

新型冠状病毒血清特异性抗体检测技术应用探讨

宁雅婷, 侯欣, 陆旻雅, 吴宪, 李永哲, 徐英春

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院检验科, 北京 100730

通信作者: 徐英春 电话: 010-69159766, E-mail: xyepumch@139.com

【摘要】 2019年12月在武汉暴发的新型冠状病毒肺炎疫情发展迅速, 早期诊断成为疫情防控的关键。2019新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)核酸检测阳性虽是疑似患者确诊的“金标准”, 但其操作繁琐、耗时长, 检测结果易受标本质量、病毒感染部位及表达量等众多因素影响, 因而核酸单项检测不能满足疫情期间对疑似病例快速筛查的要求。血清特异性抗体是诊断病毒感染的另一关键证据, 抗体协同核酸检测可用于辅助诊断和快速筛查。本文从抗体产生特点、检测方法及其灵敏度/特异度、假阴性/假阳性检测结果分析、核酸与抗体联合检测等方面进行讨论, 以期推动2019-nCoV血清抗体检测技术的建立与应用。

【关键词】 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 抗体检测; 核酸检测

【中图分类号】 R446 **【文献标志码】** A

DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.20200050

Application of the Technology of Serum Specific Antibody in Detecting 2019 Novel Coronavirus

NING Ya-ting, HOU Xin, LU Min-ya, WU Xian, LI Yong-zhe, XU Ying-chun

Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: XU Ying-chun Tel: 86-10-69159766, E-mail: xyepumch@139.com

【Abstract】 The outbreak of coronavirus disease 2019 in Wuhan in December, 2019 develops rapidly. Early diagnosis of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infection is the key to epidemic prevention and control. Although a positive nucleic acid test result of 2019-nCoV is the “gold standard” for the diagnosis in those suspected patients, its operation is tedious and time-consuming, and the test results are affected by many factors, such as the sample quality, the infection site and expression level of the virus. Therefore, the single nucleic acid test cannot meet the requirements for rapid screening and diagnosis during the epidemic. Serum specific antibody is another key evidence for the diagnosis of virus infection. Antibody detection can be used as an important means to assist nucleic acid diagnosis and rapid screening. This review interpreted the characteristics of antibody production, the methods and sensitivity/specificity of antibody testing, analysis of false negative and false positive problems, and the combination of the nucleic acid test and antibody detection to promote the establishment and application of the technology of 2019-nCoV serum antibody testing.

【Key words】 2019 novel coronavirus; coronavirus disease 2019; antibody detection; nucleic acid test

Med J PUMCH, 2020, 11: Epub ahead of print

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 19, COVID-19) 是由 2019 新型冠状病毒 (2019 novel coronavirus, 2019-nCoV) 感染引起的以肺部病变为主的新发传染病, 可引起消化系统和神经系统的损伤, 严重者可导致死亡^[1]。2019 年 12 月以来, 疫情进展迅速, 截至 2020 年 2 月 26 日 24 时, 我国 (港澳台地区除外) 累计报告确诊病例 78 497 例, 死亡病例 2 744 例, 全球疫情亦趋于严峻。目前暂无针对 2019-nCoV 的有效治疗药物, 疫苗也处于临床试验阶段, 早期诊断、及时收治患者对有效控制疫情至关重要^[2]。

《新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第六版)》推荐实时荧光 RT-PCR 检测 2019-nCoV 核酸阳性是疑似病例确诊的诊断条件之一^[3], 但该技术对实验场所及人员要求高、操作繁琐、耗时长, 检测人员感染风险高, 结果受标本质量、实验条件及人员操作等因素影响较大^[4], 核酸单项检测并不能满足排查诊断的要求。作为机体免疫系统抵抗病毒的重要效应分子, 血清特异性抗体是诊断感染的另一关键证据。抗体检测的操作简单便捷, 对实验环境及人员要求不甚苛刻, 仅需采集血液标本, 很大程度上降低医护人员在标本采集和检测过程中被感染的风险, 是快速筛查和核酸辅助诊断的重要手段^[5]。

