对症辅助治疗。3 d 后患者病情好转, 于是停药。几个月后, 患者又出现疟疾症状, 自行服用抗疟药物 (药物名称不详) 后好转, 病情有反复。2019 年下半年回国, 直到 2020 年 3 月才再次出现症状, 患者未立即就医, 而是自行服用复方蒿甲醚本苄醇治疗, 然后好转。

辅助检查: 2021 年 5 月 22 日血常规检查显示, 红细胞计数 $4.48 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 137 g/L, 血小板计数 $120 \times 10^9/L$, 白细胞计数 $7.82 \times 10^9/L$, 中性粒细胞百分数 85.9%, 淋巴细胞百分数 8.4%, 超敏 C 反应蛋白 36.8 mg/L, 总蛋白 62.5 g/L, 清蛋白 36.5 g/L。超敏肌钙蛋白、B 型脑钠肽、甲型流感病毒抗原和乙型流感病毒抗原的检测结果均为阴性。因患者既往有疟疾病史, 于是行血液疟原虫镜检, 结果为阳性, 并提示可见小滋养体、配子体, 虫种暂时未知。

1.2 方法

1.2.1 复查血常规 将患者 5 月 22 日的血常规标本, 使用 Sysmex 公司 XN-3100 全自动血液分析流水线系统及原装配试剂进行血常规项目的复检。

1.2.2 RDTs 检测 使用万孚疟原虫检测试剂盒进

行检测, 严格按说明书进行操作。

1.2.3 显微镜镜检 用 Sysmex SP-50 全自动血涂片制备仪制备厚、薄血涂片并进行瑞-姬染色, 再通过奥林巴斯 CX-43 型号的显微镜进行观察, 并用 MShot Image Analysis System 软件拍照进行记录。

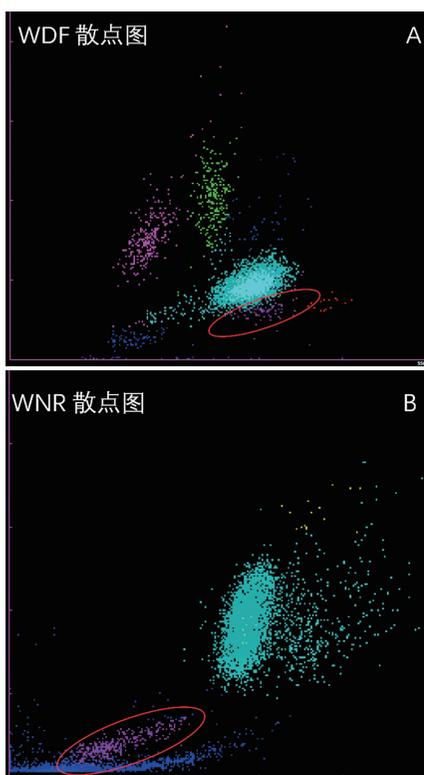
1.2.4 疟原虫巢式 PCR 和一代测序检测 采集 1 管患者的静脉全血标本, 使用巢式 PCR 结合一代测序技术来鉴定疟原虫的虫种及亚型。根据参考文献^[6], 合成鉴定疟原虫属的通用引物 (rPLU) 和 4 种疟原虫 (*P. falciparum*、*P. malariae*、*P. vivax*、*P. ovale curtisi*、*P. ovale wallikeri*) 的特异性引物 (分别为 rMAL、rVIV、rOVA、rOVA_v), 见表 1, 引物均由北京擎科生物科技有限公司重庆分公司合成。采用血液 DNA 小量提取试剂盒提取患者外周血 DNA。巢式 PCR 第一轮 PCR 扩增体系 (25 μ L) 包括 2 \times T5 Direct PCR Mix (血液) 12.5 μ L, rPLU 正、反向引物各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。第一轮扩增程序为 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 一共进行 35 个循环; 72 °C 最后延伸 3 min, 4 °C 保存扩增产物。然后对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 (1.5% 琼脂糖)。巢式 PCR 第二轮扩增体系 (25 μ L) 包括 2 \times T5 Direct PCR Mix (血液) 12.5 μ L, 特异性正、反向引物各 1 μ L, DNA 模板 (为第一轮扩增产物) 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。第二轮扩增程序和第一轮相同。对第二轮巢式 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 (1.5% 琼脂糖)。采用 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒切胶回收第二轮扩增的目标条带。测序 PCR 扩增体系 (10.3 μ L) 包括特异性反向引物 1 μ L, 测序缓冲液 1.9 μ L, BigDye 一代测序试剂 (BDT) 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 4.9 μ L。测序 PCR 扩增程序为 96 °C 预变性 1 min, 96 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 5 s, 60 °C 延伸 4 min, 共进行 25 个循环; 4 °C 保存。采用磁珠法纯化测序 PCR 产物, 将纯化后的测序 PCR 产物 13 μ L 上机测序 (使用的测序仪型号为 ABI 3500)。使用 NCBI 在线比对工具 nBlast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将一代测序的结果与其核酸数据库进行比对, 判断疟原虫类型。

