

Supplemental Table S1: Results of full bacterial species identification (including reference results) for 50 suspected NTM samples detected by three sequencing methods

Sample	tNS	mNGS	Sanger	Reference results
Y002	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.abscessus</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.abscessus</i> ; <i>M.tuberculosis</i>
Y003	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>
Y010	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
Y011	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>
Y013	<i>M.colombiense</i>	<i>M.colombiense</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.bouchedurhonense</i>	<i>M.colombiense</i>
Y018	<i>M.intracellulare</i>	<i>M.intracellulare</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.paraintracellulare</i>	<i>M.intracellulare</i>
Y023	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.conceptionense</i>	double peaks	<i>M.fortuitum</i>
Y026	<i>M.parafortuitum</i> ; <i>M.psychrotolerans</i>	<i>M.sp025263565</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>Pseudomonas bharatica</i>	<i>M.sp025263565</i>
Y031	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>
Y037	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.fortuitum</i>	double peaks	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>
Y040	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y045	<i>M.virginiense</i>	<i>M.virginiense</i>	double peaks	<i>M.virginiense</i>
Y046	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y048	<i>M.abscessus</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i> ; <i>M.tuberculosis</i>
Y049	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y050	<i>M.cosmeticum</i>	<i>M.cosmeticum</i>	double peaks	<i>M.cosmeticum</i>
Y057	<i>M.mageritense</i>	<i>M.mageritense</i>	double peaks	<i>M.mageritense</i>

Continued on the table below

Continued from table above

Y058	<i>M.porcinum;M.septicum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>
Y060	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y061	<i>M.colombiense</i>	<i>M.colombiense;M.tuberculosis</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.colombiense</i>
Y067	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y068	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum;M.abscessus</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>
Y069	<i>M.abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y073	<i>M.fortuitum;M.tuberculosis</i>	<i>M.fortuitum;M.tuberculosis;M.abscessus</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.fortuitum;M.tuberculosis</i>
Y076	<i>M.kansasii</i>	<i>M.kansasii;M.abscessus</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.kansasii</i>
Y077	<i>M.kyogaense;M.obuense</i>	<i>M.kyogaense</i>	Fail	<i>M.kyogaense</i>
Y079	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.brisbanense</i>
Y090	<i>M.intracellulare;M.gordonae;M.chimaera</i>	<i>M.intracellulare;M.gordonae</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.intracellulare;M.gordonae</i>
Y091	<i>M.mageritense</i>	<i>M.mageritense</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.mageritense</i>
Y092	<i>M.peregrinum</i>	<i>M.peregrinum</i>	<i>double peaks</i>	<i>M.peregrinum</i>
Y093	<i>Nocardia</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>
Y094	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y095	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>
Y097	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>
Y098	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>
Y099	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>

Continued on the table below

Continued from table above

Y100	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>
Y101	<i>M.kansasii</i> ; <i>M.gastri</i>	<i>M.tuberculosis</i>	double peaks	<i>M.kansasii</i> ; <i>M.tuberculosis</i>
Y103	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i> ; <i>M.tuberculosis</i>
Y121	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	<i>M.abscessus</i>
Y122	<i>M.neoaurum</i>	<i>M.neoaurum</i>	<i>M.neoaurum</i>	<i>M.neoaurum</i>
Y123	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y124	<i>M.farcinogenes</i> ; <i>M.senegalense</i>	<i>M.farcinogenes</i> ; <i>M.senegalense</i>	<i>M.farcinogenes</i>	<i>M.farcinogenes</i> ; <i>M.senegalense</i>
Y125	<i>M.porcinum</i>	<i>M.porcinum</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.porcinum</i>
Y126	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y127	<i>M.mageritense</i>	<i>M.mageritense</i>	<i>Tsukamurella inchoensis</i>	<i>M.mageritense</i>
Y128	<i>M.brisbanense</i>	<i>M.brisbanense</i>	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	<i>M.brisbanense</i>
Y129	<i>M.kyogaense</i> ; <i>M.obuense</i>	<i>M.kyogaense</i>	<i>M.kyogaense</i>	<i>M.kyogaense</i>
Y130	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>
Y131	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>

Supplemental Table S2: Information of Samples with Inconsistent NTM Species Identification Results Using Three Sequencing Methods

Initial samples [#]	tNS	mNGS	Sanger	Reference results
<i>M. abscessus</i>				
Y048	<i>M. abscessus</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> ; <i>M. tuberculosis</i>
Y077	<i>M. kyogaense</i> ; <i>M. obuense</i>	<i>M. kyogaense</i>	/	<i>M. kyogaense</i>
Y121	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. fortuitum</i>				
Y037	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	double peaks	
Y002	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. abscessus</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. abscessus</i> ; <i>M. tuberculosis</i>
Y023	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. conceptionense</i>	double peaks	<i>M. fortuitum</i>
Y031	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>
Y068	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. lentiflavum</i>				
Y010	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>
Y011	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>
Continued on the table below				

Continued from table above

M.intracellulare

Y013	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bouchedurhonense</i>	<i>M. colombiense</i>
Y018	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. paraintracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
Y061	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. colombiense</i>

M.tuberculosis+*Mycobacterium*
spp.

Y073	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. abscessus</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>
------	---	--	---------------------	---

M. kansasii

Y076	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> ; <i>M. abscessus</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. kansasii</i>
------	--------------------	---	---------------------	--------------------

Mycobacterium spp.

Y026	<i>M. parafortuitum</i> ; <i>M. psychrotolerans</i>	<i>M. sp025263565</i> <i>M. tuberculosis</i>	<i>Pseudomonas bharatica</i>	<i>M. sp025263565</i>
Y045	<i>M. virginiense</i>	<i>M. virginiense</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. virginiense</i>
Y050	<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. cosmeticum</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. cosmeticum</i>
Y057	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. mageritense</i>
Y058	<i>M. porcinum</i> ; <i>M. septicum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. porcinum</i>
Y079	<i>M. brisbanense</i>	<i>M. brisbanense</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. brisbanense</i>

Continued on the table below

Continued from table above

Y090	<i>M. gordonae</i>	<i>M. intracellulare</i> ; <i>M. gordonae</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. gordonae</i> ; <i>M. intracellulare</i>
Y091	<i>M. mageritense</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. mageritense</i>
Y092	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. peregrinum</i>
Y093	<i>Nocardia</i> *	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Nocardia</i> *	<i>Nocardia</i> *
Y101	<i>M. kansasii</i> ; <i>M. gastri</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>double peaks</i>	<i>M. kansasii</i> ; <i>M. tuberculosis</i>
Y103	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. tuberculosis</i>
Y124	<i>M. farcinogenes</i> ; <i>M. senegalense</i>	<i>M. farcinogenes</i> ; <i>M. senegalense</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. farcinogenes</i> ; <i>M. senegalense</i>
Y125	<i>M. porcinum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. porcinum</i>
Y127	<i>M. brisbanense</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>Tsukamurella inchoensis</i>	<i>M. mageritense</i>
Y128	<i>M. kyogaense</i> ;	<i>M. brisbanense</i>	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	<i>M. brisbanense</i>
Y129	<i>M.kyogaense</i> ; <i>M. obuense</i>	<i>M. kyogaense</i>	<i>M. kyogaense</i>	<i>M. kyogaense</i>

Note: #: Identified by fluorescent PCR probe melting curve analysis; *: Non-targeted species, identified to the genus level but not species level.