

分子诊断技术在结核性脊柱炎和布鲁杆菌性脊柱炎早期鉴别诊断中的应用和发展

卡地尔别克·木沙¹, 王浩^{2*}

¹新疆医科大学研究生学院, 新疆 乌鲁木齐

²新疆维吾尔自治区人民医院脊柱二科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2023年10月6日; 录用日期: 2023年10月30日; 发布日期: 2023年11月6日

摘要

布鲁杆菌性脊柱炎与结核性脊柱炎都是细菌感染引起的两种特异性感染性疾病, 布鲁杆菌性脊柱炎与脊柱结核在临床表现上和影像学等表现上存在着许多相似性, 在布鲁杆菌性脊柱炎发病率较低的地区, 临床上容易将布鲁杆菌性脊柱炎误诊为脊柱结核导致患者病程迁延, 治疗效果较差。因此, 早期、快速、准确地鉴别诊断对该两种疾病的治疗和管理至关重要, 虽然血清学检查和细菌培养仍是实验室诊断不可缺少的手段, 但存在阳性率低、培养时间长等缺点, 易延误诊治。近年来, 随着分子诊断技术的进步, 有潜力解决这些方法的局限性成为布鲁杆菌性脊柱炎和结核性脊柱炎鉴别诊断最有用的检测方法之一。根据患者的情况个性化选择诊断效能高、成本效益佳的分子检测技术, 以及联合应用不同的检测技术进一步提高布鲁杆菌性脊柱炎和结核性脊柱炎早期的检出率是目前亟待解决的问题。

关键词

分子诊断技术, 布鲁杆菌性脊柱炎, 结核性脊柱炎

Application and Development of Molecular Diagnostic Techniques in the Early Differential Diagnosis of Tuberculous Spondylitis and Brucellosis Spondylitis

Kaderbek Musha¹, Hao Wang^{2*}

¹Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

²Department of Spinal Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang

*通讯作者。

文章引用: 卡地尔别克·木沙, 王浩. 分子诊断技术在结核性脊柱炎和布鲁杆菌性脊柱炎早期鉴别诊断中的应用和发展[J]. 临床医学进展, 2023, 13(11): 17259-17265. DOI: 10.12677/acm.2023.13112418

Abstract

Brucellosis spondylitis and tuberculosis spondylitis are two specific infectious diseases caused by bacterial infections. Brucellosis spondylitis and tuberculosis spondylitis have many similarities in clinical manifestations and imaging, etc. In areas where the incidence rate of brucellosis spondylitis is relatively low, it is easy to misdiagnose brucellosis spondylitis as spinal tuberculosis, resulting in prolonged course of the disease and poorer therapeutic effects. Therefore, early, rapid and accurate differential diagnosis is crucial to the treatment and management of these two diseases. Although serologic examination and bacterial culture are still indispensable means of laboratory diagnosis, they have the shortcomings of low positivity rate and long culture time, which are prone to delay the diagnosis and treatment. In recent years, with advances in molecular diagnostic techniques, there is potential to address the limitations of these methods to become one of the most useful tests for the differential diagnosis of *Mycobacterium brucei* spondylitis and tuberculosis spondylitis. Individualized selections of molecular tests with high diagnostic efficacy and cost-effectiveness according to the patient's condition, as well as the combined application of different tests to further improve the early detection rate of brucellosis and tuberculous spondylitis, are issues that need to be urgently resolved at the present time.

Keywords

Molecular Diagnostic Technology, Brucella Spondylitis, Tuberculosis of the Spine

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

布鲁氏菌病是一种由布鲁氏菌感染引起的人畜共患传染病,在世界各地都很常见。近年来,随着畜牧业的发展,布鲁氏菌病患者逐渐增多,发病率为2%~53% [1]。当布鲁氏菌感染侵入人体时,它会通过血液传播到各个器官,导致骨关节、肝胆、心血管和中枢神经系统疾病等损害[2]。如果它侵入脊柱,临床上称为布鲁氏菌性脊柱炎,或布鲁氏菌性脊柱炎(brucellar spondylitis, BS) [3],其中腰椎受累的频率(60%)高于胸椎(19%)和颈椎(12%) [4]。布鲁氏菌病引起的炎症常累及脊髓和神经根,可引起神经系统症状,严重者可导致截瘫。

