

宏基因组二代测序技术和Gene Xpert MTB/RIF对肺结核的诊断价值

陈淑芳^{1,2*}, 李晶^{3*}, 王骏仁², 姜淑娟^{1,2#}

¹山东大学齐鲁医学院, 山东 济南

²山东第一医科大学附属省立医院, 呼吸与危重症医学科, 山东 济南

³山东省公共卫生临床中心, 呼吸与危重症医学科, 山东 济南

收稿日期: 2023年11月13日; 录用日期: 2023年12月7日; 发布日期: 2023年12月13日

摘要

目的: 对比抗酸涂片、结核分枝杆菌培养、结核分枝杆菌及利福平耐药基因检测(Gene Xpert MTB/RIF)和宏基因组二代测序技术(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)对肺结核诊断的临床价值。方法: 回顾分析2021年3月至2023年4月在山东省公共卫生临床中心就诊的175名疑似肺结核患者的临床资料, 所有纳入病例均进行痰抗酸涂片、肺泡灌洗液抗酸涂片、痰培养、肺泡灌洗液培养、肺泡灌洗液Gene Xpert MTB/RIF和mNGS检查。比较抗酸涂片、结核杆菌培养、Gene Xpert MTB/RIF和mNGS诊断肺结核的阳性率。结果: 175名疑似结核患者共确诊结核126例, 灌洗液Gene Xpert MTB/RIF敏感度为77.8%, 灌洗液mNGS检查阳性率为85.7%高于痰培养法(46.0%)、灌洗液培养法(57.1%), 对于涂片阴性的结核患者Gene Xpert MTB/RIF和mNGS检查阳性率高于培养法($P < 0.05$)。结论: mNGS及Gene Xpert MTB/RIF在诊断肺结核方面具有重要意义, 极大提高了涂片阴性检出率。

关键词

结核分枝杆菌, Gene Xpert MTB/RIF, 宏基因组二代测序, 诊断

Diagnostic Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing and Gene Xpert MTB/RIF in Pulmonary Tuberculosis

Shufang Chen^{1,2*}, Jing Li^{3*}, Junren Wang², Shujuan Jiang^{1,2#}

¹Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan Shandong

²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan Shandong

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 陈淑芳, 李晶, 王骏仁, 姜淑娟. 宏基因组二代测序技术和 Gene Xpert MTB/RIF 对肺结核的诊断价值[J]. 临床医学进展, 2023, 13(12): 19093-19100. DOI: 10.12677/acm.2023.13122685

³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shandong Provincial Public Health Clinical Center, Jinan Shandong

Received: Nov. 13th, 2023; accepted: Dec. 7th, 2023; published: Dec. 13th, 2023

Abstract

Objective: To compare the diagnostic efficacy of acid-fast smear of *Mycobacterium tuberculosis*, Gene Xpert MTB/RIF and metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in pulmonary tuberculosis. **Methods:** The clinical data of 175 patients with suspected pulmonary tuberculosis attending the Public Health Clinical Center of Shandong Province from March 2021 to April 2023 were retrospectively analyzed, and all the included cases underwent sputum antacid smear, alveolar lavage fluid antacid smear, sputum culture, alveolar lavage fluid culture, alveolar lavage fluid Gene Xpert MTB/RIF, and mNGS. Positive rates of antacid smear, *Mycobacterium tuberculosis* culture, Gene Xpert MTB/RIF and mNGS for the diagnosis of tuberculosis were compared. **Results:** A total of 126 cases of TB were diagnosed in 175 patients with suspected TB. The sensitivity of Gene Xpert MTB/RIF in lavage fluid was 77.8%, and the positivity rate of mNGS in lavage fluid was 85.7%, which was higher than that of sputum culture method (46.0%) and lavage culture method (57.1%), and the positivity rate of Gene Xpert MTB/RIF and mNGS was higher than that of culture method ($P < 0.05$) in smear-negative patients with TB. For smear-negative TB patients, Gene Xpert MTB/RIF and mNGS were more positive than culture method ($P < 0.05$). **Conclusion:** mNGS and Gene Xpert MTB/RIF are important in the diagnosis of TB, and greatly increase the detection rate of smear-negative TB.

