

γ 干扰素释放分析 T 细胞斑点试验在诊断结核感染中的应用进展

张建英

作者单位: 274000 山东菏泽, 菏泽市传染病医院检验科

通信作者: 张建英, Email: 15020559982@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2025.03.023

【摘要】 结核感染可危害全身多种器官,其中以肺部损伤风险最高,即肺结核,占比约为 80%。既往在诊断结核感染时常应用结核菌素皮肤试验,但该方法在临床应用过程中逐渐暴露出较多的缺陷。因此,为进一步优化结核感染的诊断效果,该文围绕结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)诊断方法进行了应用探讨,如果存在结核感染,免疫系统会产生针对性的记忆 T 细胞并释放 γ 干扰素。采用 T-SPOT.TB 诊断不同类型结核感染时的敏感度和特异度有所差异,但基本不会低于 70%。该文旨在分析 T-SPOT.TB 诊断方法的应用进展,阐述了人体免疫屏障在结核感染后的应对方法,说明 T-SPOT.TB 的原理,并指出当空白及阳性对照孔中的斑点数分别达到 10 以下和 20 以上时, T-SPOT.TB 实验有效;当空白对照孔的斑点数不超过 6 时,任意实验孔的斑点数与之相减,结果大于 6 即为阳性;当空白对照孔的斑点数大于 6 时,任意实验孔的斑点数与之比值大于 2 即为阳性,重点分析了 T-SPOT.TB 在活动性和潜伏性结核以及肺外结核中的应用进展。

【关键词】 结核感染; T 细胞斑点试验; γ 干扰素释放

Application progress of T cell spot test in diagnosis of tuberculosis infection by interferon- γ release analysis

Zhang Jianying. Department of Clinical Laboratory, Heze Infectious Diseases Hospital, Heze 274000, Shandong, China

Corresponding author: Zhang Jianying, Email: 15020559982@163.com

【Abstract】 Tuberculosis infection may harm any organ in the body, but the risk of lung damage is the highest, accounting for about 80%, which is pulmonary tuberculosis. In the past, the tuberculin skin test was used to diagnose tuberculosis infection, but the method gradually exposed many defects during the application process. Therefore, in order to further optimize the diagnostic effect of tuberculosis infection, the article explores the application of T cell spot test (T-SPOT.TB) diagnostic method. If tuberculosis infection exists, the immune system will produce targeted memory T cells and release interferon- γ . According to the analysis of research results obtained by domestic scholars, the sensitivity and specificity of T-SPOT.TB in diagnosing different types of tuberculosis infections vary among different scholars, but they are generally not less than 70%. The purpose of the article is to analyze the application progress of T-SPOT.TB diagnostic method, elucidate the response methods of human immune barrier after tuberculosis infection, explain the principle of T-SPOT.TB, and point out that T-SPOT.TB experiment is effective when the number of spots in the blank and positive control wells reaches 10 or less and 20 or more, respectively. When the number of spots in the blank control well does not exceed 6, subtracting the number of spots in any experimental well, and the result is greater than 6, it is considered positive. When the number of spots in the blank control well is greater than 6, and the ratio of the number of spots in any experimental well to it is greater than 2, it is considered positive. The application progress of T-SPOT.TB in active and latent tuberculosis, as well as extrapulmonary tuberculosis, was analyzed in detail.

【Key words】 Tuberculosis infection; T-cell spot test; Interferon- γ release

结核感染是临床常见病之一,据不完全统计,全球发生结核感染的人数不低于 20 亿例,每年因该疾病死亡的患者数不少于 200 万例。结核感染对患者体内各系统均有不良影响,特别是肺外结核感染通常发病特征不明显^[1],不利于临床确诊。在结核

感染的诊断中临床常用结核菌素皮肤试验,虽然该方法耗时短,但对免疫功能低下受检者的诊断敏感度较低。近年来, T 细胞斑点试验(T cell spot test, T-SPOT.TB)在结核感染诊断中的应用不断增多,为了分析该技术的应用进展,本文分析结核感染后的

