

• 论 著 •

胶体金免疫层析法检测 SARS-CoV-2 血清抗体的临床价值探讨*

邓杰伦,王远芳,王婷婷,黄学东,吴思颖,王旻晋,李冬冬[△],陶传敏,谢 轶,应斌武
(四川大学华西医院实验医学科,四川成都 610041)

摘要:目的 通过对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)免疫球蛋白(Ig)M 和总抗体(即 IgM/IgG)的检测,探讨应用胶体金免疫层析法(GICA 法)在新型冠状病毒肺炎(COVID-19)诊断中的应用价值。方法 收集 76 例患者共计 83 份血清,其中 32 例为 SARS-CoV-2 核酸阳性患者(确诊组),44 例为 SARS-CoV-2 核酸阴性患者(对照组)。确诊组中 7 例患者为两次时间点采集标本。采用 GICA 法检测 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体。结果 GICA 法检测 SARS-CoV-2 IgM 的灵敏度 50.00%(16/32),特异度 90.91%(40/44),符合率 73.68%(56/76),阳性预测值 80.00%(16/20)、阴性预测值 71.43%(40/56);SARS-CoV-2 总抗体检测的灵敏度 68.75%(22/32)、特异度 97.73%(43/44)、符合率 85.53%(65/76)、阳性预测值 95.65%(22/23)、阴性预测值 81.13%(43/53)。GICA 法检测 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体的特异度均大于 90%,符合率均大于 70%,满足临床需求。结论 GICA 法检测 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体,标本采集易标准化,报告时间快,灵敏度不高,但特异度较高,有辅助诊断的价值。

关键词:新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 胶体金免疫层析法; 免疫球蛋白 M; 总抗体
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.08.017 **中图法分类号:**R563.1
文章编号:1673-4130(2020)08-0964-04 **文献标识码:**A

The clinical value of GICA in the detection of serum antibodies to SARS-CoV-2*
DENG Jielun, WANG Yuanfang, WANG Tingting, HUANG Xuedong, WU Siying,
WANG Minjin, LI Dongdong[△], TAO Chuanmin, XIE Yi, YING Binwu
(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University,
Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) in corona virus disease 2019 (COVID-19) through testing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) immunoglobulin M (IgM) and total antibodies (IgM/IgG). **Methods** A total of 83 serum samples were collected from 76 patients, including 32 cases confirmed with nucleic acid test as confirmed group and 44 subjects who negative to SARS-CoV-2 infection as control group. The samples of 7 patients in confirmed group were collected at 2 time points. Serum IgM and total antibodies were measured with GICA. **Results** The sensitivity and specificity of serum IgM were 50.00% (16/32), 90.91% (40/44) respectively. The coincidence rate, the positive and negative predictive values of IgM were 73.68% (56/76), 80.00% (16/20), 71.43% (40/56). The sensitivity and specificity of total antibodies were 68.75% (22/32), 97.73% (43/44) respectively. The coincidence rate, the positive and negative predictive values of total antibodies were 85.53% (65/76), 95.65% (22/23), 81.13% (43/53). The specificity of SARS-CoV-2 IgM and total antibodies by GICA were above 90%, and the coincidence rates were above 70%, which suit for clinical needs. **Conclusion** GICA assay detects SARS-CoV-2 IgM and total antibodies which sample collection are easy to be standardized, reporting time is short, the sensitivity is not high, but the specificity is high, has the value of supplement diagnosis.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; corona virus disease 2019; colloidal gold immunochromatographic assay; immunoglobulin M; total antibodies

* 基金项目:四川大学华西医院新型冠状病毒肺炎疫情科技攻关项目(HX-2019-nCov-050)。
作者简介:邓杰伦,女,技师,主要从事临床微生物方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:jiangxili1219@163.com。
本文引用格式:邓杰伦,王远芳,王婷婷,等.胶体金免疫层析法检测 SARS-CoV-2 血清抗体的临床价值探讨[J].国际检验医学杂志,2020,41(8):964-966.

