

# 结核分枝杆菌特点及诊断新进展

肖 锐, 许 瑞, 杜先智\*

重庆医科大学附属第二医院呼吸与危重症医学科, 重庆

收稿日期: 2023年7月13日; 录用日期: 2023年8月3日; 发布日期: 2023年8月10日

## 摘 要

由于全球结核病发病人数、耐药率、死亡人数近年来再次出现上升趋势, 而病原学诊断阳性率较低, 使得加强对结核分枝杆菌的感染诊断成为必要。结核分枝杆菌感染后, 机体通过细胞免疫及体液免疫反应应答, 主要为细胞免疫, 结核分枝杆菌细胞壁上的一些高特异性免疫学相关物质具有诊断潜力。近年来, 不断有专家学者对结核分枝杆菌的感染诊断提出了新的研究方向, 包括病原学、分子生物学、免疫学诊断试验, 这提高了临床诊断准确率与及时性。本文就结核分枝杆菌特点及感染诊断新进展作相应的综述。

## 关键词

结核分枝杆菌, 诊断, 分子生物学, 免疫学

# New Advances in the Characteristics and Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*

Rui Xiao, Rui Xu, Xianzhi Du\*

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Jul. 13<sup>th</sup>, 2023; accepted: Aug. 3<sup>rd</sup>, 2023; published: Aug. 10<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

The global trend of increasing number of TB incidence, drug resistance and deaths again in recent years and the low rate of positive pathogenic diagnosis make it necessary to enhance the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. After *Mycobacterium tuberculosis* infection, the organism responds through cellular and humoral immune responses, mainly cellular immunity, and some highly specific immunologically relevant substances produced and released during this process

\*通讯作者。

have diagnostic potential. In recent years, experts and scholars have continuously proposed new research directions for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection, including pathogenesis, molecular biology, and immunological diagnostic tests, which have improved the accuracy and timeliness of clinical diagnosis. Therefore, this paper provides a review based on the new advances in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection.

## Keywords

*Mycobacterium tuberculosis*, Diagnosis, Molecular Biology, Immunology

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

据 2022 年 WHO 发布的《全球结核病报告》显示, 结核病死亡率继续上升, 耐药结核病的发病率也比去年有所增加[1], 这再次引起了全世界的重视, 给 2035 年实现消灭结核病的目标带来了极大的挑战。中国一直饱受结核病的折磨, 位居全球第三, 尽管目前的数据与过去相比略有改善, 但病原学诊断阳性率仍低于 60% [1]。近年来国际上开发了多种新型检测技术, 其中免疫学及分子生物学技术尤为突出, 为提高结核分枝杆菌感染和结核病的快速诊断提供了新选择。而结核分枝杆菌的生物特征以及侵入宿主后引发的免疫应答是开发免疫学诊断技术的基础, 故本文将简单就结核分枝杆菌特点、机体免疫及结核分枝杆菌免疫逃逸, 重点对结核分枝杆菌诊断技术新进展进行综述。

## 2. 结核分枝杆菌特点

### 2.1. 结核分枝杆菌病原学特点

结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)是一组具有高度相似基因组的分枝杆菌, 会导致结核病的产生。主要包括结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)、非洲分枝杆菌(*Mycobacterium africanum*)、卡氏分枝杆菌(*Mycobacterium canetti*)、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、田鼠分枝杆菌(*Mycobacterium microti*)等。其中, MTB 为是人结核病的主要病原菌。

MTB 胞壁脂质含量丰富, 包括磷脂、索状因子、蜡质 D、硫酸脑苷脂等, 约占细胞壁干重的 60%, 脂质含量与结核分枝杆菌的毒力呈平行关系, 含量越高毒力越强。其中, 磷脂能刺激单核细胞增生, 使炎症灶中的巨噬细胞转变为类上皮细胞, 并可抑制蛋白酶对病灶组织的分解作用, 形成结核结节和干酪样坏死, 且能抑制粒细胞游走和引起慢性肉芽肿。索状因子是分枝菌酸和海藻糖结合的糖脂, 能损伤细胞的线粒体膜, 影响细胞呼吸, 抑制白细胞游走和引起慢性肉芽肿。蜡质 D 是分枝菌酸与肽糖脂的复合物, 可激发机体产生迟发型超敏反应。硫酸脑苷脂存在于有毒株的细胞壁中, 能抑制吞噬细胞溶酶体和吞噬体的结合, 使细菌在细胞内长期存活[2]。

