

• 论 著 •

# 结核分枝杆菌特异性 $\gamma$ -干扰素化学发光免疫检测体系的建立\*

袁世超<sup>1,2</sup>, 谢桂华<sup>3</sup>, 侯维娟<sup>2</sup>, 陈 钰<sup>2</sup>, 张宏斌<sup>2△</sup>, 焦培荣<sup>1▲</sup>

1. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510651; 2. 中国人民解放军南部战区

总医院基础医学实验室, 广东广州 510010; 3. 广州市雷德生物科技有限公司, 广东广州 510607

**摘要:**目的 建立一种用于便携式检测结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素的化学发光免疫检测体系, 为下一步研制便携式检测试剂盒奠定基础。方法 利用生物素-链霉亲和素系统偶联磁珠和抗体, 利用酰胺键结合方式偶联吖啶酯和标记抗体。采用正交实验法, 优化结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素检测试剂盒所需的吖啶酯标记检测抗体及磁珠偶联包被抗体的方法、缓冲液配方、封闭液配方等条件。最后将建立的检测体系与商品化酶联免疫吸附试验(ELISA)参照试剂盒进行比较。结果 建立的检测体系与商品化 ELISA 参照试剂盒阳性符合率为 99.20%, 阴性符合率为 98.91%, 总符合率为 99.10%, Kappa 值为 0.982, 最低检出限 0.66 pg/mL。结论 建立的便携式结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素化学发光免疫检测体系与 ELISA 参照试剂盒相比具有类似的检测能力, 可用于临床辅助诊断。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 化学发光;  $\gamma$ -干扰素释放实验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.08.015

中图分类号: R446.6

文章编号: 1673-4130(2023)08-0973-06

文献标志码: A

## Establishment of a system of chemiluminescence immunoassay for specific Mycobacterium tuberculosis interferon- $\gamma$ \*

YUAN Shichao<sup>1,2</sup>, XIE Guihua<sup>3</sup>, HOU Weijuan<sup>2</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>, ZHANG Hongbin<sup>2△</sup>, JIAO Peirong<sup>1▲</sup>

1. College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510651, China;

2. Experimental Department of Basic Medicine, General Hospital of Southern

Theater Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 3. Guangzhou Leide Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510607, China

**Abstract:** Objective To establish a chemiluminescence immunoassay which can portably detect the specific Mycobacterium tuberculosis interferon- $\gamma$ , so as to lay a foundation for the development of portable detection kit in the next step. **Methods** A biotin streptavidin system was used to couple magnetic beads and antibodies, and an amide bond was used to couple acridine ester and label antibodies. Using orthogonal experimental method to optimize the conditions such as the method, buffer solution formula, and blocking solution formula for acridine ester labeling detection antibodies and magnetic bead coupling coated antibodies required for the specific Mycobacterium tuberculosis interferon- $\gamma$  detection kit. Finally, the established detection system was compared with the commercial ELISA reference kit. **Results** When the established detection system was compared with commercial ELISA reference kit, the positive coincidence rate was 99.20%, the negative coincidence rate was 98.91%, the total coincidence rate was 99.10%, Kappa value was 0.982, and the minimum detection limit was 0.66 pg/mL. **Conclusion** The established portable chemiluminescence immunoassay system for specific Mycobacterium tuberculosis interferon- $\gamma$  compared with the ELISA reference kit has the same detection ability and could be used for clinical auxiliary diagnosis.

**Key words:** Mycobacterium tuberculosis; chemiluminescence; interferon- $\gamma$  release assay

结核分枝杆菌是单一传染源的头号死因, 2021 年 病率居全球第 2 位, 在这之中仅 47% 患者可通过病原 中国新发结核病患者约 84.2 万, 约占全球 8.5%, 发 学确诊, 低于全世界 57% 的检出率<sup>[1-3]</sup>。而准确诊断

\* 基金项目: 广州市科技计划项目(201604020106; 201904010081)。

作者简介: 袁世超, 男, 硕士研究生在读, 主要从事传染病检测研究。 △ 通信作者, E-mail: zhangwater@hotmail.com。 ▲ 共同通信作者, E-mail: prjiao@scau.edu.cn。