免疫反应、 γ 干扰素释放分析 T-SPOT.TB 的原理以及 T-SPOT.TB 在诊断结核感染中的应用进展。

1 结核感染后的免疫反应

基于对结核感染状态的分析,无感染、活动性感染、潜伏性感染、感染后治愈这 4 种情况可囊括所有人群。结核分枝杆菌是结核感染的主要细菌类型,当其进入人体后,首先引发非特异性免疫应答,在免疫应答过程中激活巨噬细胞,吞噬和消灭细菌^[2]。但由于上述免疫反应的效果比较弱,一般结核感染患者仅依靠这种免疫反应无法控制结核感染病原体的发展。当病原体侵入巨噬细胞后,通过感染机制会导致细胞程序性死亡,此时,由病原体产生的特异性抗原会从细胞中释放出来,树突状细胞可将其分解为小片段并呈递给特异性细胞如 CD4、CD8、 γ δ T 细胞以及 CD1 限制性 T 细胞,进而触发适应性免疫。在结核免疫反应中,将抗原肽装载到主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex class II, MHC II) 类分子上形成复合物,然后使其与 CD4 特异性细胞结合,从而激活这种特异性细胞,并促进其释放 γ 干扰素,使巨噬细胞发挥抗结核作用^[3]。CD8 特异性细胞可以产生肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ 、颗粒酶和穿孔素,这些物质作用于感染细胞可以获得细胞溶解的效果。对于免疫功能正常的人群而言,大部分人在发生结核感染后可以发挥适应性免疫的功能,这种免疫反应虽然可以控制感染,但感染清除效果较差。发生结核感染后部分结核分枝杆菌会被巨噬细胞吞噬,这类巨噬细胞在纤维的包裹下逐渐变为肉芽肿,从而控制感染。此时机体的结核感染状态为潜伏性感染,这类感染者发生感染的概率约为 10%,并且由于该类人群的体内存在活菌,所以一旦免疫功能减弱,就会增加结核复发风险。

2 γ 干扰素释放分析 T-SPOT.TB 的原理

γ 干扰素释放分析试剂的检测方法存在差异,主要可分为两类,一类以英国某公司的 T-SPOT.TB 试剂为代表,一类以澳大利亚某公司的结核杆菌特异性细胞免疫反应检测 (Quanti FERON-TB gold test, QFT) 试剂和我国某公司的结核杆菌 γ 干扰素体外释放试验 (interferon- γ release assay for tuberculosis, TB-IGRA) 试剂为代表。分析上述两类试剂的应用原理结果表明,二者的主要区别体现在受检者取样以及刺激培养后的试验测定方法等方面^[4]。前者采集的样本为外周血单个核细胞,试验方法为酶

联免疫斑点技术 (enzyme linked immunospot assay, ELISPOT); 后者采集的样本为外周血全血,测定方法为酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。本文主要围绕 T-SPOT.TB 方法展开研究,在原理分析中阐述该方法的具体情况。在诊断中,观察酶与底物之间发生特异性反应后的颜色变化,并利用 ELISPOT 系统进行分析计数,得到斑点 (细胞) 数量,确定抗原特异性细胞的频率。20 世纪 90 年代末期,Behr 等^[5]在基因芯片技术的支持下,对结核分枝杆菌进行了基因分析,围绕这种细菌的标准株 H37Rv 和 BCG 进行了对比研究,结果显示二者的开放读码框存在差异性,后者较前者缺失了 129 个开放读码框,在进一步分析中,研究者将其分为多个区域,并为每个区域赋予唯一编号,即 RD1 ~ RD16。在分析单个区域时发现, RD1 区域中共有 9 个开放读码框,经研究证实,该区域的所有开放读码框均没有出现在卡介苗菌株中,从而可以推断出这些开放读码框最有可能成为特异性抗原,并被免疫系统识别和利用^[6]。发生结核感染后,患者体内会产生具有抗原特异性的 T 细胞,且该种细胞可长期存在不会消失,一旦遇到抗原刺激,会在短时间内激活并增殖,释放 γ 干扰素。基于上述原理支持, Lalvani 等^[7]利用结核杆菌特异性抗原提出了一种诊断结核感染的新方法。在研究中,根据 RD1 编码构建了肽段库,库中主要涉及 ESAT-6、CFP-10,将其作为刺激原,然后将这些肽段加入结核感染患者的外周血样本中,检测 T 淋巴细胞是否因识别这些抗原而释放 γ 干扰素,如果 γ 干扰素测定值较大,则可以确定结核感染的存在。