MTB 细胞壁的核心结构由三种主要成分构成: 分枝菌酸(mycolic acid, MA)、阿拉伯半乳糖聚糖(arabinogalactan, AG)以及肽聚糖(peptidoglycan, PG) [3]。其中, MA 是 MTB 外膜的主要成分, 形成分枝杆菌特有的厚亲脂膜, 与 MTB 的毒力、抗酸性密切相关[4]; AG 是一种聚合糖, 与 PG 糖部分以共价键连接, 跨越整个细胞壁的大部分, 并最终分支出来与分枝菌酸连接; PG 几乎存在于所有的细菌中, 为革

兰氏阴性和阳性细菌提供形状、硬度和渗透稳定性。PG 作为重要的病原体相关分子模式(PAMP), 是细菌感染中先天免疫受体的直接靶标[5]。而 MTB 的 PG 特征在于几种独特的修饰, 例如酰胺酸的 N-糖基化和 D-异谷氨酸酰胺化, 表型分析证实了 D-异谷氨酸酰胺化对分枝杆菌存活的重要性。D-异谷氨酸酰胺化影响异烟肼的耐药性[6]。另外, MTB 细胞壁上的脂阿拉伯甘露聚糖(mannose-capped-lipoarabinomannan, ManLAM)其作为一种毒力因子, 支持 MTB 的存活, 并通过几种方式影响宿主的免疫反应, 包括促进吞噬体成熟、抗原呈现、T 细胞活化和细胞因子调节[7]。

## 2.2. 结核分枝杆菌基因特点及表面抗原

结核分枝杆菌的基因组差异区域(Region of difference, RD): 在 *M. bovis* 经连续传代获得减毒株-BCG 疫苗的传代过程中缺失了十多个基因簇, 这些基因簇被称为差异区域。基于血清学样本, 国内外已报道的具有抗原性 RD 区蛋白有 38 个, 其中 RD1 和 RD2 区的抗原较多。由两种基因组编码的三种蛋白质 ESAT-6 (Mb3905/Rv3875), CFP-10 (Mb3904/Rv3874) 和 EspC (Mb3645c/Rv3615c) 已被广泛应用作为重组诊断试剂, 因为它们作为特异性有效的 T 细胞诱导剂可诱导 T 淋巴细胞产生较高 INF- $\gamma$ , 具有较高的特异性[8]。

## 3. 结核分枝杆菌感染及免疫逃逸

### 3.1. 结核分枝杆菌感染与免疫

MTB 通过呼吸道侵入机体后, 在肺泡内与先天免疫系统接触。肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM) 可以将其摄取, 但是由于它们处于非活化状态, 因此无法有效地将其清除掉; 树突状细胞(dendritic cell) 也可以捕获它们, 并将其从炎症部位转移至肺部引流淋巴结, 从而刺激初始 T 细胞的分化、活化和增殖, 从而激活免疫应答, 产生特异性的抗 MTB 免疫反应; 效应 T 细胞再进入炎症区域, 与 AM 相互作用, 促进 AM 细胞的充分活化, 从而有效地消灭结核分枝杆菌; AM 还可以将结核病毒的抗原传递给 T 细胞, 从而促进抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)进一步活化、增殖和分泌多种细胞因子, 如 IFN-7 和 IL-12 等, 从而有效地抵御结核病毒的侵袭[9]。

MTB 主要通过气溶胶进行传播, 感染宿主后, 大多数宿主的固有免疫和适应性免疫应答能有效控制结核感染, 感染程度因机体免疫力、结核杆菌的数量及毒力不同而有异, 结局可为: 被宿主免疫系统完全清除, 结核潜伏感染, 活动性结核病, 非活动性结核病[10]。