疾病可使结核病患者避免死亡<sup>[4]</sup>。

目前,结核检测方法有结核菌素皮肤试验(TST)、涂片镜检、细菌培养、结核抗体检测、 $\gamma$ -干扰素体外释放酶联免疫试验(TB-IGRA)、荧光定量和探针聚合酶链反应(PCR)、表型药敏试验等<sup>[5-7]</sup>,这些方法都存在各自的优缺点,如 TST 受卡介苗和非结核分枝杆菌干扰,判断结果主观性较高,细菌培养对实验室及技术人员的要求高,肺外结核取样困难和耗时长<sup>[8-10]</sup>;涂片镜检灵敏度和特异性低<sup>[11]</sup>;实时荧光定量 PCR 检测阴性时,不能排除结核分枝杆菌感染<sup>[11]</sup>。TB-IGRA 可以很好地避免上述问题,此外,化学发光法与免疫分析法的结合,不仅具备较高的检测灵敏度与特异性,同时操作难度低,检测速度快。两种方法的联合运用,更进一步提升了检测方法的检测效率,扩大了应用范围,降低了实验成本,也带来了更多可能性<sup>[12-13]</sup>。虽然 TB-IGRA 检测效果好,但现有酶联免疫吸附试验(ELISA)及化学发光法需要大型仪器和场地,在结核病高发的偏远地区和结核病突发的筛查中难以实施。今年距离实现联合国“2030 年可持续发展议程”结核病控制目标和“2035 年终止结核病流行”目标,只剩下 8 年和 13 年的时间,现有的定点医疗机构无法满足目前控制结核病的需要<sup>[14-15]</sup>。因此,建立一种可用于便携式检测结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素的化学发光免疫检测体系,进而研制出便携式检测试剂盒和装置对结核病的有效防控十分有必要。

本研究拟在结核  $\gamma$ -干扰素释放实验全血检测法的基础上,建立用于便携式结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素化学发光免疫检测体系,为下一步研制便携式检测试剂盒和装置鉴定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料来源** 实验所需样本来自广州市雷德生物科技有限公司结核诊断试剂盒 AIMTB(注册证号:20193400999)生产用标准阳性和阴性对照样品。

**1.2 主要试剂** 吡啶酯(NSP-SA-NHS)购自美凯特公司,曲拉通 X100 购自 Sigma 公司,MS300/Carboxyl 磁珠购自北京博尔迈科技有限公司,重组人  $\gamma$ -干扰素、标记抗体(Anti-IFN- $\gamma$ -AE,批号 20200909)、包被抗体(Anti-IFN- $\gamma$ ,批号 20201105)均为广州市雷德生物科技有限公司研制,ELISA 试剂盒购自北京万泰生物公司,化学发光免疫分析仪购自科斯迈生物科技有限公司,Sephedex G-15 柱购自上海源叶生物科技有限公司,1-乙基 3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)均购自赛默飞公司,过氧化氢、氢氧化钠(NaOH)、甘氨酸等试剂均为国产分析纯,其余 PTS 预激发液、PBS 缓冲液、Tris 缓冲液等均为实验室自制。

## 1.3 方法

**1.3.1 发光物标记抗体** (1)分别以吡啶酯:抗体的摩尔比为 10 : 1、15 : 1 和 20 : 1 的比例在室温下避光反应 0.5 h。(2)反应完成后,将所得混合液通过 Sephadex G-15 柱进行纯化。(3)纯化完成后的标记抗体(Anti-IFN- $\gamma$ -AE)加入抗体稀释液作为检测抗体保存备用。

**1.3.2 磁珠偶联包被抗体** 采用一步法和两步法进行磁珠偶联。一步法:(1)将 2 mg 磁珠分散开,然后加入 100  $\mu$ g 包被抗体反应 0.5 h。(2)加入 0.5 mg 的 EDC 反应 1.5 h。(3)加入 10%甘氨酸和 Tris 缓冲液封闭反应。(4)所得溶液用 PBS 进行洗涤并重悬,作为一步法制备包被抗体保存备用。两步法:(1)将 2 mg 磁珠分散开,然后加入 EDC 和 NHS 反应 0.5 h。(2)加入包被抗体,再反应 1.5 h。(3)加入 10%甘氨酸和 Tris 缓冲液封闭反应。(4)所得溶液放置到磁力架上,待出现沉淀后,吸取上清液弃掉,并再次加入 pH7.4 的 PBS 进行洗涤,重复 3 次,完成后加入 pH7.4 的 PBS 进行重悬,作为两步法制备包被抗体保存备用。