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是人畜共患的正单链 RNA 病毒,有包膜,属冠状病毒科。该科分为 α 、 β 、 δ 和 γ 四个属,SARS-CoV-2 属于 β 属,被列为第 7 类冠状病毒,可引起新型冠状病毒肺炎(COVID-19)^[1]。临床表现多为发热、乏力,或有呼吸道症状。已明确可以人传人,人群普遍易感。早发现、早诊断、早隔离是有效控制 COVID-19 疫情的关键^[2]。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第 6 版)》^[3]中明确指出 COVID-19 确诊需具有以下病原学证据之一:(1)实时荧光 RT-PCR 检测新型冠状病毒核酸阳性;(2)病毒基因测序,与已知的新型冠状病毒高度同源。核酸检测具有早期、灵敏、特异度高等优势^[4],但也存在一定局限,因此需要探索快速有效、便捷可行的临床检测方法,以补充核酸检测的不足^[5]。本研究主要应用胶体金免疫层析法(GICA 法)检测 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体(即 IgM/IgG)并探讨该项目在临床应用的价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2020 年 1 月 25 日至 2 月 22 日入院的确诊和疑似 COVID-19 的 76 例患者,共计 83 份血清标本。32 例 SARS-CoV-2 核酸阳性患者为确诊组,其中 7 例患者有两份标本,其余患者为一份标本;44 例 SARS-CoV-2 病毒核酸阴性者为对照组,所有患者均为一份标本。

1.2 试剂 GICA 检测试剂盒为北京热景生物技术股份有限公司提供的 SARS-CoV-2 IgM 检测试剂盒和 SARS-CoV-2 总抗体检测试剂盒。

1.3 方法 IgM 检测采用捕获法,总抗体检测采用双抗原夹心法,形成胶体金复合物,直接肉眼判读。操作人员按照生物安全三级实验室的标准进行个人防护,标本检测在二级生物安全实验室中进行。标本 3 000 r/min 离心 10 min 后,离心机内静置 15 min 取出,二级生物安全柜内开盖。进行 IgM 检测时,取 100 μ L 待检血清稀释后滴加检测孔。总抗体检测时,取 50 μ L 待检血清,滴加检测孔。均于 15~30 min 后观察结果。

1.4 抗体出现时间评估 以确诊患者出现症状为起点,送检标本中检测到抗体的日期为终点,对抗体出现时间进行评估。

2 结 果

2.1 GICA 法检测血清 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体结果 SARS-CoV-2 IgM 检测灵敏度 50.00%(16/

32),特异度 90.91%(40/44),符合率 73.68%(56/76),阳性预测值 80.00%(16/20)、阴性预测值 71.43%(40/56)。SARS-CoV-2 总抗体检测灵敏度 68.75%(22/32)、特异度 97.73%(43/44)、符合率 85.53%(65/76)、阳性预测值 95.65%(22/23)、阴性预测值 81.13%(43/53)。见表 1。

表 1 GICA 法检测血清 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体结果(n)

抗体检测结果	IgM		总抗体	
	确诊组 (n=32)	对照组 (n=44)	确诊组 (n=32)	对照组 (n=44)
阳性(+)	16	4	22	1
阴性(-)	16	40	10	43
合计	32	44	32	44

2.2 7 例患者两个时间点 SARS-CoV-2IgM 和总抗体检测结果 对 7 例患者两次采样的标本进行检测,其中 2 号、4 号、5 号、6 号患者在第 2 次检测时 IgM 检出阳性;1 号、2 号、4 号、6 号患者在第 2 次检测时总抗体检出阳性。见表 2。

表 2 7 例患者两个时间点 SARS-CoV-2IgM 和总抗体检测结果

病历 编号	第 1 次检测			第 2 次检测		
	距发病时间 (d)	IgM	总抗体	距发病时间 (d)	IgM	总抗体
1	4	—	—	5	—	+
2	7	—	—	11	+	+
3	7	+	+	16	+	+
4	8	—	—	16	+	+
5	9	—	+	17	+	+
6	9	—	—	11	+	+
7	13	+	+	20	+	+

注: + 为阳性, — 为阴性。

2.3 患者血清 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体检出时间评估及阳性率比较 通过对 15 例住院患者的共计 22 份血清标本抗体检出时间进行分析,IgM 检出时间为发病后 7~20 d,中位数为 13 d;总抗体检出时间为发病后 3~20 d,中位数为 12 d,不同检出时间患者血清 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体阳性率比较见表 3。