### 3.2. 结核分枝杆菌免疫逃逸

结核分枝杆菌能够利用多种方式阻止巨噬细胞的自身免疫反应, 包括阻止其形成吞噬溶酶体、减少其产生的有害物质、干扰其抗原的运输, 从而使其无法被正常的细胞所清除, 从而使其能够在细胞内增殖, 并最终引发结核病。

Nature Communications 的一项研究表明, 结核分枝杆菌可以通过宿主细胞中的表观遗传机制诱导宿主细胞铁死亡, 从而促进病原体的致病性和传播。表观遗传学是研究除 DNA 序列变化外的其他机制引起的细胞表型和基因表达的可遗传的改变, 主要通过 DNA 甲基化修饰、组蛋白修饰和 RNA 甲基化修饰等在转录水平调控基因表达[11]。谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 为细胞主要的铁中毒防御系统。Gan B 等研究表明, Mtb 分泌的蛋白酪氨酸磷酸酶 A (PtpA) 通过与 Ran-GDP 相互作用进入宿主细胞核, 然后与蛋白精氨酸甲基转移酶 6 (PRMT6) 相互作用, 促进 PRMT6 的甲基转移酶活性, 进而促进 PRMT6 介导的组蛋白 H3 在精氨酸 2 处的不对称二甲基化(H3R2me2a)并抑制 GPX4 基因表达。这种已知与基因抑制相关的表观遗传调控导致 GPX4 转录受抑制并诱导铁变态反应最终导致细胞死亡[12]。

## 4. 结核分枝杆菌感染检测方法

2013年,WHO推荐采用GeneXpert MTB/RIF和LAMP技术,以此来检测结核病原体,并将其作为病原学阳性结核的诊断依据,这一新的标准不仅可以有效地识别出病原体,而且还可以为临床医生提供更加精准、更有效的治疗方案,从而大大提高了治疗效果。我国也进行了相应的修订,将分子生物学检测的结果作为确定疾病的重要指标,从而有效地阻止和遏制结核病的蔓延。

TB病原学诊断主要有涂片抗酸染色、结核分枝杆菌培养、分子生物学检测法,这些方法对菌阴性结核病并无良好的效果,故菌阴结核病的患病率明显上升。相反,免疫学诊断可以起很好的辅助诊断作用。

### 4.1. 病原学诊断方法

#### 4.1.1. 涂片抗酸染色检查

传统萋-尼(Ziehl-Neelsen)抗酸染色法:首先以石炭酸复红染色并加热,然后用3%盐酸酒精脱色(分枝杆菌不易脱色),再用碱性美兰染色液复染后,最后镜检,结果为抗酸性细菌呈红色,非抗酸细菌呈蓝色,从而可以准确地识别菌种。

优缺点:经济、检测迅速、硬件设施要求不高、适合基层应用;但生物安全性、灵敏度较低,尤其是儿童、艾滋病和肺外结核。此外,使用抗结核药治疗,如异烟肼,会影响分枝菌酸的合成,从而可能造成抗酸染色结果阴性;且抗酸染色检查只能检测样本中是否存在抗酸杆菌,不能区分菌体死活,提供信息有限,无法准确识别出MTB和NTM感染,也无法准确评估结核分枝杆菌的耐药性。

由于传统抗酸染色法存在着诸多不足,改良抗酸染色法、金胺“O”荧光染色,较传统染色方法耗时短,阳性率有所提高,更适合临床应用[13][14]。

#### 4.1.2. MTB培养检测法

罗氏(L-J)固体培养法:采用固体罗氏培养基,阳性患者一般培养2~4周可见菌落形成,培养至满8周,培养阳性的菌株可进行菌种鉴定、MTB与NTM鉴别诊断以及药物敏感试验,进一步指导临床用药。

优缺点:结核病诊断金标准。但培养周期长,不利于肺结核的快速诊断。

液体培养法(如全自动MGIT960系统培养方法):将细菌混入与营养液,加速其繁殖,一般1~2周内可以观察到细菌的生长。兰剑锋等人通过对比涂片法、L-J法、MGIT960法及GeneXpert法检出结核病病原菌的能力,得出结论其中MGIT960法检测的敏感度最高[15]。