在 T-SPOT.TB 实验中设置两组实验孔,并将研究中构建的肽段库作为刺激原,然后进行实验分析。在判断实验是否有效时,主要考虑空白对照孔内斑点数是否 < 10 、阳性对照孔内斑点数是否 > 20 ,如果两种指标同时满足 < 10 、 > 20 的要求,则表明实验有效。以空白对照孔的斑点数为对照,在斑点数 ≤ 6 的情况下,如果实验孔-空白对照孔的斑点数 > 6 ,即判定 T-SPOT.TB 实验阳性;在空白对照孔斑点数 > 6 的情况下,如果实验孔 / 空白对照孔的斑点数 > 2 ,即判定 T-SPOT.TB 实验阳性。

3 T-SPOT.TB 在诊断结核感染中的应用进展

3.1 活动性结核病诊断

Lalvani 等^[8]分析 T-SPOT.TB 对活动性结核的诊断效果,研究中共涉及 94 例研究对象,在痰培养结果为阳性的人群中筛选出部

分活动性结核患者纳入病例组,并对病例组设置对照组,分析 T-SPOT.TB 检测结果,两组的敏感度和阳性率差异均有统计学意义,且病例组的检测结果更理想。此外,对比 T-SPOT.TB 和结核菌素皮肤试验效果,结果显示前者的阳性率更高。Dominguez 等^[9]围绕活动性肺结核患者进行病例研究,主要应用 ESAT-6 和 CFP-10 特异性抗原,结合诊断结果计算阳性率为 90.1%。此外,Meier 等^[10]也进行了类似研究,得到的阳性率为 100%。但是也有研究以重症、非重症、活动性和潜伏性结核患者作为研究对象,结果表明这几种结核感染形式的 T 细胞斑点数的重叠范围较大,如果只参考 T-SPOT.TB 阳性结果,难以确诊活动性结核感染。Schepers 等^[11]研究表明,培养滤过蛋白-10- γ 干扰素释放试验 (culture filtering protein-10 interferon- γ release assay, CFP-10-IGRAs) 与结核分枝杆菌蛋白纯化衍生物 (purified protein derivatives, PPD) 试验或 PPD 试验与 IGRAs 联合,都可以筛查出患有活动性结核感染疾病的患儿。该研究中 CFP-10-IGRAs 的特异度为 96%,并且调查结果还表明,研究对象的免疫系统对结核分枝杆菌的 CFP-10 抗原具有强烈的免疫应答反应,这是判断患者患有活动性结核的重要证据之一。

3.2 潜伏性结核感染诊断 近百年来,在潜伏性结核感染的诊断中唯一可以发挥诊断效能的是结核菌素皮肤试验。该方法是在皮内注射试剂,观察结核菌蛋白衍生物是否会对注射部位的皮肤产生影响(如有无红肿现象)^[12-13],通过观察注射后周围皮肤的状态推断患者有无感染。但是该方法的敏感度和特异度都不理想。随着新型诊断方法 T-SPOT.TB 的出现,上述诊断方法面临的问题可以得到进一步的改善。在 T-SPOT.TB 诊断中主要用到 ESAT-6 和 CFP-10 特异性抗原,而二者均位于 RD1 区域中,并且该区域的所有开放读码框均没有出现在卡介苗菌株中,特异性比较突出。Zhang 等^[14]在北京某医院医务工作者中筛选出 101 例配合调查,为突出 T-SPOT.TB 方法的研究效果,利用结核菌素皮肤试验进行了对比分析,并且分析了这两种诊断方法的相关性,结果显示相关性较高。在与结核感染疾病患者有过接触的小组中,以阳性率为对照分析指标,分析统计结果可知, T-SPOT.TB 的表现更好。