Keywords

Mycobacterium tuberculosis, Gene Xpert MTB/RIF, Metagenomic Next-Generation Sequencing, Diagnosis

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

结核病是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的人类疾病, 主要累及肺部, 使得肺结核成为最常见的临床表现[1]。结核病在全球范围内存在, 其中发展中国家在结核病负担中所占比例较高[2]。在 COVID-19 大流行期间, 未确诊和未治疗的结核病患者有所增加, 结核病死亡人数较 2019 年增加, 耐药结核病的负担也增加了 3% [3]。因此, 如何快速准确地鉴定结核分枝杆菌是确诊结核病、开展后续治疗及防控的关键一步[4]。目前临床上常用的检测 MTB 的方法有结核分枝杆菌培养、抗酸染色涂片及 RT-PCR 等检查, 传统的检测方法存在病原体检出率低和过程繁琐等问题[5] [6]。而近年兴起的宏基因组二代测序(metagenomic Next-Generation Sequencing, mNGS)和结核分枝杆菌及利福平耐药基因检测(Gene Xpert MTB/RIF)能够更加全面和高效地检测样本, 开始广泛应用于肺结核的鉴别诊断[7] [8]。本研究通过对山东省公共卫生临床中心就诊患者的资料进行回顾性分析, 探讨肺泡灌洗液 mNGS 和 Gene Xpert MTB/RIF 检测在肺结核中的诊断价值。

2. 资料与方法

2.1. 研究对象

选择 2021 年 3 月~2023 年 4 月期间在山东省公共卫生临床中心收治的 175 名疑似肺结核患者进行回顾性研究, 其中男性 109 名, 女性 66 名; 45 岁以下的患者人数占 25.0% (76/175), 45~70 岁人数占 60.7% (63/175), 超过 70 岁的患者人数占 14.3% (36/175)。所有纳入病例同时进行了痰抗酸涂片、痰结核杆菌培养、肺泡灌洗液抗酸涂片、肺泡灌洗液结核杆菌培养, 肺泡灌洗液 Gene Xpert MTB/RIF 和 mNGS 检测。其中符合《WS 288-2017 肺结核诊断》[9]标准, 确诊肺结核 126 例, 非结核患者 49 例。本研究已经通过我院伦理委员会审批(审批号: ZR2020MH005)。

2.2. 研究方法

2.2.1. 抗酸染色涂片

按照《中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)》[10]进行操作。

2.2.2. 结核分枝杆菌培养

采用 MGIT960 系统液体培养法进行结核分枝杆菌培养。首先将收集的样品进行离心、稀释等预处理后, 使用专用的接种针或吸管将样本转移到带有 MGIT 试剂的培养瓶中。样本与试剂充分混合后装入 MGIT 960 仪器, 设置温度和时间参数后仪器将自动监测瓶内气压变化, 并记录菌落的生长情况。当培养瓶内菌落增殖到一定程度时, 仪器会发出信号提示。根据信号和菌落观察, 对菌株进行初步鉴定。

2.2.3. 肺泡灌洗液 Gene Xpert MTB/RIF 检测

根据 Xpert MTB/RIF 相关试剂盒操作说明书进行如下操作: 首先收集研究对象 1 份肺泡灌洗液样本后, 将标本与样本处理液以 1:2 的比例混合, 涡旋振荡 15~30 s, 室温孵育 15 分钟, 孵育完成后取 2 mL 的混合液加入试剂盒, 转移至 Xpert 仪器开启检测程序, 结束后可见分析报告。

2.2.4. 肺泡灌洗液 mNGS 检测

取待测者肺泡灌洗液进行 mNGS 检测, 主要步骤包括使用无菌技术采集肺泡灌洗液样本, 确保采集过程无污染。样本进行预处理, 包括离心沉淀, 去除细胞残渣和固体颗粒等。DNA 提取及文库构建, 将制备好的文库进行高通量测序, 最后进行数据分析及报告。

