

新型冠状病毒肺炎病例的血清学检测结果初步分析

黄一伟¹, 潘佳², 王娟¹, 戴志辉¹, 李芳彩¹, 贺子翔¹, 胡世雄¹, 湛志飞¹

1. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005; 2. 长沙市第一医院, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解新型冠状病毒肺炎确诊病例、无症状感染者、密切接触者和其他相关人员血清中 IgM 和 IgG 抗体产生情况。**方法** 采集研究对象的全血并及时分离血清, 采用 ELISA 和胶体金法对确诊病例和无症状感染者血清进行 IgM 和 IgG 抗体检测, 采用 ELISA 对密切接触者和其他相关人员血清进行检测。**结果** 用 ELISA 和胶体金法进行抗体检测, 42 例确诊病例的阳性情况为: 采样日期从第二周起, 不论是 IgM 还是 IgG 的阳性率均出现增长, 第 15~35 d 组, 阳性率最高, IgM 抗体阳性率 ELISA 和胶体金法分别为 72.7% 与 36.4%, IgG 抗体阳性率分别为 72.7% 与 90.9%。用 ELISA 检测, 8 例无症状感染者为 IgM 阳性 5 例 (62.5%) 和 IgG 阳性 5 例 (62.5%)。密切接触者为 IgM 阳性 1 例 (1.7%) 和 IgG 阳性 2 例 (3.4%)。其他相关人员为 IgM 阳性 1 例 (2.0%) 和 IgG 阳性 2 例 (4.1%)。ELISA IgM、胶体金 IgM、ELISA IgG 以及胶体金 IgG 试验检测出阳性确诊病例的发病日期至采样日期的间隔时间中位数分别为 16、14、12、13 d。ELISA 与胶体金法比对, IgM 抗体检测的 Kappa 值为 0.614, IgG 的 Kappa 值为 0.716。**结论** 新型冠状病毒肺炎确诊病例血清抗体阳性率从第二周起出现显著增长, 不同类型人员阳性率差异有统计学意义, ELISA 与胶体金法比较中高度一致。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 抗体; 酶联免疫吸附试验; 胶体金法

中图分类号: R563.1⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2020)09-1025-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.09.001

Preliminary analysis on serological test results of cases with coronavirus disease 2019

HUANG Yi-wei¹, PAN Jia², WANG Juan¹, DAI Zhi-hui¹, LI Fang-cai¹, HE Zi-xiang¹, HU Shi-xiong¹, ZHAN Zhi-fei¹

1. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China;

2. The First Hospital of Changsha City, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: ZHAN Zhi-fei, E-mail: 190776969@qq.com

Abstract: **Objective** To study the serum 2019 - new coronavirus (2019 - nCoV) immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) antibodies in the confirmed cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19), asymptomatic carriers, close contacts and other related personnel. **Methods** Whole-blood specimens of the surveyed subjects were collected, and the serum was separated in time. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) were used to detect IgM and IgG antibodies in the sera of the confirmed cases and asymptomatic carriers, while ELISA was employed to detect IgM and IgG antibodies in the sera of close contacts and other related personnel. **Results** The positive results of 42 confirmed cases detected by ELISA and GICA were as follows: the positive rates of IgM and IgG both showed an increase from the second week of the sampling, and the positive rates were found to be the highest in the group of the 15th-35th days. The positive rates of IgM antibody detected by ELISA and GICA were 72.7% and 36.4%, respectively. The positive rates of IgG antibody detected by ELISA and GICA were 72.7% and 90.9%, respectively. Among 8 asymptomatic carriers detected by ELISA, 5 (62.5%) cases were IgM positive and 5 (62.5%) cases IgG positive. 1 (1.7%) close contact was IgM positive and 2 (3.4%) close contacts IgG positive. As for other related personnel, 1 (2.0%) case was IgM positive and 2 (4.1%) cases IgG positive. The median interval from the onset of illness to the sampling date in confirmed cases detected by ELISA for IgM, GICA for IgM, ELISA for IgG and GICA for IgG were 16, 14, 12 and 13 days, respectively. The results detected by ELISA and GICA were compared, and the Kappa values of IgM and IgG antibodies detection were 0.614 and 0.716, respectively. **Conclusions** The positive rates of serological tests of the confirmed COVID-19 cases presented a significant increase from the second week of the sampling, and the positive rates of different types of people showed statistically significant differences. The consistency of ELISA and GICA for 2019-nCoV IgM and IgG antibodies was medium-high.