在关于潜伏性结核感染诊断的研究中对两类人群的研究较多。① 免疫抑制人群:该人群的结核感染状态从潜伏性演变为活动性的风险较高^[15-16]。

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染患者的免疫功能较低,是免疫抑制中的一种常见类型,因此 Ramos 等^[17]以患有 HIV 感染的潜伏性结核感染患者作为研究对象,针对 QFT、T-SPOT.TB 和结核菌素皮肤试验,从敏感度、免疫抑制相关性等方面进行了对比分析,在敏感度对比中,IGRAs 的表现更优,且 γ 干扰素与免疫抑制程度有关。在潜伏性结核诊断中,与单一诊断方法相比,联合应用 IGRAs 和结核菌素皮肤试验的效果更好。② 肿瘤坏死因子治疗人群:对风湿相关疾病患者而言,抗肿瘤坏死因子治疗会诱发结核感染,诱发率约为 80%,而且感染速度较快。Minguez 等^[18]对 58 例风湿相关疾病患者提供英夫利昔单抗治疗方案,并调查 T-SPOT.TB 和结核菌素皮肤试验的实施情况,结果显示治疗前 12 例患者结核菌素皮肤试验结果呈阳性,只有 1 例患者 T-SPOT.TB 诊断结果呈阳性。在 51 例重复进行 T-SPOT.TB 和结核菌素皮肤试验的患者中,结核菌素皮肤试验结果呈阳性的患者增加了 7 例,新增活动性结核患者 2 例,表明利用 T-SPOT.TB 可以弥补结核菌素皮肤试验的不足,提高治疗的安全性。

3.3 肺外结核诊断 在腹膜炎诊断中,周乐亮等^[19]对 55 例疑似结核性腹膜炎患者进行多项检测,在敏感度比较中, T-SPOT.TB 优于结核菌素皮肤试验、腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA) 等方法。有研究对比 31 例结核性脑膜炎患者和 82 例非结核性脑膜炎患者的诊断情况,结果显示,外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)-ELISPOT 对结核性脑膜炎具有较高的诊断敏感度 (88%),但特异度较低 (58%)。虽然特异度低可能导致假阳性结果,但该方法仍具有指导抗结核治疗的意义。外周血 ELISPOT 斑点的数量可以作为参考指标,辅助判断患者是否患有结核性脑膜炎,并决定是否启动抗结核治疗^[20-21]。在胸膜炎诊断中, Zhang 等^[22]以 187 例患者为研究对象,采集了研究对象的浆膜腔积液,并利用 T-SPOT.TB 进行检测。结果显示,其中有 74 例患有结核性浆膜炎。研究指出,如果浆膜腔积液中的斑点数 [以斑点形成细胞 (spots forming cells, SFCs) 计数表示] 达到 56 个,则可判定为结核性浆膜炎。

4 结语

综上所述, T-SPOT.TB 的出现有效弥补了结核菌素皮肤试验的不足,为潜伏性结核的诊断提供了

更可靠的支持,对二者的对比分析结果表明,前者并不会受卡介苗接种的影响,可以有效减少假阳性结果的出现。本文通过汇总当前关于 T-SPOT.TB 的研究文献,综述了该方法在诊断活动性结核、潜伏性结核以及肺外结核中的应用进展。但是,没有充分的证据证明该方法可以辨别活动性结核与潜伏性结核,针对这一情况,有关研究者提出可以通过研发新型的 γ 干扰素释放分析试剂进行区分,因此,在后续研究中,可以从试剂研发的角度进行更进一步的探索。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突