脊柱结核是最常见的肺外结核和骨关节结核,约占全部骨关节结核病例的50% [5] [6],脊柱结核可累及脊柱的所有节段,受累节段的特点是骨破坏、干酪样坏死和脓肿形成,容易发生神经功能障碍和后凸。它们是瘫痪的常见原因,对患者的影响很大[7] [8] [9]。因此,临床早期鉴别诊断这两种疾病对提供有效治疗和改善患者预后具有重要的现实意义,传统的诊断技术在鉴别诊断脊柱结核与布鲁杆菌性脊柱炎时存在一定的局限,分子诊断技术作为一种快速发展的新型诊断技术,在诊断脊柱结核及布鲁杆菌性脊柱炎中扮演着越来越重要的角色。本文旨在介绍临床中常见的几种分子诊断技术,以帮助临床工作者了解并灵活使用分子诊断技术对布鲁杆菌性脊柱炎与脊柱结核进行鉴别诊断,降低误诊的发生率,使患者尽可能早期接受正规治疗,从而尽快改善患者的症状。

分子诊断是利用重组 DNA 技术, 直接从基因水平检测微生物病原体的检测手段。1972 年, GOFF 和 BERG 完成了世界上首次 DNA 分子的重组, 标志着基因检测技术从此诞生[10]。随着聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及宏基因组测序技术等技术的不断出现和发展, 分子诊断技术得到不断完善。

2. 标准 PCR 技术

为了快速、准确诊断人布鲁氏菌病, 国外开发了一种使用一对引物的 PCR 检测方法, 可扩增布鲁氏菌的目标基因组序列。引物对包括编码 16SrRNA [11] [12]、外膜蛋白(omb2a、omb2b) [13] [14]、31-kDa 免疫源性流产布鲁氏菌蛋白(BCSP 31) [15] [16]、16S-23S 核糖体 DNA 间隔区[17]和插入序列(IS711) [18]。研究表明, 与传统方法相比, 标准的 PCR 技术似乎是一种更灵敏的技术, 不仅可用于诊断首次感染, 还可用于复发的早期检测[19] [20]。一些研究小组还评估了标准 PCR 作为人布鲁氏菌病诊断工具与传统方法相比的性能。他们的研究表明, 对于有临床症状和体征但血清学结果呈阴性的患者, 标准的 PCR 技术是一种很有前途的诊断工具, 可以准确、早期诊断布鲁氏菌性脊柱炎。

Hance 等[21]最先把 PCR 技术应用到结核杆菌的诊断, 扩增出一 383bp 序列, 编码 65KD 分枝杆菌抗原, 再用探针杂交, 敏感度达到样品细菌数少于 100 个即可被检出的水平。对于骨关节结核基因诊断的报道始于 1944 年 Lombard EH 等[22]利用基因诊断技术检测 24 名疑似骨结核患者的骨髓液, 其阳性率达到 42%, 明显高于涂片抗酸染色法。发现基因检测技术对诊断骨关节结核具有重要应用价值。作为简单有效的诊断方法, 标准 PCR 技术在脊柱结核的诊断中已发挥了显著作用。