2.3. 观察指标

统计痰抗酸染色涂片、肺泡灌洗液抗酸涂片、痰培养、肺泡灌洗液培养、肺泡灌洗液 Gene Xpert MTB/RIF 和 mNGS 的检测情况。以培养法为标准, 对比肺泡灌洗液 Gene Xpert MTB/RIF 和 mNGS 阳性率。以临床诊断为标准, 观察以上检测方法的阳性率。对于涂阳或涂阳患者以上检测方法的敏感度。

2.4. 统计方法

数据库的建立采用 EXCEL 表格, 采用 SPSS 26.0 统计软件, 计数资料采用率来描述, 多组计数资料间的比较采用 χ^2 检验进行相关统计分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 不同检测方法的检测情况

在 175 例疑似肺结核患者中, 痰涂片检测阳性为 40 例(22.9%), 阴性 135 例(77.1%), 肺泡灌洗液涂

片阳性为 47 例(26.9%)阴性 128 例(73.1%), 痰培养阳性的 59 例(33.7%), 阴性 116 例(66.3%), 肺泡灌洗液培养阳性为 74 例(42.3%), 阴性 101 例(57.7%)肺泡灌洗液 Gene Xpert MTB/RIF 阳性的为 98 例(56%), 阴性 77 例(44%), 肺泡灌洗液 mNGS 阳性为 108 例(61.7%), 阴性 67 例(38.3%)。59 例痰培养阳性的患者中有 57 例为 MTB 感染, 1 例为非结核杆菌感染; 74 例灌洗液培养阳性的患者中 72 例为 MTB 感染, 2 例为非结核杆菌感染, 见表 1。抗酸涂片、液体培养、Gene Xpert MTB/RIF、mNGS 四种方法检测时间约为 15 min、3~5 天、2~3 h、24~72 h。肺泡灌洗液 mNGS 阳性的患者中可伴有肺炎克雷伯菌、表面葡萄球菌等其他细菌、真菌等病原微生物检出。

Table 1. Detection situation of different testing methods [cases (composition percentage (%))]

表 1. 不同检测方法的检测情况[例(构成比%)]

检测结果	痰涂片	灌洗液涂片	痰培养	灌洗液培养	灌洗液 Xpert	灌洗液 mNGS
阳性	40 (22.9)	47 (26.9)	59 (33.7)	74 (42.3)	98 (56.0)	108 (61.7)
阴性	135 (77.1)	128 (73.1)	117 (66.3)	101 (57.7)	77 (44.0)	67 (38.3)
合计	175 (100.0)	175 (100.0)	175 (100.0)	175 (100.0)	175 (100.0)	175 (100.0)

3.2. 以培养法作为金标准比较 Xpert MTB/RIF 和 mNGS 的检测效能

在 175 例疑似肺结核患者中, 以痰培养作为金标准比较时, 在痰培养阳性的 58 例患者中(不包括鉴定为非结核杆菌感染的 1 名患者), Xpert MTB/RIF 阳性 47 例, mNGS 阳性 52 例敏感度分别为 81%、89.7%, 见表 2。以肺泡灌洗液培养作为金标准比较时, 在肺泡灌洗液培养阳性的 72 例患者(不包括鉴定为非结核杆菌感染的 2 名患者)中 Xpert MTB/RIF 阳性 57 例, mNGS 阳性 63 例, 敏感度分别为 79.2%、87.5%, 见表 3。两者相比无明显统计学差异。

Table 2. Comparison of the detection efficacy of Xpert MTB/RIF and mNGS using sputum culture assay as gold standard