参考文献

- 张海霞,李丹华.内科胸腔镜结合深部热疗治疗包裹性结核性胸膜炎的有效性及对肺功能、凝血指标的影响[J].中外医学研究, 2022, 20 (2): 9-12. DOI: 10.14033/j.cnki.cfmr.2022.02.003.
- 尹航,范正超,黄天浩,等.超声检查联合 γ -干扰素酶联免疫斑点法在附睾结核诊断中的价值[J].现代泌尿外科杂志, 2022, 27 (12): 1022-1024. DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2022.12.008.
- 蒋冬梅,王振华,李贵珍. γ -干扰素释放试验联合腹水 ADA、CA125 对结核性腹膜炎的诊断价值[J].医药论坛杂志, 2023, 44 (1): 38-42.
- 路璐,麦提吐尔森·阿卜杜艾尼,刘雯.血清 CA125 水平、T-spot·TB 联合胸腔镜病理学 Xpert 技术对结核性胸膜炎的诊断效能[J].中国医师杂志, 2023, 25 (5): 785-788. DOI: 10.3760/ema.j.cn431274-20220426-00391.
- BEHR M A, WILSON M A, GILL W P, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray [J]. Science, 1999, 284 (5419): 1520-1523. DOI: 10.1126/science.284.5419.1520.
- 朱慧明,王守卫,沈甜.胸腔积液 ADA 联合外周血 T-SPOT.TB、D-二聚体对结核性胸膜炎的早期诊断价值[J].南通大学学报(医学版), 2024, 44 (5): 438-442. DOI: 10.16424/j.cnki.cn32-1807/r.2024.05.009.
- LALVANI A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy [J]. Chest, 2007, 131 (6): 1898-1906. DOI: 10.1378/chest.06-2471.
- 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. DOI: 10.1164/ajrcm.163.4.2009100.
- DOMINGUEZ J, RUIZ-MANZANO J, De SOUZA-GALVAO M, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis [J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15 (1): 168-171. DOI: 10.1128/CVI.00364-07.
- MEIER T, EULENBRUCH H P, WRIGHTON-SMITH P, et al. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24 (8): 529-536. DOI: 10.1007/s10096-005-1377-8.
- SCHEPERS K, MOUCHET F, DIRIX V, et al. Long-incubation-time gamma interferon release assays in response to purified protein derivative, ESAT-6, and/or CFP-10 for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children [J]. Clin Vaccine Immunol, 2014, 21 (2): 111-118. DOI: 10.1128/CVI.00525-13.
- 刘玉霞,史健,王卫平,等.初治肺结核患者血清 CA125、IL-18、T-SPOT.TB 检测及临床意义[J].临床和实验医学杂志, 2023, 22 (1): 94-98. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2023.01.026.
- 刘聪蕊,李艳,刘原,等.T-SPOT.TB 和 Xpert MTB/RIF 检测法在肺结核诊断中的比较[J].宁夏医科大学学报, 2022, 44 (10): 1014-1018. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2022.10.009.
- ZHANG L F, LIU X Q, ZHANG Y, et al. A prospective longitudinal study evaluating a T-cell-based assay for latent tuberculosis infection in health-care workers in a general hospital in Beijing [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126 (11): 2039-2044.
- 张瑛梅,王飞,任小兵,等.糖尿病对肺结核菌株表型耐药及基因突变影响的前瞻性研究[J].中国全科医学, 2022, 25 (29): 3616-3620. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0344.
- 聂永聪,宁夏丽,杨鹏彦,等.糖尿病合并肺结核的免疫学、炎症机制及诊疗的研究进展[J].海南医学, 2022, 33 (22): 2985-2988. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2022.22.034.
- RAMOS J M, ROBLEDANO C, MASIA M, et al. Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: a comparison of QuantiFERON-TB Gold In Tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 169. DOI: 10.1186/1471-2334-12-169.
- MINGUEZ S, LATORRE I, MATEO L, et al. Interferon-gamma release assays in the detection of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthritis scheduled for anti-tumour necrosis factor treatment [J]. Clin Rheumatol, 2012, 31 (5): 785-794. DOI: 10.1007/s10067-012-1938-z.
- 周乐亮,沈守荣,何苗,等.结核感染 T 细胞斑点试验对结核性腹膜炎的诊断价值[J].中南大学学报(医学版), 2013, 38 (5): 526-531. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2013.05.012.
- 韩利梅,刘顺苹,艾克丹木·艾尔肯,等.菌阴性肺结核中上调 lncRNA MALAT1 表达对巨噬细胞炎症反应的调控与机制研究[J].中国免疫学杂志, 2025, 41 (3): 589-594. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2025.03.014.
- 邹诗,朱琦,郭卫,等.HIV 合并结核患者外周血中结核特异性单个核细胞的动态分析[J].中华结核和呼吸杂志, 2022, 45 (11): 1109-1116. DOI: 10.3760/ema.j.cn112147-20220823-00710.
- ZHANG L, ZHANG Y, SHI X, et al. Utility of T-cell interferon- γ release assays for diagnosing tuberculous serositis: a prospective study in Beijing, China [J]. PLoS One, 2014, 9 (1): e85030. DOI: 10.1371/journal.pone.0085030.

(收稿日期: 2025-05-30)

(本文编辑: 邵文)