#### 4.1.3. 结核病病原学分子生物学技术

通过分子生物学诊断技术,结核病病原学可以从临床样本中提取MTB核酸或耐药基因,并将其作为诊断的重要指示物,从而实现准确的结核病病原学诊断。主要靶标为MTB基因组中保守的管家基因(*rpoB*、16S rRNA、IS6110等),有较高的敏感性及特异性[16]。

结合多种诊断及原理,结核病的分子生物学研究可将其划分为5类:

1) 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative PCR):目前应用最广泛的Gene Xpert MTB/RIF(简称“GeneXpert”):能够准确检测痰、胸腔积液、脑脊液等样本,检测MTB利福平耐药决定区*rpoB*基因,对利福平耐药性检测敏感度及特异性均较高,WHO推荐其用于MDR或艾滋病合并结核病高风险人群MTB感染、儿童结核病、肺外结核的早期检测[17]。

最新的研究表明,采用液滴数字PCR(ddPCR)技术,通过福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样本的方式,检测轻度TB的灵敏度远高于实时PCR[18]。

近年来,印度研发出了一种新型Truenat系统,它能够同时检测多个靶标,具有极高的检测效率,且检测成本相对较低,更适合低收入国家使用,包括Truenat MTB、Truenat MTB Plus和Truenat MTB-Rif Dx。



Truenat MTB-Rif Dx 可作为附加芯片,用于 MTB 对利福平的耐药性检测。Truenat MTB 的样本消耗量明显低于 GeneXpert,且只有 MTB 阳性的标本才会进行利福平耐药性检测,从而大幅降低检测的成本。此外,Truenat 系统的所有组件均配备了电池,使得它们更加便携,无论是在基础设施落后的国家还是偏远地区的医院,都能轻松使用[19]。

2) 恒温扩增技术:主要包括环介导等温扩增技术(LAMP)、交叉引物法检测技术(CPA)及实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)等。其中 LAMP 核酸扩增可仅需 2 h,扩增最多的靶基因为 IS6110 基因。目前,恒温扩增技术主要检测临床标本中是否存在 MTBC [20]。

3) 探针-反向杂交技术:利用线性探针(line probe assay, LPA)及基因芯片等一次检测多个耐药相关基因位点,例如与利福平、异烟肼相关的耐药基因(rpoB、katG 及 ihnA),这些基因都被用来鉴定分枝杆菌菌种和耐药性。2008 年,世界卫生组织批准 LPA 技术,用于检测利福平和异烟肼对结核患者的耐药性;2016 年世界卫生组织推荐其用于二线注射类和氟喹诺酮类抗结核药物的耐药突变检测[17] [20]。

4) 探针-熔解曲线技术:通过对扩增产物的熔解曲线的分析,从序列中检测基因突变,判断药物耐药性。Xpert tMTB/RIF Ultra (简称 Ultra)技术较为成熟,能有效鉴定多种基因型的存在,特别适于低丰度的异质性耐药检测,例如利福平、异烟肼、乙胺丁醇和喹诺酮类药物[17] [20]。

5) 基因测序技术:通过测定 MTB 靶基因序列,并与国际标准序列进行匹配比对,从而更好识别 MTB 耐药性。目前主要用于分枝杆菌病原菌的耐药检测和菌种鉴定。这种技术比传统的核酸扩增和分子杂交技术更加先进,可提供特定基因的序列信息或完整准确的基因组,能够快速、精确地检测出特定的基因,从而为临床医学提供了一个全新的视角,使得它在疾病诊断,尤其是少见病原体的诊断方面发挥着至关重要的作用[17]。

其中,二代测序技术(next generation sequencing, NGS),也被称为高通量测序,是一种极其重要的测序方法,主要包括宏基因组测序(mNGS)、全基因组测序(WGS)和扩增子测序(以 16S rRNA 和 ITS 测序为代表)等,突变基因检出分辨率高,可以快速、精确地测序结果,且对标本要求不局限,因此其应用范围更加广泛,对肺外结核如结核性脑膜炎脑脊液标本亦有较高敏感性。此外,由于受抗生素影响较小,病原学检测也被临床广泛应用于耐药结核病诊断,尤其是 MDR-TB 检测,能更准确地发现病原体存在。