Key words: coronavirus disease 2019; antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; colloidal gold immunochromatographic assay

基金项目: 科技部十三五科技重大专项课题 (2018ZX10713002); 湖南省重点领域研发计划社会发展领域重点研究项目 (2020SK3012)

作者简介: 黄一伟 (1980-), 男, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事急性传染病的实验室诊断工作。

通信作者: 湛志飞, E-mail: 190776969@qq.com。

2019 年 12 月底以来,中国武汉发现不明原因肺炎疫情,并迅速扩散至全国,一种新型冠状病毒是导致此次疫情的病原^[1-2],世界卫生组织把这种疾病命名为 2019 冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19),疾病多以发热、干咳和乏力为主要临床表现。根据目前现行的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》^[3]与第六版本^[4]相比较,将血清学证据纳入病例确诊的检测方法之一,即血清特异性 IgM 抗体和 IgG 抗体阳性,血清特异性 IgG 抗体由阴性转为阳性或恢复期较急性期 4 倍及以上升高即可确诊。但是目前获得国家药品监督管理局审批通过的血清学检测试剂为化学发光法抗体检测试剂和胶体金检测试剂,缺乏 ELISA 检测试剂。

为了研究新型冠状病毒病例感染后体内特异性抗体产生情况,了解密切接触者人群感染情况,探索 ELISA 血清学检测试剂盒作为实验室诊断的可行性,研究组对 42 例新型冠状病毒肺炎确诊病例、8 例无症状感染者、59 例密切接触者和 49 例其他相关人员的血清进行了 IgM 抗体和 IgG 抗体的 ELISA 检测,并与胶体金法进行比较,对检测结果进行了分析。

1 对象与方法

1.1 病例信息和标本采集 确诊病例来源于湖南省某两家定点医院新型冠状病毒肺炎住院患者,密切接触者和相关其他人员来源于常德市某县和邵阳市某县确诊病例流行病学调查时的人群,无症状感染者来源于常德市某县流行病学调查时检测新型冠状病毒核酸阳性。确诊病例分类根据当时诊疗方案确定^[3]。病例呼吸道标本经过荧光 PCR 检测阳性并按照《新型冠状病毒肺炎防控方案》(当时最新版本)进行确诊判定。血清标本采集使用无抗凝剂的真空采血管采集,根据《新型冠状病毒肺炎防控方案》及时分离血清,并保持于-20℃或-70℃。实验时严格按照生物安全的相关规定^[5],血清检测前经过 60℃、30 min 灭活。本研究遵守国际协调理事会临床试验规范和赫尔辛基宣言,经湖南省疾病预防控制中心伦理审查委员会审核

通过(伦理号:湘疾控 IRB2020005),并批准予以豁免知情同意书。

1.2 胶体金抗体检测 试剂为英诺特(唐山)生物技术有限公司生产的新型冠状病毒(2019-nCoV)抗体检测试剂盒(胶体金法)(国械注准 202003400177)(批号:20200204),按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 ELISA 抗体检测 ELISA 试剂盒为北京某公司生产的新型冠状病毒(2019-nCoV)IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)(批号 NCOM20200205B)和新型冠状病毒(2019-nCoV)IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)(批号 NCOG20200201B),试剂为供研究使用试剂,IgM 试剂盒为捕获法,IgG 为间接法。按照试剂盒说明书进行操作,IgM 试剂盒待测血清为 11 倍稀释,IgG 为 220 倍稀释,于波长 450 nm/620 nm 读数。IgM 试剂临界值=阴性对照孔 A 均值×2.1,阴性对照孔均值低于 0.05 按 0.05 计算。阴性对照孔 A 值≤0.10,阳性对照孔 A 值≥0.80,实验有效。IgG 试剂临界值:临界值=0.16+阴性对照孔 A 值均值(阴性对照孔低于 0.03 以 0.03 计算)。阴性对照孔 A 值≤0.10,阳性对照孔 A 值≥0.30,否则试验无效。阳性判定:样品 A 值≥临界值,阴性判定:样品 A 值<临界值。