3. 实时荧光 PCR

与标准 PCR 相比, 实时荧光 PCR 在确定单个血液样本中核酸的定量以及数据自动化方面是一种有价值的技术。随着实时 PCR 热循环仪和试剂价格的下降, 现在有更多的人可以使用这项技术来测量 DNA 拷贝数、mRNA 表达水平和病毒滴度[23]。近年来, 针对布鲁氏菌 16S-23S 内转录间隔区(ITS)及编码 omp25、omp31、BCSP 31、IS711 的基因, 开发了用于临床样品中布鲁氏菌种类快速检测和分化的实时荧光定量 PCR。实时聚合酶链反应具有高重复性、快速、敏感和特异性。此外, 该检测方法易于标准化, 可将实验室工作人员感染的风险降至最低。因此, 它对于人布鲁氏菌病的初步诊断和区分非活动性、血清阳性和活动性都是一种有用的方法。此外, Surucuoglu 等人将 TaqMan 实时 PCR 技术与使用不同临床形式布鲁氏菌病患者血清样本的传统方法进行了比较。计算出该方法的敏感性为 88%, 特异性为 100%, 阳性预测值为 100%, 阴性预测值为 83% [24]。Alayed Y 等人进一步研究了几种检测(培养、ELISA 和实时 PCR)联合使用外周血样本支持布鲁氏菌病不同临床表现诊断的潜力。他们发现, 如果凝集试验结果为阴性, 建议采用实时 PCR、ELISA 和培养方法[25]。与标准 PCR 一样, 实时 PCR 的效率也取决于引物的特异性。Kattar MM 等人利用 16S-23S ITS、omp25 和 omp31 的杂交探针和引物, 开发了三种用于人布鲁氏菌病属水平诊断的实时 pcr。结果表明采用 16S-23S ITS 引物及其探针的实时 PCR 最敏感, 显示其在临床实验室诊断人布鲁氏菌病的潜力[26]。这些结果表明, 实时荧光定量 PCR 检测具有较高的种特异性和选择性, 是诊断布鲁杆菌性脊柱炎的有效工具。

利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(gene X-pert MTB/RIF)是一种基于实时聚合酶链式反应 (Real-time PCR)的快速分子诊断技术, 是 WHO 推荐的肺外结核病和利福平耐药诊断技术(Boehme 等, 2010; Walzl 等, 2018) [27] [28]。它将核酸提取技术和荧光定量 PCR 相结合, 以 rpoB 基因为靶基因, 可在 2~3 小时内检测出活动性结核病感染和利福平耐药性, 操作步骤加快了临床诊断速度。X-pert MTB/RIF 基因为骨关节结核的诊断和及时治疗提供了早期证据。同时, 可以检测一线核心药物利福平的耐药性

(Rahman 等人, 2016) [29], 并可以根据检测结果确定早期抗结核治疗的治疗计划。具有较高的临床诊断和治疗应用价值。

4. 多重聚合酶链反应

为了克服检测成本的固有缺点, 多重 PCR 已被开发用于检测病毒, 细菌和其他感染因子。多重聚合酶链反应技术的优点是成本最低, 一次可识别多种病原体[30]。

2003 年, Ibeck PS 等人开发并应用了基于 perosamine 合成酶基因的多重 PCR 诊断布鲁氏菌[31]。El Kholly AA 等还建立了使用 2 组引物(B4/B5 和 JPF/JPR)诊断埃及活动性人布鲁氏菌病的多重 PCR 技术[32]。他们发现这种技术具有很高的灵敏度、特异性和准确性, 可以作为培养方法诊断人类布鲁氏菌病的重要替代方法。此外, 多重 PCR 测定可用于同时检测和分型存在于临床样品中的布鲁氏菌种类。2007 年, Imaoka K 等人开发了一种多重 PCR 方法, 在一个反应管中鉴定了四种主要的布鲁氏菌属。采用四对引物分别靶向 bcs31、omp2b、omp2a 和 omp31 基因。该检测提供的及时和准确的信息将对追踪感染源有很高的价值, 并可能有助于快速诊断人类布鲁氏菌病。此外, 已经报道了几种多重 PCR 同时检测结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)复合体和布鲁氏菌, 针对 IS711、bcs31 和 omp2a 基因检测布鲁氏菌。

针对 IS6110、senX3-regX3 和 cfp31 基因检测结核分枝杆菌复合体。MPCR 采用 IS6110、蛋白 b 和 MPB64 基因进行扩增, 在结核性脑膜炎的诊断中表现出良好的灵敏度(86.38%)和特异度(100.0%) [33]。与痰液不同, 结核性脑膜炎的标本含菌量少, 与脊柱结核的标本有一定程度上的相似性, 这使得 MPCR 成为诊断脊柱结核的潜在工具; 与涂片和单纯 PCR 技术相比, MPCR 有更好的敏感度和特异度且结果获取更快速, 但其对脊柱结核的诊断价值需要进一步研究。结果表明, 该技术是鉴别肺外结核与合并布鲁氏菌病的一种实用方法。

5. 宏基因组测序技术(metagenomic next generation sequencing, mNGS)