表 2. 以痰培养法作为金标准比较 Xpert MTB/RIF 和 mNGS 的检测效能

检测方法	检测结果	痰培养法		敏感度%	特异度%	阳性预测值	阴性预测值
		阳性	阴性				
灌洗液 Xpert	阳性	47	51	81.0	56.4	48.0	85.7
	阴性	11	66				
灌洗液 mNGS	阳性	52	56	89.7	52.1	48.1	97.0
	阴性	6	61				

Table 3. Comparison of the detection efficacy of Xpert MTB/RIF and mNGS using alveolar lavage fluid culture assay as gold standard

表 3. 以肺泡灌洗液培养法作为金标准比较 Xpert MTB/RIF 和 mNGS 的检测效能

检测方法	检测结果	灌洗液培养法		敏感度%	特异度%	阳性预测值	阴性预测值
		阳性	阴性				
灌洗液 Xpert	阳性	57	41	79.1	60.2	58.1	80.5
	阴性	15	62				
灌洗液 mNGS	阳性	63	45	87.5	56.3	58.3	86.6
	阴性	9	58				

3.3. 不同方法检测效能比较

在 175 例疑似结核患者中临床确诊 126 例, 其中痰培养敏感度 46% (58/126), 灌洗液培养敏感度 57.1% (72/126), 灌洗液 Xpert MTB/RIF 敏感度 77.8% (98/126), 灌洗液 mNGS 敏感度 85.7% (108/126), 灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性率高于痰培养、灌洗液培养检测, 且差异有统计学意义; mNGS 阳性率高于痰培养、灌洗液培养检测, 差异有统计学意义, 与灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性率无明显统计学差异。

3.4. 涂片法与各种检测对比

在 126 名确诊结核患者中, 在痰涂片阳性患者 39 例, 其中痰培养阳性 20 例, 灌洗液培养阳性 24 例, 灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性 36 例, 灌洗液 mNGS 阳性 37 例, 在痰涂阴患者中以上四种方法的敏感度分别为 51.3%、61.5%、92.3%、94.9%; 在 86 例痰涂阴的结核患者中, 痰培养阳性 38 例, 灌洗液培养阳性 48 例, 灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性 62 例, 灌洗液 mNGS 阳性 71 例, 在痰涂片阴性的肺结核患者中上述四种检测敏感度分别为 44.2%、55.8%、72.1%、82.6%。在 126 确诊肺结核患者中灌洗液涂片阳性患者 47 例, 其中痰培养阳性 23 例, 灌洗液培养阳性 30 例, 灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性 41 例, 灌洗液 mNGS 阳性 42 例, 灌洗液涂片患者中上述四种方法敏感度分别为 48.9%、63.8%、87.2%、89.4%; 在 79 例灌洗液涂阴的结核患者中, 痰培养阳性 35 例, 灌洗液培养阳性 42 例, 灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性 57 例, 灌洗液 mNGS 阳性 66 例, 灌洗液涂阴患者中上述四种方法分别为 44.3%、53.2%、72.2%、83.5%。在涂片阴性患者中灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性率高于痰培养、灌洗液培养检测, 且差异有统计学意义; mNGS 阳性率高于痰培养、灌洗液培养检测, 差异有统计学意义, 与灌洗液 Xpert MTB/RIF 阳性率无明显统计学差异。见表 4。

Table 4. Comparison of smear method with various tests (cases)

表 4. 涂片法与各种检测对比(例)

检测方法	检测结果	痰涂片		灌洗液涂片	
		阳性	阴性	阳性	阴性
痰培养	阳性	20	38	23	35
	阴性	19	48	24	44
灌洗液培养	阳性	24	48	30	42
	阴性	15	38	17	36
灌洗液 Xpert	阳性	36	62	41	57
	阴性	3	24	6	22
灌洗液 mNGS	阳性	37	71	42	66
	阴性	2	15	5	13