2 结果

2.1 血常规复查的结果 血常规结果与初次结果基本相符, 但 Q-Flag 报警提示有受感染的红细胞 (iR-BC); WDF 通道的散点图, 位于中性粒和嗜酸性粒细胞散点群之间, 集中在中性粒细胞散点群下方有一群异常散点群; WNR 通道的散点图, 位于白细胞散点群左下方的区域也出现一群异常散点群, 见图 1。

表 1 疟原虫巢式 PCR 检测的引物序列及扩增片段大小

引物名称		引物序列(5'-3')	扩增片段大小(bp)
rPLU	正向	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	1 200
	反向	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC	
rFAL	正向	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT	205
	反向	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	
rMAL	正向	ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC	144
	反向	AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	
rVIV	正向	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC	120
	反向	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	
rOVA	正向	ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA	778
	反向	GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA ATG	
rOvAv	正向	ATC TCC TTT ACT TTT TGT ACT GGA GA	782
	反向	CGA AAA GGA CAC TAT AAT GTA TCC TAA TA	



注:A为WDF通道散点图;B为WNR通道散点图;圈内为仪器检测中显示为浅紫色的异常散点群。

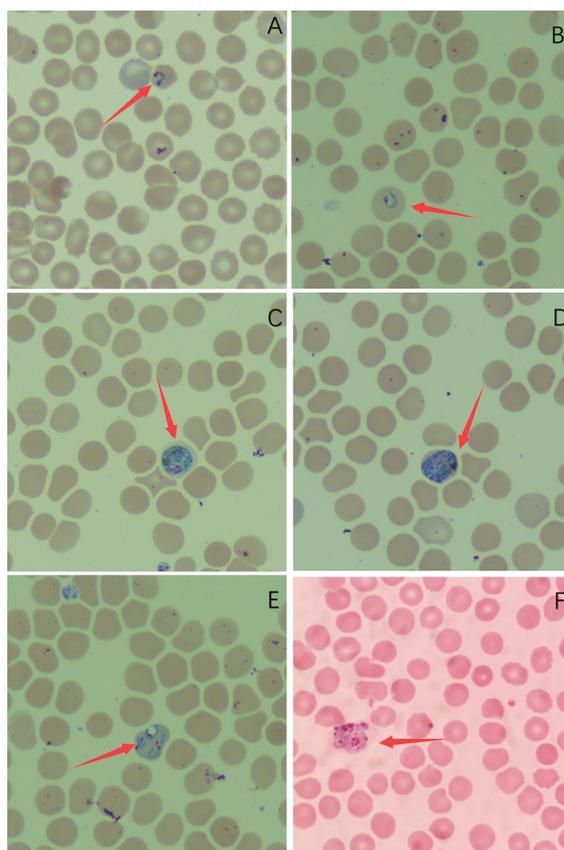
图 1 两个通道的异常散点图

2.2 RDTs 检测 结果为 T2 阳性,根据说明书的解释,提示感染除恶性疟原虫以外的其他 3 种疟原虫中的单种或多种。

2.3 形态学检查 查见卵形疟环状体,见图 2A;查见大滋养体,见图 2B;查见雌配子体,见图 2C;查见雄配子体,见图 2D;查见多重感染形态,见图 2E、2F。