宏基因组测序是非常有效的工具, 能一次在运行中生成数百万到数十亿的读取量, 表征出样品中的 DNA 或 RNA, 从而分析患者样品中的整个微生物组, 并可识别未知病原或已知变异较大病原, 减少逐一排除可疑病原所耗费的时间及人力物力, 是预防和控制传染病的一个潜在的诊断平台[34]。相比于传统细菌培养, mNGS 基于对标本中提取的核酸进行二代测序, 无需根据可疑病原微生物经验选择特定培养基、抗原和(或)抗体及引物, 检测无偏倚性, 不受培养环境、培养时间等因素影响, 能通过对核酸序列的测序, 直接分析出标本中的病原微生物种类及丰度, 对死亡的病原微生物同样能进行有效检测, 能检测已知或未知病原微生物, 因此在快速鉴定新发或罕见病原微生物方面有独特优势。且 mNGS 实际检测时间最快仅需 15~24 h, 相较于传统细菌培养 62~140 h 的阳性报告时间, 可实现快速报告。

Shi 等[35]在一项观察性研究中发现 mNGS 在脊柱非结核感染性疾病诊断中最终临床确诊脊柱非结核特异性感染 11 例, 包括真菌 4 例、布鲁杆菌 6 例、支原体 1 例。这些结果表明 mNGS 技术为布氏杆菌性脊柱炎和脊柱结核的鉴别诊断提供了一种新的思路, 可以取患者血液、脑脊液、病灶渗出液等进行检测, 早期明确诊断, 选择有效的治疗方案, 减轻患者的痛苦。

6. 评价 PCR 结果对患者治疗及随访的影响

大多数布鲁氏菌病患者在接受持续时间和联合抗生素治疗后会复发。因此, 有必要评估治疗失败或复发的进展。常规的方法很难诊断这些复发。先前的一些研究报道了 PCR 在治疗后随访和复发诊断中的应用。Queipo-Ortuño MI 等人研究了 PCR 检测在布鲁氏菌病患者治疗后随访和复发中的作用。他们在复发时 PCR 检测呈阳性, 而在完成复发治疗后 PCR 检测呈阴性。Nimri LF 在复发病例中获得阳性 PCR 结

果, 表明该检测可作为确认治疗后布鲁氏菌病复发的有用工具。Navarro 等人还开发了一种实时 PCR 检测方法, 用于监测布鲁氏菌治疗期间和治疗后随访期间血液中布氏菌 DNA 负荷的演变。该试验对初始感染和复发均显示 100% 的分析敏感性。此外, Mitka S 等[36]人结果表明, 成功完成治疗的患者的所有随访样本的 PCR 检测结果均为阴性, 而治疗后第一年复发的患者(包括复发次数)的所有随访样本的 PCR 检测结果均为阳性。

GeneXpert MTB/RIF 以半巢式实时定量 PCR 为基础, 其在痰标本中检测结核病以及 RIF 耐药性的敏感性和特异性较高, 成为 WHO 推荐的检测结核病的方法, 同时也推荐用于诊断肺外结核(Falzon *et al.*, 2017) [37]。Liu 等[38]使用 Xpert MTB/RIF 作为中国地区骨关节结核诊断的快速诊断检测工具, 发现可以在检查过程中快速评估患者的风险, 具有较高的诊断价值和准确性, 可以缩短结核病的诊断和治疗时间, 并联合其他检测方法, 综合判断耐多药和广泛耐药结核病的诊断和治疗。为临床提供有效的结核病诊断和治疗应用。

7. 结语与展望

与传统的诊断技术(如微生物培养、血凝抑制试验和 ELISA)相比, 分子诊断技术为布氏杆菌性脊柱炎和脊柱结核的鉴别诊断提供了更好的选择。根据病人的需求精心选择和组合不同的分子诊断技术, 可以提供及时准确的传染病病原诊断, 并促进精确治疗, 以有效控制疾病。但近年来的临床实践也证明其仍具有一定的局限性。首先针对 PCR 技术缺点主要表现在假阳性。PCR 的敏感性极高, 微量的污染即可导致假阳性的发生, 这是 PCR 技术假阳性发生的最主要原因。所以在标本收集至整个操作过程中的各个环节必须保证严格的“无菌操作”, 以避免污染; 同时提高引物特异性也是避免假阳性发生的关键。而 mNGS 虽然在结核耐药诊断研究中意义重大, 但由于目前 mNGS 技术尚不够完善, 还在不断发展, 特别是其价格昂贵、对操作的要求较高、重复性差等使其应用范围受到很大限制, 这些问题主要需从样品的制备、探针合成固定、分子的标记等方面着手解决。总之, 随着基因组计划的深入开展和科技的不断发展, 分子诊断技术将会更加完善并在临床上逐步得到普及。