表 3 不同检出时间患者血清 SARS-CoV-2 IgM 和总抗体阳性率比较[n(%)]

项目	<3 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	11 d	13 d	16 d	17 d	20 d
IgM	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(4.55)	1(4.55)	1(4.55)	3(13.63)	5(22.72)	7(31.82)	8(36.36)	9(40.91)
总抗体	0(0.00)	1(4.55)	1(4.55)	2(9.09)	3(13.63)	4(18.18)	4(18.18)	5(22.72)	7(31.82)	10(45.45)	12(54.55)	13(59.10)	14(63.64)

3 讨 论

病毒核酸检测作为 COVID-19 确诊标准,具有灵敏度高、特异度好、可早期诊断等优点^[4]。用于核酸检测的 COVID-19 标本多为鼻咽拭子,采样不规范或者未取到病毒细胞容易造成漏检^[6]。核酸检测对实验室条件要求较高、操作繁琐、检测流程时间长^[7],因此探索更快、更便捷的检测方法是当前疫情防控中的重要任务。抗体检测作为感染病的间接证据可作为临床诊断或回顾性诊断依据。参考重症急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)的研究^[8],特异性 SARS-CoV IgM 产生时间比普通病毒特异性 IgM 滞后 1 周左右,30~40 d 抗体滴度达峰,180 d 基本转阴;SARS-CoV IgG 在体内阳性率维持时间长,至发病 150 d 阳性率仍在 90%左右;也有报道称 SARS-CoV IgG 在发病 2 年后阳性率仍维持在 90%左右^[9]。在本研究中 GICA 法检测 SARS-CoV-2 抗体,以全血为标本,容易统一标本质量。实验操作简单,检测时间短,无需特殊设备,易推广。SARS-CoV-2 感染后,患者在核酸转阴后抗体亦可继续存在,因此抗体检测对于 SARS-CoV-2 疫情的回顾性诊断和流行病学调查具有重要意义^[10]。

本研究中 GICA 法检测 IgM 和总抗体的特异度均大于 90%,与核酸特异性相近^[5]。检测方法符合率,阳性预测值和阴性预测值均高于 70%,能够满足临床要求。然而,GICA 法检测 IgM 和总抗体的灵敏度较低,为 50%~68%。据其他研究报道,流感病毒抗原胶体金检测方法的灵敏度为 55.60%,特异度为 75.90%^[12]。SRAS-CoV IgM 的灵敏度是 52.80%,特异度是 99.40%,符合率 78.82%。IgG 的灵敏度是 73.23%,特异度是 98.10%,符合率 87.15%^[13]。因此,抗原-抗体检测方法灵敏度低、特异度高的特点较为显著。抗原-抗体检测灵敏度较低的原因可能与标本采集时间点和抗体产生的生理过程相关。本研究中,SARS-CoV-2 在发病 11 d 后,IgM 检测的阳性率逐渐升高,由此推测 IgM 检测的最优时间点为发病后第 11 天,而核酸检测的最佳时间为 3~5 d^[9],可见核酸检测时间更早。SRAS-CoV 感染后发病后第 11~20 天的血液中检测特异性 IgM 阳性率升高,与 SARS-CoV-2 抗体检测时间相近。抗体产生可能与病毒感染机体的特殊致病机制、潜伏期等因素有关^[10-11]。

抗原刺激后,人体中出现最早的抗体是 IgM,IgG 一般晚于 IgM 出现。本研究通过分析 15 例住院患者发病时间及病程,发现在整个研究过程中,总抗体的阳性率均高于 IgM。可能原因:(1)从方法学角度总抗体检测采用双抗原夹心法,IgM 检测采用捕获法,双抗原夹心法灵敏度高于捕获法,所以当样本中抗体滴度较弱时,可能出现单独 IgM 试剂未能检出,总抗体试剂可检出的结果;(2)本试剂总抗体包被片段为