1 抗体产生特点

机体在接触病毒时, IgM 抗体产生最早, 但浓度低、维持时间短、亲和力较低, 是急性期感染的诊断指标; IgG 产生晚, 但浓度高、维持时间长、亲和力高, 血清 IgG 阳性提示感染中后期或既往感染^[6-7]。

2 抗体血清学检测方法

目前临床中常用的抗体血清学检测方法有 3 种。

2.1 酶联免疫吸附试验法

酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是将抗原或抗体包被在固相载体表面, 利用酶标记的抗体或抗原结合待检物, 并根据酶催化底物产生的有色产物颜色深浅及有无进行分析的一种定性或半定量检测方法^[8]。该检测方法灵敏度较高, 载体标准化难度较低, 但检测速度慢、易污染、步骤较为繁琐^[9]。

2.2 化学发光免疫分析法

化学发光免疫分析法是将高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合, 用于各种抗

原、抗体、激素等检测。该法灵敏度高于 ELISA, 具有特异性高、线性范围宽、结果稳定、操作简化等特点, 广泛应用于临床标本的检测^[10-11]。

2.3 胶体金免疫层析法

胶体金免疫层析法 (colloidal gold immunochromatographic assay, GICA) 是以胶体金为示踪标志物, 应用于抗原抗体检测的一种新型免疫标记技术, 无需特殊处理标本, 仅需一滴血即可在 15 min 内通过肉眼观察获取检测结果。该方法突破了现有检测技术对人员、场所的限制, 缩短检测时间, 操作方便快捷, 在基层医疗单位及现场检测中广泛使用^[10]。

3 抗体检测的灵敏度和特异度

灵敏度反映诊断试验检出感染者的能力, 若过低, 会出现较多假阴性结果, 影响疾病的诊断、干预和预后, 严重可导致患者过早死亡; 特异度衡量诊断试验正确判断非感染者的能力, 若过低, 则会出现较多假阳性结果, 导致医疗资源的浪费, 并造成患者及群众的焦虑和恐慌。因此, 具有较高灵敏度和特异度是抗体检测技术的应用基础。

3.1 灵敏度

抗体检测的灵敏度主要取决于抗体亲和力、检测方法 & 操作。

3.1.1 抗体亲和力

指抗体与抗原的结合能力或强度, IgG 亲和力高于 IgM, 免疫结合既快又牢固, 不易解离^[12]。此外, 与单一 IgM 或 IgG 抗体检测相比, IgM-IgG 联合检测具有更高的实用性和敏感性, 可有效提高检出效率^[13]。

3.1.2 检测方法

(1) 标记材料: 常用的标记物胶体金吸附抗体量较少, 限制了检测灵敏度, 建议采用与抗体共价结合的材料, 如量子点、吡啶酯、微球等^[14-15]。(2) 信号放大系统: 选择高发光强度标记物 (如菲罗琳钉掺杂的二氧化硅纳米粒子、金纳米花), 或添加增敏剂 (如氯金酸和盐酸羟胺), 标记材料的粒径也会对灵敏度造成一定影响^[16-18]。(3) 试纸条: GICA 中, 硝酸纤维素膜的孔径、疏水性、亲水性等会影响检测灵敏度^[16,18]。(4) 缓冲液体系: 合适的缓冲液体系可稳定抗原抗体的结合能力和抗干扰能力, 提高灵敏度。

3.1.3 检测操作

(1) 浓缩样品: 通过浓缩方法增加样品浓度。

(2) 抗原抗体反应时间：适当延长反应时间或通过震荡提高反应速率，可使抗原抗体的结合反应达到反应平衡，进而提高灵敏度。

3.2 特异度

抗体检测的特异度主要与抗原位点的选择有关，目前核衣壳（nucleocapsid, N）蛋白是 2019-nCoV 检测的主要抗原位点。2019-nCoV 属于 β 冠状病毒属 B 谱系，在系统发育上与蝙蝠 SARS 样冠状病毒（bat-SL-CoVZC45）最接近^[19]。N 蛋白在 β 属冠状病毒之间相对比较保守，合成数量众多，具有很强的抗原性，在诱导宿主免疫应答甚至发病机制中发挥重要作用，常被用作冠状病毒诊断的抗原位点^[20-21]。