1.4 统计学分析 数据统计分析使用 SPSS 20.0 版本软件,不同人员类型阳性率比较使用 Fisher 精确检验,ELISA 检测的光密度(OD)值使用 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。两种检测方法比较使用 kappa 检验,Kappa≥0.75 认为两种检测方法具有极好的一致性,0.4~0.75 为中高度一致。

2 结果

2.1 一般情况 本研究采集了 42 例新型冠状病毒肺炎确诊病例(轻型、普通型、重型与危重型)、8 例无症状感染者、59 例密切接触者和 49 例其他相关人员血清,人员的基本特征见表 1。轻型、普通型、重型与危重型病例的发病至采样的间隔时间中位数分别为 6、18、4.5 d。

表 1 新型冠状病毒肺炎确诊病例、无症状感染者、密切接触者及其他相关人员基本特征

| 特征 | 确诊病例($n=42$) | | | 无症状感染者($n=8$) | 密切接触者($n=59$) | 其他相关人员($n=49$) |
|-----------------------------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 轻型($n=19$) | 普通型($n=17$) | 重型与危重型($n=6$) | | | |
| 年龄($\bar{x}\pm s$,岁) | 32.2±13.4 | 49.3±15.1 | 57.7±18.2 | 62.8±15.8 | 46.2±19.0 | 38.5±20.1 |
| 性别(n ,%) | | | | | | |
| 男 | 9(47.3) | 10(58.8) | 4(66.7) | 6(75.0) | 30(50.8) | 24(49.0) |
| 女 | 10(52.6) | 7(41.2) | 2(33.3) | 2(25.0) | 29(49.2) | 25(51.0) |
| 发病至采样间隔时间[$M(P_{25},P_{75})$,d] | 6(3,8) | 18(8.5,26) | 4.5(0.8,10.3) | / | / | / |

2.2 血清学检测结果 对新型冠状病毒肺炎确诊病例、无症状感染者、密切接触者及其他相关人员的血清

进行了 IgG 和 IgM 抗体检测。ELISA 和胶体金法检测 42 例确诊病例的阳性情况分别为: IgM 阳性 16 例

(38.1%)、14 例(33.3%)、IgG 阳性 15 例(35.7%)、24 例(57.1%)。对其他类型人员进行 ELISA 检测,8 例无症状感染者为 IgM 阳性 5 例(62.5%)和 IgG 阳性 5 例(62.5%)。密切接触者者 IgM 阳性 1 例(1.7%)和 IgG 阳性 2 例(3.4%)。其他相关人员为 IgM 阳性 1 例(2.0%)和 IgG 阳性 2 例(4.1%)。普通型病例和无症状感染者检测的阳性率较高,重型与危重型检出的阳性率较低,不同类型人员阳性率差异有统计学意义,见表 2。

| 检测结果 | 确诊病例(<i>n</i> =42) | | | 无症状感染者 | 密切接触者 | 其他相关人员 | <i>P</i> 值 |
|--------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------|
| | 轻型(<i>n</i> =19) | 普通型(<i>n</i> =17) | 重型与危重型(<i>n</i> =6) | (<i>n</i> =8) | (<i>n</i> =59) | (<i>n</i> =49) | |
| ELISA IgM 阳性 | 5(26.3) | 11(64.7) | 0(0.0) | 5(62.5) | 1(1.7) | 1(2.0) | <0.001 |
| 胶体金 IgM 阳性 | 1(5.3) | 12(70.6) | 1(16.7) | / | / | / | <0.001 |
| ELISA IgG 阳性 | 7(36.8) | 8(47.1) | 0(0.0) | 5(62.5) | 2(3.4) | 2(4.1) | <0.001 |
| 胶体金 IgG 阳性 | 9(47.4) | 14(82.4) | 1(16.7) | / | / | / | 0.01 |