4. 讨论

结核病作为目前全世界最为常见的传染病之一, 其传染性较强, 在疾病传播方面仅次于新型冠状病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19) [11] [12]。新冠病毒大流行证明了快速且有效的诊断性检测对预防严重疫情的传播起重要作用[13] [14]。目前病原学诊断包括抗酸染色、MTB 培养及核酸检测。涂片镜检因其操作简单, 能快速直观的观察镜下结构, 成为临床常用的病原学检测方法, 但其存在阳性率低, 不能鉴别结核分枝杆菌或非结核分枝杆菌等问题[15] [16]。培养法因其敏感度高, 特异性强的特点, 成为

诊断结核病的“金标准”方法之一,但其培养周期长,需要三周以上才能得到结果,无法满足临床快速诊断的需求,临床应用大大受限[17][18]。近年来,随着分子生物学技术的不断革新,聚合酶链反应 PCR 技术因其高效、敏感且特异的特点,已经成为医学领域的热门技术之一,在诊断肺结核方面具有独特的优势[19][20]。Gene Xpert MTB/RIF 检测是基于实时荧光定量 PCR (RT-PCR)对结核分枝杆菌特异性的 *rpoB* 基因的利福平耐药核心区间进行检测,通过半定量分析,在短时间内检测出其是否存在突变,同时因其封闭式自动化的检测系统,在一定程度上减少了人为因素造成误差其检测快速、灵敏度高[21][22]。高春景[23]等人研究对比了 Xpert MTB/RIF 及培养药敏两种方法,发现 Xpert MTB/RIF 对 MTB 的检出率高,可以快速检测利福平耐药结核。尽管 Xpert MTB/RIF 试验被认为是结核病的优秀分子诊断测试,但它也有一些缺点,一是它依赖于识别利福平(RIF)的耐药性来指示或分类样本是否具有多药耐药结核病(MDR-TB)[24][25]。二是 Gene Xpert 系统只能检测结核分枝杆菌,对于非结核分枝杆菌无法进行检测,因此对于存在混合感染的肺结核患者,无法进行全面的病原学检测[26]。

宏基因组学二代测序 mNGS 是一种利用高通量测序技术对各种复杂样品中所有微生物 DNA 进行全基因组测序的方法,通过分析序列数据,可以得出每个微生物群落的结构和功能信息[27][28]。mNGS 在准确检测出 MTB 的同时可以识别多种病原体,包括各种细菌、真菌、病毒等,相较于其他传统的检测方法,mNGS 技术提高了肺结核诊断效率和准确性[29][30][31]。史翠琳[7]等人最近的一项研究表明,mNGS 对 MTB 的检测灵敏度为 47.92%,明显高于其他三种检测方法,其中 Gene Xpert (45.83%)、培养 (46.81%)、抗酸杆菌染色(29.17%)。同时 mNGS 对于肺外结核诊断具有较高的应用前景。孙雯雯[32]等人研究发现 mNGS 对于肺外结核诊断的敏感度明显高于涂片法、Gene Xpert 法及培养法。因此 mNGS 对于不同类型的结核病都显示出一定的优势,提高早期诊断率,缩短诊断周期[33]。

本研究显示 Gene Xpert (77.8%)和 mNGS (85.7%)检测 MTB 阳性率明显高于培养法,对于涂片阴性的结核患者,肺泡灌洗液 Gene Xpert 和 mNGS 检测在 MTB 阳性率液明显高于培养法,可极大程度上减低漏诊病例。以上结果说明了 Gene Xpert 及 mNGS 应用在检测结核分枝杆菌,快速且有效地诊断结核病方面有重要意义,可为临床用药提供更为精准的参考。

5. 结论

mNGS 检测及 Gene Xpert 相对于抗酸染色法和培养法在诊断结核病方面有显著的优势,对于涂片阴性的结核病患者来说,应用 mNGS 及 Gene Xpert 是一种准确且高效的检测手段,极大地减少了漏诊,在临床上具有较高的应用价值。