4 抗体检测假阴性及假阳性结果分析

假阳性和假阴性结果会影响临床诊断。为提高 2019-nCoV 抗体检测的准确性，有必要对可能出现的结果及原因进行深入分析。

4.1 抗体检测假阴性

4.1.1 防腐剂和抗凝剂：采用防腐剂叠氮化钠、抗凝剂 EDTA 等处理标本，会抑制辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）的活性，造成 ELISA 假阴性。

4.1.2 标本保存不当：当标本在冰箱中保存过久时，血清中 IgG 聚合成多聚体，且抗体免疫活性减弱。

4.1.3 实验员操作失误或试剂盒保存不当：试剂使用前未平衡至室温，试剂用量不足，温育时间或温度不足；试剂未按规定保存，受到污染或失效等^[22]。

4.1.4 层析过快：抗原抗体复合物尚未与检测线上的抗体结合，就越出检测线，造成 GICA 假阴性。

4.2 抗体检测假阳性

4.2.1 溶血或红细胞标本：红细胞的细胞内液中各种酶可与底物发生非特异性反应，且血红蛋白中亚铁血红素与 HRP 活性类似，可催化底物，造成 ELISA 检测假阳性^[23]；检测区堆积形成颜色较浅的非特异性条带，干扰目视法判定胶体金试纸结果^[24]。

4.2.2 纤维蛋白的影响：由于标本凝集不全或离心转速过低、时间太短，血清中的纤维蛋白未完全析出，形成的块状或絮状物堵塞洗板机头。

4.2.3 细菌污染标本：菌体内可能含有内源性 HRP，造成 ELISA 假阳性结果^[23]；此外，疏水性的菌体碎片与金标粒子或捕捉抗体发生结合，影响

GICA 判读。

4.2.4 患者自身原因：体内存在自身抗体、嗜异性抗体等，如患有某些基础疾病或免疫功能异常，或长期服用某种药物，可产生异常蛋白抗体或特殊物质，如类风湿因子、甲胎蛋白、补体等，具有一定吸附作用，造成抗体检测假阳性^[25]。

5 核酸与抗体联合检测结果解读

核酸与抗体联合检测可提高诊断效率，当联合检测结果出现以下情况时，需要综合分析判断进行结果解读。

5.1 核酸检测阳性时，抗体检测出现阴性或阳性结果

5.1.1 核酸阳性，IgM 和 IgG 均为阴性

患者可能处于 2019-nCoV 感染“窗口期”：“窗口期”是指从人体感染病毒后到外周血中能够检测出病毒抗体的这段时间，一般为 2 周。这段时间内无法检测血液中的病毒抗体，因此，IgM 和 IgG 均为阴性。此时处于感染早期，病毒不断复制，核酸载量呈指数递增，达到核酸检测下限，核酸检测呈阳性^[26-27]。核酸检测较血清抗体检测的优势在于缩短了感染检出窗口期，可及早发现感染者^[28]。

5.1.2 核酸阳性，IgM 阳性、IgG 阴性

患者可能处于 2019-nCoV 感染早期，机体免疫应答最早产生抗体 IgM，暂未产生 IgG 或 IgG 含量未达到诊断试剂的检测下限^[29]。

5.1.3 核酸阳性，IgM 阴性、IgG 阳性

患者可能处于 2019-nCoV 感染中晚期或复发感染。病毒刚入侵人体之时，免疫系统首先会产生临时性抗体 IgM，大约 1 个月后达峰值，随着时间的推移，侵入人体的病毒逐渐被 IgM 中和，IgM 逐渐减少，直至低于检测下限；同时，人体免疫系统会产生持久性抗体 IgG，在感染中晚期，IgG 为机体免疫的主力军，浓度高，能够被检测到^[30]。恢复期 IgG 较急性期增加 4 倍及以上时，可诊断为复发感染^[5]。