S-SRBD+N,以 S 全长+N 全长标记,检测样本中的 IgM 和 IgG 抗体;IgM 仅以 S 全长+N 全长包被,检测样本中的 IgM;总抗体检测位点较 IgM 多,所以当样本中的 IgM 产生其他位点时亦能检出,并且总抗体检测覆盖感染早期和后期,而 IgM 仅覆盖感染早期。本研究对照组中有 4 例患者 IgM 检测结果呈现假阳性,其中 1 例患者总抗体检测也呈现假阳性,可能是由于在检测过程中受到了其他免疫分子的干扰^[13]。抗体检测差异和假阳性可能与试剂盒本身检测差异有关,也可能与 SARS-CoV-2 的感染机制有关,有待进一步研究。本研究仅为初步探索,纳入病例数较少,且样本连续性不足。随着疫情的进展,可采集不同时间点样本对比分析,以研究 COVID-19 的抗体消长规律。

4 结 论

综上所述,GICA 法检测 SARS-CoV-2 抗体,可以作为 SARS-CoV-2 感染检测的方法之一。目前尚不能替代核酸确诊检测,但在未及时获得核酸检测结果时,可对 SARS-CoV-2 感染情况提供参考价值。在 COVID-19 疫情防控过程中,仍然需要大量的抗体检测数据以推动 COVID-19 的流行病学调查。

参考文献

- [1] World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected[S/OL]. (2020-01-12) [2020-02-27]. [http://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-infection-is-suspected](http://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(2019-ncov)-infection-is-suspected).
- [2] 宋元林,白春学. 新型冠状病毒(2019-nCoV)肺炎流行期间呼吸科门诊质控上海专家共识[J/OL]. 复旦学报(医学版), 2020 [2020-02-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.r.20200212.1847.002.html>.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第 6 版)的通知(国卫办医函[2020]145 号)[EB/OL]. (2020-02-19) [2020-02-27]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [4] 冯燕,卢亦愚,严菊英,等. 荧光定量 RT-PCR 技术快速检测 SARS 病毒核酸[J]. 中国病毒学, 2005, 20(3): 228-231.
- [5] 郭元元,王昆,张宇,等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. 重庆医学, 2020 [2020-02-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.
- [6] 钟慧钰,赵珍珍,宋兴勃,等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验[J/OL]. 国际检验医学杂志, 2020 [2020-02-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200227.0936.002.html>.
- [7] 施绍瑞,聂滨,郭渝,等. 新型冠状病毒肺炎病例多种生物样本的病毒核酸检测结果[J]. 华西医学, 2020, 35(2): 1-5.
- [8] 吴满辉,周莉莉,林小鸿,等. SARS 患者康复后血清抗 SARS 病毒特异性抗体 IgM 和 IgG 动态(下转第 970 页)

IM 患者感染病毒后感染不同类型的淋巴细胞且在体内大量繁殖,导致淋巴细胞形态和功能的改变如细胞体积增大、颗粒减少等异型淋巴细胞形态。血常规检测时血液分析仪会将异型淋巴细胞当成单核细胞处理,导致单核细胞 VCS 参数发生变化。研究中发现实验组和肝损害组急性期 MLV 和 MMV 高于对照组,与以往研究一致^[10],而 MLC、MMC 表达结果低于对照组,MLS 和 MMS 与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),两组急性期和恢复期 MLV、MMV、MLC、MMC 组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。这与王永锋等^[11]研究结果不一致,与吴华军等^[12]研究结果一致,原因可能是在前者研究中不单是病毒感染,还合并细菌性感染,而本研究中患儿确诊为 IM 及其引起的肝损害,异型淋巴细胞较高影响了 MLC 和 MMC,且肝损害组低于实验组,说明 VCS 对于判断疾病的严重程度具有重要意义。此外,急性期血清 SAA 水平明显高于恢复期,认为 SAA 可用于评价 IM 及其并发症的治疗效果和预后情况^[13]。

4 结 论

综上所述,SAA 和异型淋巴细胞比例在 IM 及其引发的并发症中水平升高,说明 SAA 和异型淋巴细胞的检测对评价 IM 的严重程度具有重要意义;当机体受到病毒感染时,淋巴细胞和单核细胞 VCS 参数发生变化,有助于 IM 的诊断。因此,SAA、异型淋巴细胞比例和白细胞 VCS 参数检测在 IM 并发肝功能损害患儿早期诊断、疾病的临床病程、治疗效果、早期恢复和疾病预后的具有十分重要的临床价值。

参考文献

[1] 夏忆,高钰,张庆,等. EB 病毒合并多种病原体感染所致传染性单核细胞增多症的临床研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2018,23(3):143-147.