致 谢

感谢山东省公共卫生临床中心给予的数据支持以及山东省自然科学基金重大基础研究项目(项目号:ZR2021ZD35)给予的资助。

基金项目

山东省自然科学基金重大基础研究项目(项目号:ZR2021ZD35)。

参考文献

- [1] Abel, L., El-Baghdadi, J., Bousfiha, A.A., Casanova, J.L. and Schurr, E. (2014) Human Genetics of Tuberculosis: A Long and Winding Road. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369**, Article ID: 20130428. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0428>
- [2] Furin, J., Cox, H. and Pai, M. (2019) Tuberculosis. *The Lancet*, **393**, 1642-1656. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3)

- [3] Bagechi, S. (2023) WHO's Global Tuberculosis Report 2022. *The Lancet Microbe*, **4**, E20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7)
- [4] Boldi, M.O., Denis-Lessard, J., Neziri, R., *et al.* (2023) Performance of Microbiological Tests for Tuberculosis Diagnostic according to the Type of Respiratory Specimen: A 10-Year Retrospective Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **13**, Article 1131241. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1131241>
- [5] Lavania, S., Das, R., Dhiman, A., *et al.* (2018) Aptamer-Based TB Antigen Tests for the Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Potential Utility in Screening for Tuberculosis. *ACS Infectious Diseases*, **4**, 1718-1726. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00201>
- [6] 丁彩红, 王余余, 王庆, 等. Xpert MTB/RIF Ultra 快速诊断涂阴肺结核的临床价值[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(7): 761-767.
- [7] Shi, C.L., Han, P., Tang, P.J., *et al.* (2020) Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Infection*, **81**, 567-574. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.08.004>
- [8] Chen, P., Sun, W. and He, Y. (2020) Comparison of Metagenomic Next-Generation Sequencing Technology, Culture and GeneXpert MTB/RIF Assay in the Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Thoracic Disease*, **12**, 4014-4024. <https://doi.org/10.21037/jtd-20-1232>
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准(WS 288-2017) [J]. 新发传染病电子杂志, 2018, 3(1): 59-61.
- [10] 卫生部疾病预防控制局. 中国结核病防治规划实施工作指南 2008 年版[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009.
- [11] 宋敏, 陆普选, 方伟军, 等. 2022 年 WHO 全球结核病报告:全球与中国关键数据分析[J]. 新发传染病电子杂志, 2023, 8(1): 87-92.
- [12] Wang, Q., Guo, S., Wei, X., *et al.* (2022) Global Prevalence, Treatment and Outcome of Tuberculosis and COVID-19 Coinfection: A Systematic Review and Meta-Analysis (From November 2019 to March 2021). *BMJ Open*, **12**, e059396. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-059396>
- [13] Kim, J., Tran, V. T., Oh, S., *et al.* (2021) Clinical Trial: Magnetoplasmonic ELISA for Urine-Based Active Tuberculosis Detection and Anti-Tuberculosis Therapy Monitoring. *ACS Central Science*, **7**, 1898-1907. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00948>
- [14] Togun, T., Kampmann, B., Stoker, N.G. and Lipman, M. (2020) Anticipating the Impact of the COVID-19 Pandemic on TB Patients and TB Control Programmes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **19**, Article No. 21. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00363-1>
- [15] Campelo, T.A., Cardoso de Sousa, P.R., Nogueira, L.L., *et al.* (2021) Revisiting the Methods for Detecting *Mycobacterium tuberculosis*: What Has the New Millennium Brought thus Far? *Access Microbiology*, **3**, Article ID: 000245. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000245>
- [16] Huang, Y., Ai, L., Wang, X., *et al.* (2022) Review and Updates on the Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Clinical Medicine*, **11**, Article 5826. <https://doi.org/10.3390/jcm11195826>
- [17] Simner, P.J., Doerr, K.A., Steinmetz, L.K. and Wengenack, N.L. (2016) Mycobacterium and Aerobic Actinomycete Culture: Are Two Medium Types and Extended Incubation Times Necessary? *Journal of Clinical Microbiology*, **54**, 1089-1093. <https://doi.org/10.1128/JCM.02838-15>
- [18] Zhu, N., Zhou, D. and Li, S. (2021) Diagnostic Accuracy of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Sputum-Scarce or Smear-Negative Cases with Suspected Pulmonary Tuberculosis. *BioMed Research International*, **2021**, Article ID: 9970817. <https://doi.org/10.1155/2021/9970817>
- [19] Cao, W.F., Leng, E.L., Liu, S.M., *et al.* (2023) Recent Advances in Microbiological and Molecular Biological Detection Techniques of Tuberculous Meningitis. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1202752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1202752>
- [20] Boehme, C.C., Nicol, M.P., Nabeta, P., *et al.* (2011) Feasibility, Diagnostic Accuracy, and Effectiveness of Decentralised Use of the Xpert MTB/RIF Test for Diagnosis of Tuberculosis and Multidrug Resistance: A Multicentre Implementation Study. *The Lancet*, **377**, 1495-1505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60438-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60438-8)
- [21] Acharya, B., Acharya, A., Gautam, S., *et al.* (2020) Advances in Diagnosis of Tuberculosis: An Update into Molecular Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology Reports*, **47**, 4065-4075. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05413-7>
- [22] Steingart, K.R., Schiller, I., Horne, D.J., *et al.* (2014) Xpert® MTB/RIF Assay for Pulmonary Tuberculosis and Rifampicin Resistance in Adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, No. 1, CD009593. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub3>
- [23] 高春景, 杨洋, 阚宗卫, 等. Xpert MTB/RIF 对结核菌利福平耐药的诊断价值及 rpoB 基因突变特点的分析[J]. 临