**1.3.3 标记抗体和包被抗体的测定** (1)取 1.3.1 中制备的检测抗体溶液各 50  $\mu$ L,每组分别加入 50  $\mu$ L 重组人  $\gamma$ -干扰素(0、100 和 1 000 pg/mL);(2)加入 50  $\mu$ L 1.3.2 中两步法制备的包被抗体(磁珠偶联的 Anti-IFN- $\gamma$ ),在磁力架上吸附洗涤后测定发光强度。(3)取 1.3.2 中制备的包被抗体各 50  $\mu$ L,每组分别加入 50  $\mu$ L 重组人 IFN- $\gamma$ (0、100 和 1 000 pg/mL),加入 50  $\mu$ L 1.3.1 中摩尔比 15 : 1 制备的标记抗体进行反应,在磁力架上吸附洗涤后测定发光强度。

**1.3.4 磁珠偶联包被抗体投料比的优化** 以两步偶联法优化磁珠和包被抗体的投料比。(1)取 MS300/Carboxyl 磁珠 2 mg,分别与 75、100、125 和 150  $\mu$ g 的包被抗体进行偶联,形成投料比为 1 : 27、1 : 20、1 : 16 和 1 : 13 的体系。(2)上述 4 组偶联物各取 50  $\mu$ L,每组分别加入 50  $\mu$ L 重组人  $\gamma$ -干扰素(0、100 和 1 000 pg/mL),加入 50  $\mu$ L 摩尔比 15 : 1 制备的标记抗体进行反应,在磁力架上吸附洗涤后测定发光强度。

**1.3.5 磁珠偶联包被抗体其他条件的优化** 封闭缓冲液:(1)采用两步法偶联工艺,分别选择 pH5.0 的 10 mmol/L MES 缓冲液、pH7.2 的 25 mmol/L Tris 缓冲液和 pH7.2 的 10 mmol/L PBS 缓冲液,制备包被抗体。(2)各取 50  $\mu$ L 上述 3 种缓冲液制备的包被抗体,每组分别加入 50  $\mu$ L 重组人  $\gamma$ -干扰素(0、100 和 1 000 pg/mL),洗涤后加入 50  $\mu$ L 摩尔比 15 : 1 制备的标记抗体进行反应,测定发光强度。

封闭试剂:(1)采用两步法偶联工艺,分别以 10%

甘氨酸 Tris 缓冲液和 10% 赖氨酸 Tris 缓冲液作为封闭试剂,制备包被抗体。(2)各取 50  $\mu$ L 上述两种封闭试剂制备的包被抗体,每组分别加入 50  $\mu$ L 重组人  $\gamma$ -干扰素(0、100 和 1 000 pg/mL),洗涤后加入 50  $\mu$ L 摩尔比 15 : 1 制备的标记抗体进行反应,测定发光强度。

反应时间:(1)采用两步法偶联工艺制备包被抗体,分别在反应 1.0、1.5 和 2.0 h 时取 50  $\mu$ L 制备的包被抗体,加入 50  $\mu$ L 重组人  $\gamma$ -干扰素(0、100 和 1 000 pg/mL),洗涤后加入 50  $\mu$ L 摩尔比 15 : 1 制备的标记抗体进行反应,测定发光强度。

**1.3.6 通用试剂配方的优化** (1)设置 3 组预激发液,分别为 PTS1(0.1 mol/L  $\text{HNO}_3$  和 0.1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、PTS2(0.1 mol/L  $\text{HNO}_3$  和 1.0%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )和 PTS3(0.05 mol/L  $\text{HNO}_3$  和 1.0%  $\text{H}_2\text{O}_2$ );设置 4 组激发液,TS1(1 mol/L NaOH)、TS2(0.1 mol/L NaOH)、TS3(0.5 mol/L NaOH)和 TS4(0.75 mol/L NaOH 和 0.5% TritonX-100)。(2)上述试剂各取 50  $\mu$ L 采用正交实验进行对比测试。