[2] WU F,HOU X Q,SUN R R. The predictive value of joint detection of serum amyloid protein A,PCT,and hs-CRP in the diagnosis and efficacy of neonatal septicemia[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(13):5904-5911.

[3] SAULNIER P J,DIETER B P,TANAMAS S K,et al. Association of serum amyloid a with kidney outcomes and all-cause mortality in american indians with type 2 diabetes[J]. Am J Nephrol,2017,46(4):276-284.

[4] EREN M A,VURAL M,CECE H,et al. Association of serum amyloid A with subclinical atherosclerosis in women with gestational diabetes[J]. Gynecol Endocrinol,2012,28(12):1010-1013.

[5] 石祖亮,胡洪波,杨林,等. 超敏 C-反应蛋白与降钙素原和血清淀粉酶样蛋白 A 检测对新生儿早期感染的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(12):1896-1899.

[6] SALE S,CARONE A E,FUMI M,et al. Detection of apoptotic lymphocytes through sysmex XN-1000 as a diagnostic marker for mononucleosis syndrome[J]. J Clin Lab Anal,2016,30(5):779-793.

[7] 荣婷婷,王维维,王娟娟,等. EB 病毒感染患儿淋巴细胞亚群特征和 EBV DNA 载量分析[J]. 检验医学,2018,33(4):285-289.

[8] 林胜元. 儿童传染性单核细胞增多症的三种检测方法对比分析[J]. 黑龙江医药,2018,31(2):407-409.

[9] 喻安银,刘需祥,黄泳,等. 血清降钙素原与血清淀粉样蛋白 A 和白细胞介素-8 诊断肝硬化腹水感染的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(20):4584-4587.

[10] SHRIVASTAVA V,AHMAD S,MITTAL G,et al. Evaluation of haematological and volume,conductivity and scatter parameters of leucocytes for aetiological diagnosis of undifferentiated fevers[J]. Trans Soc Trop Med,2017,111(12):546-554.

[11] 王永锋,杨敏,马勤利,等. 白细胞 VCS 参数在流行性出血热早期诊断中的应用[J]. 中国实验诊断学,2017,21(8):1386-1389.

[12] 吴华军,王宇军,田俊华. 外周血淋巴细胞、单核细胞 VCS 参数与异型淋巴细胞相关性研究[J]. 检验医学,2012,27(10):861-862.

[13] 邵民坤,周燕,杜坤,等. 炎性指标联合检测在鉴别诊断新生儿感染中的临床评价[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(7):1639-1641.

(收稿日期:2019-09-08 修回日期:2020-01-10)

(上接第 966 页)

变化[J]. 岭南急诊医学杂志,2009,14(1):10-12.

[9] 闫惠平,檀玉芬,庄辉,等. 严重急性呼吸综合征患者冠状病毒总抗体及 N 和 S 蛋白抗体的随访研究[J]. 中华内科杂志,2006,45(11):896-899.

[10] 貌盼勇,朱雷等,王佑春,等 SARS-CoV 特异性抗体产生规律的初步研究[J]. 中华流行病学杂志,2004,25(10):856-858.

[11] 李穗芬,谭奕洲,唐漾波,等. ELISA 法检测 SARS 病毒特异性抗体[J]. 实用科技医学杂志,2005,12(6):1380-

1382.

[12] 李晓光,胥婕,杨雪松,等. 应用流感病毒快速检测方法对流感样病例病原学诊断研究[J]. 北京医学,2009,31(5):280-283.

[13] 梁淑慧,朱海龙,黎国政,等. 类风湿因子在 ELISA 法检测丁型肝炎 IgM 抗体中干扰的观察[J]. 现代中西医结合杂志,2005,14(2):229.

(收稿日期:2020-02-29 修回日期:2020-04-05)