5.1.4 核酸阳性，IgM 阳性、IgG 阳性

患者处于感染活跃期，但人体已对 2019-nCoV 产生一定免疫能力（持久性抗体 IgG 已产生）。

5.2 核酸检测阴性时，抗体检测出现阴性或阳性结果

5.2.1 核酸阴性，IgM 阳性、IgG 阴性

IgM 阳性提示极大可能处于 2019-nCoV 感染急性

期, 此时需考虑核酸检测结果存疑。出现核酸检测假阴性的原因及应对建议主要有以下几方面: (1) 标本质量差。采集上呼吸道的口、鼻咽拭子等部位标本时, 推荐采集鼻咽拭子进行病毒核酸检测, 为了提高检测阳性率, 建议采集同一患者多部位标本(口咽拭子、鼻咽拭子、鼻腔拭子等) 合并检测; 对于有消化道症状的疑似患者, 可同时采集粪便或肛拭子进行检测^[3]。(2) 标本采集保存不当, 没有正确保存、运输和处理标本。推荐 4 ℃ 运送标本(因 RNA 易降解)。(3) 技术本身原因, 如病毒变异、PCR 抑制等。由于 2019-nCoV 为单股正链 RNA 病毒, 分子量大, 具有易变异的特性, 传播过程中可能会产生核酸序列的变异, 若处于核酸扩增的引物结合区, 就会出现假阴性结果^[30]。建议针对多个核酸区域进行扩增, 可有效避免核酸变异对检测结果的影响。因此, 当核酸检测结果为阴性时, 只可报告本次检测结果阴性, 不可排除 2019-nCoV 感染, 需多次重复确认^[31]。(4) 患者有其他疾病, 已发现类风湿因子引起 IgM 弱阳性或阳性的病例。

5.2.2 核酸阴性, IgM 阴性、IgG 阳性

提示患者可能既往感染 2019-nCoV, 但已恢复或体内病毒被清除, 免疫应答产生的 IgG 维持时间长, 仍存在于血液中而被检测到。

5.2.3 核酸阴性, IgM 弱阳性、IgG 阴性

提示患者初次感染载量极低的 2019-nCoV 并处于早期, 病毒载量低于核酸检测下限, 机体产生少量 IgM, 尚未产生 IgG; 或由于患者自身类风湿因子阳性等引起的 IgM 假阳性。

5.2.4 核酸阴性, IgM 阳性、IgG 阳性

患者近期曾感染 2019-nCoV 并处于恢复期, 体内病毒被清除, IgM 尚未减低至检测下限; 或核酸检测结果假阴性, 患者处于感染活跃期。

6 结语

综上所述, 相关医疗机构应尽早建立 2019-nCoV 血清抗体检测技术。抗体检测可用于 2019-nCoV 核酸检测阴性疑似病例的补充检测或在疑似病例确诊时与核酸检测协同应用。在 COVID-19 的不同疾病进展阶段, 核酸和抗体检测的效率不尽相同, 两者协同使用, 可取长补短, 提高诊断效率, 监测疾病进展。而正确解读联合检测结果, 可提高 2019-nCoV 的快速诊断和鉴别诊断能力, 更好地了解病毒载量和疾病进展, 指导临床诊疗工作。