**1.3.7 性能评价** 标准曲线:设置 1、8、48、240、1 200 和 6 000 pg/mL 进行发光值测定,每个浓度重复 3 次,绘制标准曲线。准确度:对 1 000 pg/mL 和 50 pg/mL 样本进行 3 次重复试验,检测发光值,计算准确度。重复性:对 1 000 pg/mL 和 50 pg/mL 样本进行 10 次重复试验,检测发光值,计算重复性。批间差:对不同批次的产品在样本浓度为 1 000 pg/mL 和 50 pg/mL 的条件下进行发光值检测,重复 10 次计算批间差。最低检出限:用已经建立的化学发光检测法检测 1 pg/mL 的重组人  $\gamma$ -干扰素,重复 20 次,计算出其最低检出限。一致性:比较 ELISA 和化学发光免疫法结果的一致性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS25.0 软件进行数据处理及统计分析,计算本研究所建立的方法与 ELISA 的 Kappa 值,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 吡啶酯标记抗体的投料比** 3 个摩尔比均能产生化学发光,发光强度随着标记比例升高发光值呈上升趋势,见图 1。但 15 : 1 的组间变异系数为 5.0%、4.7% 和 3.3%,小于 20 : 1 的相应组间变异系数为 7.2%、3.5% 和 5.4%,因此选择吡啶酯与抗体的标记比例(摩尔比)为 15 : 1。

**2.2 磁珠的偶联方法** 浓度为 1 000 pg/mL 时,两种不同偶联方法发光值相当,而两步法的组间变异系数为 4.0%、2.3% 和 2.0%,明显小于一步法的组间变异系数(10.3%、3.8% 和 4.1%),见图 2,因此选择两步法。

**2.3 磁珠偶联包被抗体的投料比** 浓度为 1 000 pg/mL 时,投料比由 1 : 16 提高到 1 : 27,发光值呈

明显升高趋势;1 : 20 与 1 : 27 相比,发光值变化趋势不明显,见图 3,基于成本考虑选择 1 : 20。

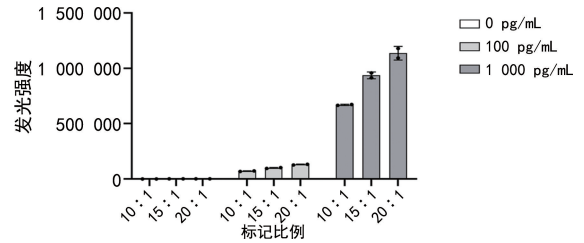


图 1 3 组不同吡啶酯标记抗体比例的发光强度

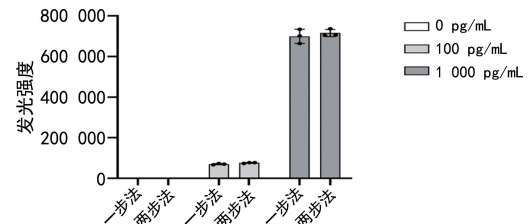


图 2 两种磁珠偶联方法的发光强度

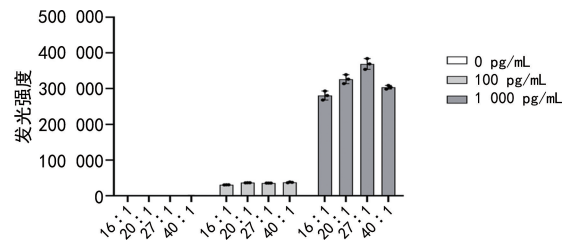


图 3 4 组磁珠偶联包被抗体比例的发光强度

**2.4 磁珠偶联的封闭缓冲液、封闭试剂和反应时间** 浓度为 1 000 pg/mL 时,Tris 缓冲液的发光值最高,且变异系数最小,为 6.0%;MES 缓冲液和 PBS 缓冲液的发光值则明显下降;在 Tris 缓冲体系中封闭的效果最好,见图 4。当浓度为 0 pg/mL 的本底值及 1 000 pg/mL 时,10% 甘氨酸和 10% 赖氨酸两种封闭剂的发光值表现基本一致,见图 5,基于成本考虑选择甘氨酸作为偶联磁珠的封闭试剂。反应时间 1.0、1.5 和 2.0 h 的发光值差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),延长反应时长发光值无升高趋势,见图 6,因此选择磁珠偶联反应时长为 1.0 h。