近年来,第三代基因组测序技术发展迅速,例如太平洋生物科学公司(PacBio)开发的单分子实时(Single Molecule Real-Time, SMRT)测序、牛津纳米孔公司开发的纳米孔测序技术。它们的应用为科学家们提供了前所未有的可能性,并为科学发展提供了全新的思路与挑战。一些研究者研究表明,纳米孔测序技术在肺结核诊断中发挥了重要作用,其准确性明显优于 GeneXpert MTB/RIF 和培养,因此,建议将纳米孔测序作为 GeneXpert MTB/RIF 的有效替代方案,用于肺结核的初步检测,以提高诊断的准确性和可靠性[21]。

## 4.2. 免疫学诊断试验

### 4.2.1. 结核菌素皮肤试验(Tuberculin Skin Test, TST)

这种皮肤实验采用了 IV 型迟发型变态反应,它不同于传统的手臂下部皮下注射抗原(结核菌素或纯化蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD))的方法,其受试者必须在 48~72 小时内返回观测结果。

优缺点:经济便宜,易发生交叉反应;结核菌素的抗原组分多种多样,其中一些与卡介苗(BCG)和非结核分枝杆菌(NTM)的抗原成分极其相似。此外,TST 无法准确识别活动性结核病、潜伏性结核感染、接种卡介苗导致的假阳性以及 NTM 感染引起的交叉反应,而且对于特殊人群如 HIV 感染或使用免疫抑制剂者因免疫应答不足造成假阴性。

对于那些患有 HIV 或服用免疫抑制剂的人来说,由于免疫应答不足,可能会出现假阴性结果。

除了传统的 PPD 之外, 运用重组融合蛋白 EC (ESAT6-CFP10) 进行皮肤试验较 PPD 敏感性更高, 可以解决因 BCG 接种和 NTM 感染出现的 TST 假阳性问题[22]。目前我国推荐其用于紧密接触者、高风险、重点人群筛查[23]。

#### 4.2.2. $\gamma$ -干扰素释放试验(Interferon-Gamma Release Assay, IGRA)

当人体感染 MTB 病毒后, 体内的致敏 T 细胞将会受到特异性抗原(包括 EAST-6 和 CFP-10)刺激, 会产生和分泌  $\gamma$ -干扰素(inter-feron- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ), 可通过检测 IFN- $\gamma$  水平来帮助判断是否患有结核病。

优缺点: IGRA 不仅能够避免 BCG 接种和绝大部分的 NTM 的交叉感染带来的假阳性, 比 TST 表现出更好的准确性、敏感性和特异性。但 IGRA 无法准确识别出活动性结核病与潜伏性结核感染, 也无法准确预测 LTBI 患者患上 ATB 的可能性。

#### 4.2.3. 血清结核抗原、抗体检测

当感染结核分支杆菌后, 人体会产生特异性抗体。故可以使用固体载体和特异性抗体, 对结核分支杆菌进行检测, 然后用胶体金或酶来标记显示反应, 从而更准确地确定该细菌的存在。再以胶体金或酶来标记, 通过显示反应能够有效地检测出结核分支杆菌的存在。血清结核抗体曾作为我国结核病重要的辅助诊断方法, 但因近年来临床假阳性、假阴性问题明显, WHO 不推荐作为活动性结核病检测手段。近年来, 随着分子生物学技术发展, 一些纯化的特异性抗原以及不同生长阶段的特异性抗原被发现及应用, 可用于结核分支杆菌感染以及疫苗研发。如除上游重组融合蛋白 EC 用于皮肤试验外, 实验表明选用 ESAT-6、CFP-10、两种全长抗原和 PstS1 的 T 细胞表位多肽抗原 nPstS1 形成的一种多组分蛋白抗原 ECP001 是有效多组分亚基疫苗候选者, 具有作为 BCG 初始免疫-ECP001 增强免疫或用于结核分支杆菌感染的治疗疫苗的潜力[24]。