- 床肺科杂志, 2021, 26(5): 723-727.
- [24] Kumar, M., Kumar, G., Kumar, R., *et al.* (2023) A Comparative Analysis of Microscopy, Culture, and the Xpert *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampicin Assay in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis in Human Immunodeficiency-Positive Individuals. *Cureus*, **15**, e42962. <https://doi.org/10.7759/cureus.42962>
- [25] Rajendran, P., Padmapriyadarsini, C., Nair, S., *et al.* (2023) Newer TB diagnostics: An Update. *Indian Journal of Tuberculosis*, **70**, 372-375. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2023.04.019>
- [26] 赵素娥, 高欣, 刘胜岗, 等. 肺泡灌洗液宏基因组二代测序对疑似肺结核的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2022, 27(5): 722-725, 743.
- [27] Huang, Z., Zhang, C., Hu, D., *et al.* (2019) Diagnosis of Osteoarticular Tuberculosis via Metagenomic Next-Generation Sequencing: A Case Report. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **18**, 1184-1188. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7655>
- [28] Wei, P., Wu, L., Li, Y., *et al.* (2022) Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Detection of Pathogenic Microorganisms in Patients with Pulmonary Infection. *American Journal of Translational Research*, **14**, 6382-6388.
- [29] Zhou, X., Wu, H., Ruan, Q., *et al.* (2019) Clinical Evaluation of Diagnosis Efficacy of Active *Mycobacterium tuberculosis* Complex Infection via Metagenomic Next-Generation Sequencing of Direct Clinical Samples. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **9**, Article 351. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00351>
- [30] Xu, P., Yang, K., Yang, L., *et al.* (2022) Next-Generation Metagenome Sequencing Shows Superior Diagnostic Performance in Acid-Fast Staining Sputum Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis and Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 898195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.898195>
- [31] Liu, B.B., Tian, Q., Wang, P., *et al.* (2022) Evaluating the Diagnostic Value of Using Metagenomic Next-Generation Sequencing on Bronchoalveolar Lavage Fluid and Tissue in Infectious Pathogens Located in the Peripheral Lung Field. *Annals of Palliative Medicine*, **11**, 1725-1735. <https://doi.org/10.21037/apm-21-3474>
- [32] 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.
- [33] Li, Z., Wang, J., Xiu, X., *et al.* (2023) Evaluation of Different Diagnostic Methods for Spinal Tuberculosis Infection. *BMC Infectious Diseases*, **23**, Article No. 695. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08655-5>