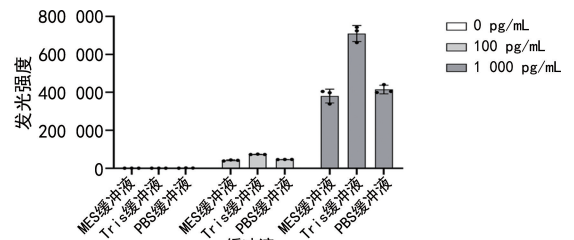


图 4 3 组封闭缓冲液发光强度

**2.5 通用试剂的比较** PTS3+TS4 组合测试的发光值与对照试剂接近,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。因此选择预激发液配方为 0.05 mol/L  $\text{HNO}_3$  + 1.0%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;激发液配方为 0.75 mol/L NaOH + 0.5% TritonX-100+0.2% CTAC。

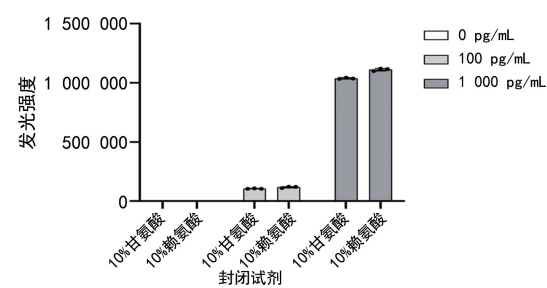


图 5 两种封闭试剂的发光强度

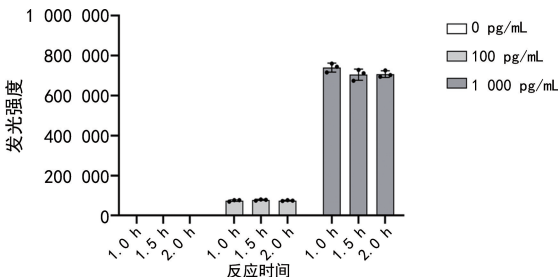


图 6 不同偶联反应时间的发光强度

**2.6 性能评价** 本体系中结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素的最低检出限为 0.66 pg/mL, 发光值为 2 929。与商品化 ELISA 试剂盒的一致性阳性符合率为 99.20% (95%CI: 97.64%~100.76%), 阴性符合率为 98.91% (95%CI: 96.79%~101.03%), 不确定符合率为 100.00% (95%CI: 100.00%~100.00%), 总符合率为 99.10% (95%CI: 97.86%~100.34%), Kappa 值为 0.982。标准曲线  $Y = 0.998\ 4X - 6.902\ 8$ ,  $R^2 = 0.999\ 9$ , 见表 1、图 7。1 000 pg/mL 的准确度为 -0.51%, 50 pg/mL 的准确度为 4.36%, 见表 2。1 000 pg/mL 的重复性为 2.83%, 50 pg/mL 的重复性为 2.80%, 见表 3。1 000 pg/mL 的批间差为 5.1%, 50 pg/mL 的批间差为 1.2%, 见表 4。

表 1 ELISA 与化学发光法检测结果比较 (n)

| 方法    | 结果  | ELISA |    |     |
|-------|-----|-------|----|-----|
|       |     | 阳性    | 阴性 | 不确定 |
| 化学发光法 | 阳性  | 124   | 1  | 0   |
|       | 阴性  | 1     | 91 | 0   |
|       | 不确定 | 0     | 0  | 5   |
| 合计    |     | 125   | 92 | 5   |

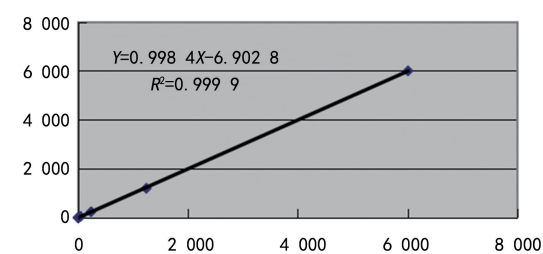


图 7 标准曲线

表 2 准确度

| 浓度          | 平均值     | 相对偏差 (%) |
|-------------|---------|----------|
| 1 000 pg/mL | 994.915 | 0.51     |
| 50 pg/mL    | 52.180  | 4.36     |

表 3 重复性

| 浓度          | 平均值       | $\bar{x}$ | 变异系数 (%) |
|-------------|-----------|-----------|----------|
| 1 000 pg/mL | 1 001.210 | 28.29     | 2.83     |
| 50 pg/mL    | 50.815    | 1.42      | 2.80     |

表 4 批间差

| 浓度          | 平均值     | $\bar{x}$ | 变异系数 (%) |
|-------------|---------|-----------|----------|
| 1 000 pg/mL | 979.540 | 49.91     | 5.1      |
| 50 pg/mL    | 52.080  | 0.64      | 1.2      |