研究表明, MTB 早期分泌蛋白 MPT-64 (Major protein antigen 64, MPT-64) 具有显著的血清学特异性, 因此可以辅助活动性结核病的评估[25]。关于诊断 TB 的潜在标志物 PPE57、38 kDa 和 RV3807 在检测抗结核 IgM 的检测中显示出更高的诊断潜力, 而 PPE57、Ag85B、Rv0220 和 38 kDa 在检测抗结核 IgG 的表现更好[26]。

LAM 作为细胞壁上一种特殊的抗原, 能刺激人体产生 LAM 抗体, 可作为生物标志物, 判断机体的感染状态, 从而为 LTBI 和活动性结核病的诊断提供重要的参考依据。除血液外, 尿液等其他体液中的 LAM 抗原也在临床研究之中。如陈飘飘团队报告了一种高灵敏度的可视化免疫测定方法, 用于检测尿液样本中的 LAM, 通过对 147 份 HIV 阴性的临床尿液样本进行验证, 显示了应用该方法无创诊断 TB 的潜力[27]。

抗转酮醇酶 u IgG 抗体: 近期有文献报道由 Lobelia Samavati 领导的团队发现了一种新型免疫表位-转酮醇酶(TKTu), 其与结核分支杆菌的转酮醇酶具有同源性, 而转酮醇酶是结核分支杆菌生长必需的一种酶, 通过测定抗转酮醇酶 u 的特异性 IgG 抗体丰度可以区分活动性结核病、LTBI 和其他非 TB 肉芽肿性肺疾病如结节病[28]。

## 5. 小结

综上所述, 结核仍是全球高负担传染病之一, 如何快速、准确地早期诊断痰菌阴患者及耐药结核病均面临巨大挑战, 分子生物学及免疫学诊断方法的快速发展为快速、准确地早期诊断带来了新希望, 但鉴于各项技术固有局限性以及各国家的经济发展、技术水平、结核分支杆菌菌株分布特点不同, 医务人员应综合上述检验方法选取相应的诊断方式, 正确解读其结果并做出临床决策, 共同努力, 早日实现消灭肺结核目标。