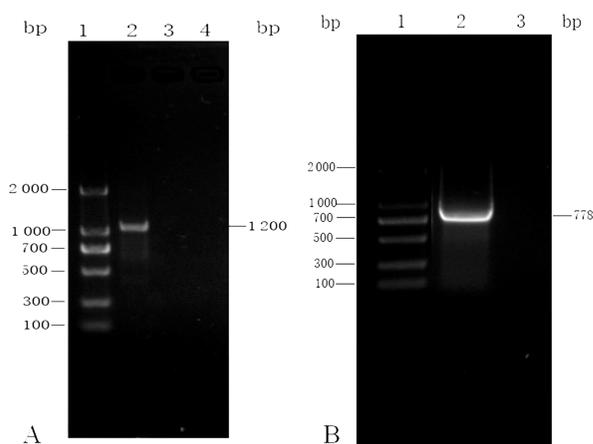
2.4 巢式 PCR 电泳及一代测序结果 第一轮巢式 PCR 扩增产物电泳图,见图 3A,产物大小为 1 200 bp,与目标条带大小相符,说明该患者有疟原虫属的

感染。第二轮巢式 PCR 扩增产物电泳图,见图 3B,产物大小为 778 bp,与预期相符,说明该患者感染的疟原虫类型属于 *P. ovlae curtisi*。第二轮巢式 PCR 产物的一代测序结果及 NCBI 在线比对工具验证了该患者感染的疟原虫属于 *P. ovlae curtisi* 亚种,与形态学检测结果一致。



注:A中箭头所指为卵形疟环状体;B中箭头所指为卵形疟大滋养体;C中箭头所指为卵形疟雌配子体;D中箭头所指为卵形疟雄配子体;E中箭头所指为卵形疟多重感染;F中箭头所指为卵形疟多重感染。

图 2 形态学检查(瑞-姬染色,×1000)



注: A 为第一轮巢式 PCR 产物电泳图; B 为第二轮巢式 PCR 产物电泳图; 泳道 1 是分子标准条带; 泳道 2 为由患者外周血 DNA 标本扩增得到的产物。

图 3 巢式 PCR 产物电泳图

2 讨论

因 WDF 溶血剂作用较弱, 疟原虫感染的红细胞不会被溶血剂破坏。故不同感染阶段的红细胞对 WDF 散点图的干扰也不同, 疟原虫小滋养体期感染红细胞内容物的复杂程度和细胞体积小于中性粒细胞, 核酸含量与中性粒细胞类似, 但其细胞内容物的复杂程度和核酸含量小/少于嗜酸性粒细胞, 这一部分感染的红细胞在散点图上会出现在中性粒细胞和嗜酸性粒细胞之间的区域^[7-10]。WNR 溶血剂作用强于 WDF 溶血剂, 可破坏被疟原虫感染的红细胞膜, 使其细胞变为含有疟原虫的裸核, 裸核的体积和核酸含量均低于白细胞, 也不会干扰白细胞的计数和嗜碱性粒细胞的计数^[7-10]。有研究表明, 万孚疟原虫检测试剂盒对卵形疟原虫的总检出率为 70.0%, 其检出率与原虫密度、疟原虫乳酸脱氢酶 (pLDH) 浓度关系密切, 与 pLDH 基因多态性无关^[11]。