3 讨 论

结核病是影响人类健康的常见传染病, 主要通过呼吸道传播, 并可在人与动物之间传播<sup>[16-18]</sup>。目前, 结核病检查方法有很多种, 常见的有影像学检查、涂片镜检、细菌培养、PCR 检测、结核抗体检测、TST、TB-IGRA 等。其中,  $\gamma$ -干扰素释放试验 (IGRA) 是细胞免疫介导的 TB-IGRA, 因其检测快速、使用方便和准确等特点, 已经被世界卫生组织和美国疾病控制与预防中心推荐, 作为感染结核分枝杆菌诊断的辅助手段<sup>[19-21]</sup>。IGRA 主要分为酶联免疫斑点法和全血检测法两大类<sup>[22]</sup>。该实验是对人外周血进行体外刺激培养所产生的  $\gamma$ -干扰素进行检测。IGRA 在免疫功能低下人群中的诊断价值与在免疫功能正常人群中的诊断价值不同, 因为它们的结果受到宿主免疫功能的影响, 而生理和病理因素均可导致免疫功能受损<sup>[23]</sup>。该实验原理主要在于当 T 细胞被结核分枝杆菌刺激, 致敏后再次遇到同类抗原会导致  $\gamma$ -干扰素的产生, 因此对该干扰素进行检测, 能够有效判断患者是否存在结核分枝杆菌感染情况<sup>[24]</sup>。同时, IGRA 检测结核分枝杆菌潜伏感染病例的灵敏度不受年龄的影响<sup>[17]</sup>。通过将化学发光法与 IGRA 相结合, 不仅能够大大提高实验结果的准确性, 同时也能降低检测结果的最低检出限。

化学发光法作为一种 20 世纪 90 年代才迅速兴起的一种新型检测技术, 在灵敏度和线性范围方面较其他检测技术有大幅度地提高, 并且从环境污染等方面综合考虑, 都有足够的优势发展成为新一代的免疫学诊断技术, 因此其越来越多地受到临床诊断实验室的关注, 是近年来该领域的研究热点<sup>[25-27]</sup>。本研究对化学发光法的主要条件进行了系统的筛选和优化, 包括发光标志物制备工艺、磁珠结合包被抗体工艺、通用试剂的配方、反应体系研究、灵敏度的确定、一致性的确定, 优化了各个组分的配方和反应体系, 考察了各组分和整套试剂的稳定性, 达到了本次研究的最佳条件, 最终建立了结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素化学发光检测体系并对其进行了评价。本研究所建立的

方法对质控样品的最低检出限达到了 0.66 pg/mL,建立的检测体系各项参数进行优化后与 ELISA 进行比对,阳性符合率为 99.20%,阴性符合率为 98.91%,总符合率为 99.10%,能够满足临床检测所要求。

综上所述,本研究中所建立的化学发光法结核分枝杆菌特异性  $\gamma$ -干扰素检测体系可用于结核病的临床快速诊断。该方法具有标准化程序和客观性,减少了结核菌素皮内变态反应实验因注射技术和读数而产生的主观偏差,尤其对肺外结核、菌阴结核患者的应用价值较高,可为结核病的流行病学调查及该病的诊断提供新的实用技术。