参考文献

- [1] Deng, Y., *et al.* (2019) Research Progress on Brucellosis. *Current Medicinal Chemistry*, **26**, 5598-5608. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180510125009>
- [2] Baldi, P.C. and Giambartolomei, G.H. (2013) Pathogenesis and Pathobiology of Zoonotic Brucellosis in Humans. *Revue Scientifique et Technique*, **32**, 117-125. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2192>
- [3] Yagupsky, P., Morata, P. and Colmenero, J.D. (2019) Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **33**, e00073-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-19>
- [4] Erdem, H., *et al.* (2015) Comparison of Brucellar and Tuberculous Spondylodiscitis Patients: Results of the Multicenter “Backbone-1 Study”. *The Spine Journal*, **15**, 2509-2517. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2015.09.024>
- [5] Thammaroj, J., *et al.* (2014) MR Findings in Spinal Tuberculosis in an Endemic Country. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology*, **58**, 267-276. <https://doi.org/10.1111/1754-9485.12157>
- [6] Garg, R.K. and Somvanshi, D.S. (2011) Spinal Tuberculosis: A Review. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, **34**, 440-454. <https://doi.org/10.1179/2045772311Y.0000000023>
- [7] Xu, Z., *et al.* (2015) One-Stage Lumbopelvic Fixation in the Treatment of Lumbosacral Junction Tuberculosis. *European Spine Journal*, **24**, 1800-1805. <https://doi.org/10.1007/s00586-015-3863-8>
- [8] Wang, B., *et al.* (2018) Recurrent Complex Spinal Tuberculosis Accompanied by Sinus Tract Formation: Causes of Recurrence and Clinical Treatments. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 6933. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25142-z>
- [9] Khanna, K. and Sabharwal, S. (2019) Spinal Tuberculosis: A Comprehensive Review for the Modern Spine Surgeon. *The Spine Journal*, **19**, 1858-1870. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2019.05.002>
- [10] Goff, S.P. and Berg, P. (1976) Construction of Hybrid Viruses Containing SV40 and Lambda Phage DNA Segments