## 基金项目

重庆医科大学 2020 感染专项 X2843。

## 参考文献

- [1] Bagechi, S. (2023) WHO's Global Tuberculosis Report 2022. *Lancet Microbe*, **4**, e20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7)
- [2] 陆霓虹, 李杰. 结核分枝杆菌致肺损伤的研究进展[J]. 中国医药科学, 2022, 12(16): 33-36.
- [3] Xu, X., Dong, B., Peng, L., et al. (2022) Anti-Tuberculosis Drug Development via Targeting the Cell Envelope of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 1056608. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1056608>
- [4] Holzheimer, M., Buter, J. and Minnaard, A.J. (2021) Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Reviews*, **121**, 9554-9643. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00043>
- [5] Wolf, A.J. and Underhill, D.M. (2018) Peptidoglycan Recognition by the Innate Immune System. *Nature Reviews Immunology*, **18**, 243-254. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.136>
- [6] Silveiro, C., Marques, M., Olivença, F., et al. (2023) CRISPRi-Mediated Characterization of Novel Anti-Tuberculosis Targets: Mycobacterial Peptidoglycan Modifications Promote Beta-Lactam Resistance and Intracellular Survival. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **13**, Article 1089911. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1089911>
- [7] Yimcharoen, M., Saikaew, S., Wattananandkul, U., et al. (2022) The Regulation of ManLAM-Related Gene Expression in *Mycobacterium tuberculosis* with Different Drug Resistance Profiles Following Isoniazid Treatment. *Infection and Drug Resistance*, **15**, 399-412. <https://doi.org/10.2147/IDR.S346869>
- [8] Encinas, M., Marfil, M.J., Garbaccio, S., et al. (2018) *Mycobacterium bovis* ESAT-6, CFP-10 and EspC Antigens Show High Conservation among Field Isolates. *Tuberculosis*, **111**, 143-146. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.06.007>
- [9] Rahlwes, K.C., Dias, B.R.S., Campos, P.C., et al. (2023) Pathogenicity and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, **14**, Article 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 结核病分类(WS196-2017) [J]. 新发传染病电子杂志, 2018, 3(3): 191-192. <https://doi.org/10.19871/j.cnki.xfcbzz.2018.03.018>
- [11] 丁勇, 许超, 吴季辉, 等. 表观遗传学研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(1): 3-15.
- [12] Gan, B. (2023) Ferroptosis Hijacking by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, **14**, Article No. 1431. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37149-w>
- [13] 李玉雪, 柳晓金, 王薇, 等. 改良抗酸染色法在检测痰结核分枝杆菌中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(7): 1070-1073.
- [14] 赵慧, 王春花, 孙蕊, 等. 萋-尼氏抗酸染色法和金胺 O 荧光染色法在结核分枝杆菌痰涂片检测中的对比[J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(4): 357-360.
- [15] 兰剑锋, 刘淑燕. 涂片法、L-J 法、MGIT 960 法及 GeneXpert 法检测在疑似肺结核患者临床诊断中的应用[J]. 中国医药科学, 2021, 11(15): 186-189, 203.
- [16] Nurwidya, F., Handayani, D., Burhan, E., et al. (2018) Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam Medical Journal*, **54**, 1-9. <https://doi.org/10.4068/cmj.2018.54.1.1>
- [17] 中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会. 结核病病原学分子诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(9): 688-695.
- [18] Cao, Z., Wu, W., Wei, H., et al. (2020) Using Droplet Digital PCR in the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in FFPE Samples. *International Journal of Infectious Diseases*, **99**, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.045>
- [19] Lee, D.J., Kumarasamy, N., Resch, S.C., et al. (2019) Rapid, Point-of-Care Diagnosis of Tuberculosis with Novel Truenat Assay: Cost-Effectiveness Analysis for India's Public Sector. *PLOS ONE*, **14**, e0218890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218890>
- [20] 马俊, 沙巍. 结核病分子生物学诊断新技术的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2022, 43(4): 579-585.
- [21] Yu, G., Shen, Y., Zhong, F., et al. (2022) Diagnostic Accuracy of Nanopore Sequencing Using Respiratory Specimens in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases*, **122**, 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.001>
- [22] 中国防痨协会, 夏辉, 王瑞白, 赵雁林. 结核分枝杆菌潜伏感染与活动性结核病的鉴别诊断[J]. 中国防痨杂志,

2023, 45(3): 253-259.

- [23] 中国防痨协会, 中国防痨协会学校与儿童结核病防治专业分会, 《中国防痨杂志》编辑委员会. 重组结核杆菌融合蛋白(EC)临床应用专家共识[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(8): 761-768.
- [24] Yu, J., Fan, X., Luan, X., *et al.* (2023) A Novel Multi-Component Protein Vaccine ECP001 Containing a Protein Polypeptide Antigen nPstS1 Riching in T-Cell Epitopes Showed Good Immunogenicity and Protection in Mice. *Frontiers in Immunology*, **14**, Article 1138818. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1138818>
- [25] 屈蓉, 吴康, 吴娟, 等. 结核分枝杆菌早期分泌蛋白 MPT64 的原核表达及其在结核病血清学诊断上的初步应用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(5): 566-570.
- [26] Ma, Z., Ji, X., Yang, H., *et al.* (2020) Screening and Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* Diagnostic Antigens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **39**, 1959-1970. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03951-3>
- [27] Chen, P., Meng, Y., Liu, T., *et al.* (2023) Sensitive Urine Immunoassay for Visualization of Lipoarabinomannan for Noninvasive Tuberculosis Diagnosis. *ACS Nano*, **17**, 6998-7006. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c01374>
- [28] Talreja, J., Peng, C., Nguyen, T.M., *et al.* (2023) Samavati L. Discovery of Novel Transketolase Epitopes and the Development of IgG-Based Tuberculosis Serodiagnostics. *Microbiology Spectrum*, **11**, e0337722. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03377-22>