## 参考文献

- [1] ALTAWALLBEH G, GABRIELSON D, PETERS J M, et al. Performance of an advanced interferon-gamma release assay for mycobacterium tuberculosis detection[J]. J Appl Lab Med, 2021, 6(5): 1287-1292.
- [2] World Health Organization. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019 [EB/OL]. (2020-12-09) [2022-04-10]. <https://www.who.int/zh/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>.
- [3] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021 [EB/OL]. (2021-10-14) [2022-04-10]. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.
- [4] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017 [EB/OL]. (2018-02-08) [2022-04-10]. <http://www.who.int/tb/publications/global-report/en/>.
- [5] 林冲, 陈玲. 结核病实验室诊断技术新进展[J/OL]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(36): 7535.
- [6] 张书, 龙波, 高媛, 等. 结核分枝杆菌感染快速检测方法与产品评价[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2019, 17(1): 65-69.
- [7] 玉明科, 黄家运, 邓晨, 等. 结核潜伏感染检测方法研究及应用进展[J]. 应用预防医学, 2019, 25(2): 169-172.
- [8] JANUARIE K C, UHUO O V, IWUOHA E, et al. Recent advances in the detection of interferon-gamma as a TB biomarker[J]. Anal Bioanal Chem, 2022, 414(2): 907-921.
- [9] SMITH K, KLEYNHANS L, WARREN R M, et al. Cell-mediated immunological biomarkers and their diagnostic application in livestock and wildlife infected with mycobacterium bovis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 639605.
- [10] ANG M, VASCONCELOS-SANTOS D V, SHARMA K, et al. Diagnosis of ocular tuberculosis[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2018, 26(2): 208-216.
- [11] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学和免疫学分会临床微生物学组. 综合医院结核分枝杆菌感染实验室检查共识[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(4): 343-353.
- [12] KIM J J, PARK Y, CHOI D, et al. Performance evaluation of a new automated chemiluminescent immunoanalyzer-based interferon-gamma releasing assay AdvanSure I3 in comparison with the QuantiFERON-TB gold in-tube assay[J]. Ann Lab Med, 2020, 40(1): 33-39.
- [13] LIANG Y, YANG Y, HOU Y, et al. Comparison of three cellular immunoassays to detect tuberculosis infection in 876 healthy recruits[J]. J Interferon Cytokine Res, 2019, 39(9): 547-553.
- [14] 王黎霞. 结核病防治可持续发展之路——回顾“十三五”展望“十四五”[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(1): 3-5.
- [15] 马艳, 陆伟, 高磊, 等. 终止结核病流行须加强结核分枝杆菌潜伏感染高危人群筛查和预防性治疗的管理[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(3): 209-214.
- [16] SONGTHAMMANUPHAP S, PUTHONG S, PONGMA C, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex infection in Asian elephants (*Elephas maximus*) using an interferon gamma release assay in a captive elephant herd[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14551.
- [17] 弓艳娥, 郭旭霞, 杨金华, 等. TB-IGRA 联合 HLA-G 检测对结核分枝杆菌感染患者的诊断效果评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(21): 3215-3218.
- [18] ZELLWEGER J P, SOTGIU G, CORRADI M, et al. The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI): currently available tests, future developments, and perspectives to eliminate tuberculosis (TB) [J]. Med Lav, 2020, 111(3): 170-183.
- [19] LALVANI A, PATHAN A A, MCSHANE H, et al. Rapid detection of mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific t cells[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 824-828.
- [20] LALVANI A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy[J]. Chest, 2007, 131(6): 1898-1906.
- [21] MAZUREK G H, JEREB J, VERNON A, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect mycobacterium tuberculosis infection—United States, 2010 [J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(5): 1-25.
- [22] 杨蕾, 王国治, 都伟欣, 等. 结核分枝杆菌特异性 IFN $\gamma$  体外释放试验全血检测试剂盒的质量评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(2): 160-163.
- [23] YANG Y, WANG H J, HU W L, et al. Diagnostic value of interferon-gamma release assays for tuberculosis in the immunocompromised population [J]. Diagnostics (Basel), 2022, 12(2): 453.

(下转第 982 页)

断过程提供重要的信息,但是这些结果容易受到内源性变异的干扰,从而影响最终的结果解释。因此利用大数据建立不同地区、实验室、人群、年龄段的参考区间,评估特定患者的实际检测结果与疾病的联系,对于临床医生和患者都非常有益。间接法建立参考区间具有耗时短、成本低、准确度高的优势,在未来有很好的应用前景。

本研究使用间接法建立了成都市郫都区女性肿瘤标志物 AFP、CEA、CA125、CA153、CA199 的年龄特异性参考区间,为更好地筛查不同年龄女性肿瘤相关疾病提供参考依据,有助于肿瘤疾病的预防及鉴别诊断。

参考文献

[1] 段新如,汪修平,王爱民. 血清肿瘤标志物检测在非小细胞肺癌侵袭和转移中的意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2020,27(3):85-88.

[2] 庄严,王朝晖,王启茹,等. 江苏兴化地区血清肿瘤标志物 AFP、CEA、CA125 微粒子酶促化学发光法检测的参考区间研究[J]. 医学检验与临床,2020,31(10):9-15

[3] 赵瀛,沈隽霏,吴文浩,等. LMS 方法评估女性中糖类抗原 125 参考区间的年龄适用性[J]. 中国临床医学,2017, 24(6):954-957.