参 考 文 献

- [1] Malik YS, Sircar S, Bhat S, et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV): current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments [J]. *Vet Q*, 2020, 8: 1-12.
- [2] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395: 565-574.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版) [S/OL]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [4] Yu F, Du L, Ojcius DM, et al. Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China [J]. *Microbes Infect*, 2020. doi: 10.1016/j.micinf.2020.01.003. [Epub ahead of print].
- [5] 何超, 江虹, 谢轶, 等. 新型冠状病毒肺炎诊治的实验室检验路径探讨 [J/OL]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1631.R.20200221.1322.002.html>. [Epub ahead of print].
- [6] 黄丹. 献血者血液样本核酸检测降低经血传播感染性疾病风险的效果分析 [J]. *泰山医学院学报*, 2017, 38: 1043-1044.
- [7] Murat JB, Dard C, Fricker Hidalgo H, et al. Comparison of the vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20: 1203-1212.
- [8] 赵晓飞, 张彩荣, 刘晓娟, 等. 表达 HIV-1 gag 蛋白的重组乳酸乳球菌诱导小鼠产生体液免疫应答 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30: 1142-1145.
- [9] 邱峰, 王慧君, 张子康, 等. 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 实验室检测技术 [J/OL]. *南方医科大学学报*, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1627.r.20200220.1738.004.html>. [Epub ahead of print].
- [10] 金晶. ELISA 法和化学发光法对血清中 HIV-1/HIV-2 抗体、梅毒抗体和丙型肝炎抗体的检测分析 [J]. *中国医药指南*, 2018, 4: 49.
- [11] 姜大娥. 探讨 ELISA 和化学发光法对血清中 HIV-1/HIV-2 抗体、梅毒抗体和丙肝抗体的检测 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22: 137-138, 145.
- [12] 金建平. 单克隆抗体亲和力的测定及其意义 [J]. *生物工程学报*, 1987, 3: 110-113.
- [13] Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and Clinical Appli-

- cation of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis [J]. *J Med Virol*, 2020. doi: 10. 1002/jmv. 25727. [Epub ahead of print].
- [14] 吴敏. 基于 CdSe/ZnS 量子点-荧光免疫层析法对心肌损伤类指标定量快速的检测 [D]. 郑州: 河南大学, 2018.
- [15] 徐秋波, 黄丽娟. 吖啶酯直接化学发光法和 ELISA 定量检测 CCP 抗体作用分析 [J]. *中外医疗*, 2018, 37: 191-193.
- [16] 黄小云. 提高免疫学检测灵敏度的新型信号传导系统研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [17] 王景云. 提高免疫层析试纸条灵敏度方法的研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2016.
- [18] 张文静. 不同粒径金纳米花对双抗夹心免疫层析试纸条检测性能的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [19] Chan JF, Yuan S, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster [J]. *Lancet*, 2020, 395: 514-523.
- [20] Wang J, Wen J, Li J, et al. Assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 1989-1996.
- [21] Lee HK, Lee BH, Dutta NK, et al. Detection of antibodies against SARS-coronavirus using recombinant truncated nucleocapsid proteins by ELISA [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18: 1717-1721.
- [22] 庄金秋, 梅建国, 张颖, 等. 禽流感病毒 H7N9 亚型实验室检测技术研究进展 [J]. *家禽科学*, 2019, 40: 53-59.
- [23] 邵平, 王进. ELISA 法检测梅毒抗体假阳性原因分析及其对策 [J]. *江苏预防医学*, 2010, 21: 56-57.
- [24] 蒋旭, 李青竹, 邱月红, 等. 胶体金免疫层析技术研究进展 [J]. *畜牧业*, 2015, 36: 28-30.
- [25] 赵玉锋, 张勇, 彭玉芳. 化学发光微粒子免疫分析法在 HIV 检测中假阳性分析 [J]. *医疗装备*, 2017, 30: 41.
- [26] Sickinrer E, Jonas G, Yem AW, et al. Performance evaluation of the new full yautomated human immunodeficiency virus antigen-antibody combination assay designed for blow screening [J]. *Transfusion*, 2008, 48: 584-593.
- [27] 方雯丹, 李闻文. HIV 感染窗口期及其检测技术的研究 [J]. *检验医学教育*, 2012, 3: 43-45.
- [28] Laperche S. Blood safety and nucleicacid testing in Europe [J]. *Euro Surveill*, 2005, 10: 3-4.
- [29] Fricker-Hidalgo H, Bailly S, Marie-Pierre B, et al. How to estimate time of infection with *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Use of specific IgG and IgM kinetics by 7 techniques on 691 sera [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2020, 15: 114987.
- [30] Phan T. Novel coronavirus: from discovery to clinical diagnostics [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 79: 104211.
- [31] 刘春华, 孙国清, 薛秀娟, 等. 抗体检测与核酸检测在 HIV 诊断中的优势分析 [J]. *中医临床研究*, 2014, 15: 114-116.

(收稿日期: 2020-02-25)