卵形疟环状体与间日疟较相似, 细胞质较大呈淡蓝色环状, 约为红细胞直径的 1/3, 1 个红核。卵形疟大滋养体与三日疟较相似, 红细胞稍显肿胀, 边缘整齐或不规则样; 虫体小于正常红细胞, 呈圆形、带状或大环状, 但较大。卵形疟雌配子体与三日疟和间日疟相似, 感染虫体的红细胞涨大, 一般呈卵圆形或者椭圆形, 呈“彗星”样或伞状^[5]; 虫体圆形, 胞质深蓝色, 核结实并偏于一侧, 虐色素多而分散, 被感染的红细胞形态稍规则, 并略大于正常红细胞, 虫体红核蓝紫, 胞核偏于一侧明显, 核染色质致密, 细胞质几乎胀满整个红细胞。雄配子体与雌配子体的形态大致相同, 主要区别在于雄配子体的胞核位于中央, 而雌配子体的胞核偏于一侧。卵形疟通常寄生于红细胞内的原虫只有 1 个, 偶有 2 个 (多重感染), 而此病例中, 多次查到有 2 个以上的原虫寄生于 1 个红细胞内的形态, 是典型的多重感染, 红细胞呈卵圆形稍肿大和褪色;

仔细观察有 4 个虫体寄生在内, 实属罕见; 而被感染的红细胞胀大且不规则, 褪色明显, 内含有大、小滋养体及未成熟裂殖体, 更是罕见。

巢式 PCR 技术在第一轮扩增产物的电泳结果出来后, 条带大小与预期相符, 证明是疟原虫属疾病; 第二轮电泳结果显示 *P. ovale curtisi* 亚型的特异性序列被扩增出来, 证明引物序列可靠, 并初步判断该疟原虫类型属于 *P. ovale curtisi* 亚型; nBlast 比对结果分数越高, E 值 (Expect value) 越小, 同源性越高; 因此可知此样本的 DNA 序列与卵形疟的序列相似程度较高, 最终判断该样本是卵形疟 *P. ovale curtisi* 亚型^[12]。最后, 重庆市疾控中心也确诊此病例为卵形疟。

抗疟药使用应遵循安全、有效、合理、规范的原则。应根据疟原虫虫种及其对抗疟药的敏感性和患者的临床症状与体征合理选择药物, 并应严格掌握剂量、疗程和给药途径, 以保证治疗和预防效果并延缓抗药性的产生^[13]。所以能否快速明确诊断出疟原虫的虫种及其重要。

Sysmex 血液分析仪的 iRBC 和寄生虫感染红细胞 (pRBC) 的报警值得高度警惕, 很有必要建立在血常规的复检规则中, 以防止疟原虫的漏检; 戴燕等^[14]曾经报道, 对异常散点图的分析, 也可快速、简便的筛查疟原虫, 也可防止疟原虫的漏检; RDTs 操作方便, 判读结果快, 但对检测非恶性疟的特异性不强, 可作为镜检法鉴别虫种的辅助工具^[15]; KOTEPUI 等^[16]也曾报道, 通过形态学方法将卵形疟误认为间日疟是很常见的, 并导致全世界卵形疟原虫病例的报告不足, 但形态学检查任然是诊断疟疾及其虫种的最理想且廉价的方法; 巢式 PCR 和一代测序技术特异性好, 准确率高, 尤其对鉴别虫种亚型有着很好的适用性, 但其设备昂贵, 无法配备所有基层实验室; 实验室的工作人员与医生和患者的沟通也很重要, 可联系临床资料得到正确的诊断方向。

对此罕见病例, 本实验室利用现有条件对其进行了多种方法诊断, 以形态学的诊断最为迅速、准确且廉价, 其他方法各有优劣, 适合对其进行辅助鉴别诊断。根据 2015 年 WHO 发布的《疟疾治疗指南》(第三版) 中的建议, 实验室常规检查方法推荐形态学和 RDTs 联合检测^[17], 所以加强基层实验室人员对疟原虫理论及形态学的培训尤为重要。

参考文献

[1] OKAFOR C N, FINNIGAN N A. *Plasmodium ovale* malaria [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
 [2] Mace K E, Arguin P M, Tan K R. Malaria Surveillance—United States, 2015 [J]. MMWR Surveill Summ, 2018, 67

(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 an-

ti-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)