[4] LU J, ZHENG Z P, ZHANG Q, et al. Measurement of HE 4 and CA125 and establishment of reference intervals for the ROMA index in the sera of pregnant women[J]. J Clin Lab Anal,2018,32(5):e22368.

[5] 秦绪珍,刘挺,张瑞丽,等. 血清 AFP、CEA、CA125 和 SC-CAg 参考范围研究[J]. 标记免疫分析与临床,2015,22 (4):326-329.

[6] 黄超宇,陈毅,韦德俊,等. 柳州地区成人血清 CEA、AFP 水平分析[J]. 名医,2019,10(9):124-126.

[7] 朱学彤,王凯瑾,周琪,等. 基于实验室信息系统建立甲状腺激素参考区间[J]. 中华内科杂志,2020,59(2):129-133.

[8] 中华人民共和国卫生部. 临床实验室检验项目参考区间制定:WS/T 402—2012[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.

[9] LO SASSO B, VIDALI M, SCAZZONE C, et al. Refer-

ence interval by the indirect approach of serum thyrotropin (TSH) in a Mediterranean adult population and the association with age and gender[J]. Clin Chem Lab Med, 2019,57(10):1587-1594.

[10] ICHIHARA K,BOYD J C. IFCC committee on reference intervals and decision limits (C-RIDL). An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals[J]. Clin Chem Labor Med,2010,48(11):1537-1551.

[11] ROHR U P,BINDER C,DIETERLE T,et al. The value of in vitro diagnostic testing in medical practice;a status report[J]. PLoS One,2016,11:e0149856.

[12] 刘晓文,沈隽霏,吴文浩,等. 采用间接法建立上海地区游离甲状腺素和促甲状腺激素参考区间[J]. 临床检验杂志,2020,38(5):380-383.

[13] 赵立悦,叶贵诚,袁春雷,等. 运用实验室数据建立中山地区孕妇 TSH 的参考区间[J]. 国际检验医学杂志,2020, 41(2):184-188

[14] 陈政君,沈隽霏,宋斌斌,等. 评价间接法在癌抗原 CA724 生物参考区间建立的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2014,37(5):368-370.

[15] 王迪,杨春,张晓威,等. 吉林省 2—14 岁汉族儿童血清碱性磷酸酶参考区间的建立[J]. 重庆医学,2015,44(26): 3618-3621.

[16] WANG D,MA C,ZOU Y,et al. Gender and age-specific reference intervals of common biochemical analytes in Chinese population:derivation using real laboratory data [J]. J Med Biochem,2020,39(3):384-391.

[17] PARK Y J,KIM Y J,LEE E Y,et al. Reference ranges for HE4 and CA125 in a large Asian population by automated assays and diagnostic performances for ovarian cancer[J]. Int J Cancer,2012,130(5):1136-1144.

[18] 吕康琪,陈大洋,张秀明. 深圳市罗湖地区女性不同年龄段 CA125、CEA 和 CA125/CEA 参考区间的建立和验证 [J]. 国际检验医学杂志,2022,43(3):290-295.

[19] 吕园,俞杨,瞿卫,等. 南京及周边地区体检人群 AFP 和 CEA 参考范围的建立[J]. 中国实验诊断学,2016,20 (11):1849-1852.

(收稿日期:2022-05-05 修回日期:2022-12-20)

(上接第 977 页)

[24] 李忠奇,吴冰心,刘巧,等. 结核病实验室诊断技术研究进展[J]. 中国热带医学,2020,20(4):381-384.

[25] CUI Y J,WANG W G,LI P,et al. Preparation of Liuweidihuang nano-microcapsules and its physicochemical properties[J]. Adv Mater Res,2012,41,500-501.

[26] FERNÁNDEZ-HUERTA M, MORETO C, VILA-OLMO N,et al. Evaluation of the fully automated chemiluminescence analyzer liaison XL for the performance of

the QuantiFERON-TB gold plus assay in an area with a low incidence of tuberculosis[J]. J Clin Microbiol,2021, 59(8):e0060321.

[27] BABIN B M,FERNANDEZ-CUERVO G, SHENG J, et al. Chemiluminescent protease probe for rapid, sensitive, and inexpensive detection of live mycobacterium tuberculosis[J]. ACS Cent Sci,2021,7(5):803-814.

(收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-12-25)