- and Their Propagation in Cultured Monkey Cells. *Cell*, **9**, 695-705. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90133-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90133-1)
- [11] Nimri, L.F. (2003) Diagnosis of Recent and Relapsed Cases of Human Brucellosis by PCR Assay. *BMC Infectious Diseases*, **3**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-3-5>
- [12] Romero, C., et al. (1995) Specific Detection of Brucella DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 615-617. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.615-617.1995>
- [13] Bardenstein, S., et al. (2002) Identification of the *Brucella melitensis* Vaccine Strain Rev.1 in Animals and Humans in Israel by PCR Analysis of the *PstI* Site Polymorphism of Its *omp2* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 1475-1480. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.1475-1480.2002>
- [14] Leal-Klevezas, D.S., et al. (1995) Single-Step PCR for Detection of Brucella Spp. from Blood and Milk of Infected Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 3087-3090. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.12.3087-3090.1995>
- [15] Queipo-Ortuño, M.I., et al. (1997) Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 2927-2930. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2927-2930.1997>
- [16] Matar, G.M., Khneisser, I.A. and Abdelnoor, A.M. (1996) Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton Brucella Antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 477-478. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.2.477-478.1996>
- [17] Fox, K.F., et al. (1998) Identification of *Brucella* by Ribosomal-Spacer-Region PCR and Differentiation of *Brucella canis* from Other *Brucella* Spp. Pathogenic for Humans by Carbohydrate Profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 3217-3222. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3217-3222.1998>
- [18] Cloeckeaert, A., Grayon, M. and Grepinet, O. (2000) An IS711 Element Downstream of the *bp26* Gene Is a Specific Marker of *Brucella* Spp. Isolated from Marine Mammals. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, **7**, 835-839. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.5.835-839.2000>
- [19] Elfaki, M.G., et al. (2005) Evaluation of Culture, Tube Agglutination, and PCR Methods for the Diagnosis of Brucellosis in Humans. *Medical Science Monitor*, **11**, MT69-MT74.
- [20] Morata, P., et al. (1999) Posttreatment Follow-Up of Brucellosis by PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 4163-4166. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.4163-4166.1999>
- [21] Hance, A.J., et al. (1989) Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of Mycobacterial DNA. *Molecular Microbiology*, **3**, 843-849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00233.x>
- [22] Lombard, E.H., et al. (1994) The Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Bone Marrow Aspirate Using the Polymerase Chain Reaction. *Tubercle and Lung Disease*, **75**, 65-69. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0962-8479(94)90106-6)
- [23] Ginzinger, D.G. (2002) Gene Quantification Using Real-Time Quantitative PCR: An Emerging Technology Hits the Mainstream. *Experimental Hematology*, **30**, 503-512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
- [24] Surucuoglu, S., et al. (2009) Evaluation of Real-Time PCR Method for Rapid Diagnosis of Brucellosis with Different Clinical Manifestations. *Polish Journal of Microbiology*, **58**, 15-19.
- [25] Alsayed, Y. and Monem, F. (2012) Brucellosis Laboratory Tests in Syria: What Are Their Diagnostic Efficacies in Different Clinical Manifestations? *The Journal of Infection in Developing Countries*, **6**, 495-500. <https://doi.org/10.3855/jidc.2453>
- [26] Kattar, M.M., et al. (2007) Development and Evaluation of Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays on Whole Blood and Paraffin-Embedded Tissues for Rapid Diagnosis of Human Brucellosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **59**, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.002>
- [27] Boehme, C.C., et al. (2010) Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *The New England Journal of Medicine*, **363**, 1005-1015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>
- [28] Walzl, G., et al. (2018) Tuberculosis: Advances and Challenges in Development of New Diagnostics and Biomarkers. *The Lancet Infectious Diseases*, **18**, e199-e210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30111-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30111-7)
- [29] Rahman, A., et al. (2016) Comparison of Xpert MTB/RIF Assay and GenoType MTBDRplus DNA Probes for Detection of Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE*, **11**, e0152694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152694>
- [30] Elnifro, E.M., et al. (2000) Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**, 559-570. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559>
- [31] Lübeck, P.S., et al. (2003) A Multiplex PCR-Detection Assay for *Yersinia enterocolitica* Serotype O:9 and *Brucella* Spp. Based on the Perosamine Synthetase Gene. In: Skurnik, M., Bengoechea, J.A. and Granfors, K., Eds., *The Genus Yersinia. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 529, Springer, Boston. https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1_89
- [32] El, K.A., et al. (2009) Diagnosis of Human Brucellosis in Egypt by Polymerase Chain Reaction. *Eastern Mediterra-*

-
- nean Health Journal*, **15**, 1068-1074. <https://doi.org/10.26719/2009.15.5.1068>
- [33] Sharma, K., *et al.* (2017) Multiplex PCR as a Novel Method in the Diagnosis of Spinal Tuberculosis—A Pilot Study. *Acta Neurochirurgica*, **159**, 503-507. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-3065-0>
- [34] 王晓君, 滕琳. 一种基于宏基因组模拟数据的生物标志物筛选方法[J]. 江苏农业科学, 2016, 45(5): 56-59.
- [35] 石仕元, 胡胜平, 费骏, 等. 宏基因组二代测序技术在脊柱非结核感染性疾病诊断中的应用价值[J]. 中华骨科杂志, 2022, 42(15): 961-967.
- [36] Mitka, S., *et al.* (2007) Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 1211-1218. <https://doi.org/10.1128/JCM.00010-06>
- [37] Falzon, D., *et al.* (2017) World Health Organization Treatment Guidelines for Drug-Resistant Tuberculosis, 2016 Update. *European Respiratory Journal*, **49**, Article ID: 1602308. <https://doi.org/10.1183/13993003.02308-2016>
- [38] Liu, Q., *et al.* (2021) Comparative Analysis of Five Inspection Techniques for the Application in the Diagnosis and Treatment of Osteoarticular Tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases*, **112**, 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.019>