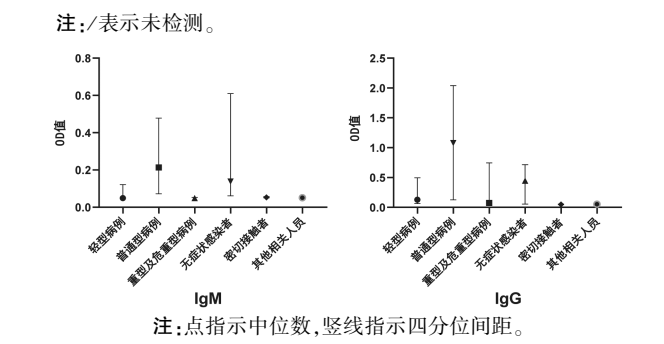


图 1 不同类型人员血清标本的 ELISA 试验检测光密度(OD)值

2.3 确诊病例不同采样间隔时间的抗体阳性率比较

对 42 例确诊病例按照发病日期至采样日期的间隔时间进行分组,分别统计两种检测方法的 IgM 和 IgG 抗体检测阳性率,可以看到采样日期从第二周起(8~14 d),不论是 IgM 还是 IgG 的阳性率均出现显著增长,第 15~35 d 组,阳性率最高,IgM 抗体阳性率 ELISA 和胶体金分别为 72.7%与 36.4%,IgG 抗体阳性率分别为 72.7%与 90.9%,见表 3。

表 3 新型冠状病毒肺炎确诊病例不同采样间隔时间的抗体阳性率比较(%、*n*/*N*)

| 发病日期至采样日期的间隔时间(d) | IgM 阳性率 | | IgG 阳性率 | |
|-------------------|------------|------------|------------|-------------|
| | ELISA | 胶体金法 | ELISA | 胶体金法 |
| 0~3 | 11.1(1/9) | 11.1(1/9) | 40.0(4/10) | 30.0(3/10) |
| 4~7 | 0.0(0/10) | 0.0(0/10) | 30.0(3/10) | 30.0(3/10) |
| 8~14 | 63.6(7/11) | 36.4(4/11) | 45.5(5/11) | 72.7(8/11) |
| 15~35 | 72.7(8/11) | 36.4(4/11) | 72.7(8/11) | 90.9(10/11) |

2.4 血清学阳性确诊病例的采样时间 ELISA IgM、胶体金 IgM、ELISA IgG 以及胶体金 IgG 试验检测出阳性的发病日期至采样日期的间隔时间中位数分别为 16 d(*IQR*:10.0~26.5 d)、14 d(*IQR*:10.5~26.0 d)、12 d(*IQR*:5.0~22.8 d)、13 d(*IQR*:5.8~24.5 d),

从不同类型人员的 ELISA 试验检测的光密度(OD)值看,IgM 抗体检测结果普通型和无症状感染者中位数和四分位间距值较大[0.214(*IQR*:0.073~0.479),0.139(*IQR*:0.061~0.610)],IgG 抗体检测结果普通型中位数和四分位间距值较大[1.079(*IQR*:0.126~2.040)],见图 1。IgM 和 IgG 抗体检测,确诊病例和无症状感染者差异均无统计学意义(*P* 值分别为 0.061 和 0.944)。

见图 2。

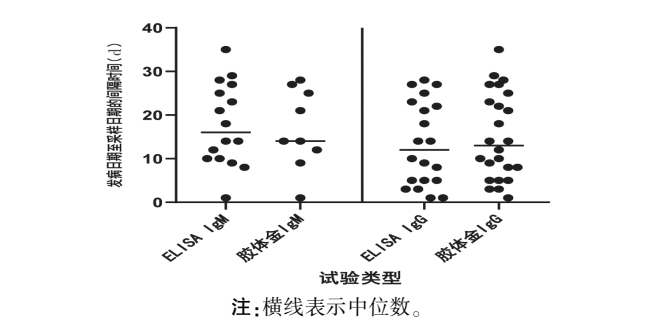


图 2 新型冠状病毒肺炎确诊病例中血清学检测阳性的采样时间

2.5 ELISA 法与胶体金法比较 ELISA 法与胶体金法比对,IgM 抗体检测的 *Kappa* 值为 0.614,IgG 抗体检测的 *Kappa* 值为 0.716,两种方法在检测新型冠状病毒 IgM 和 IgG 抗体上中高度一致。

3 讨论

新型冠状病毒肺炎是一种由新型病原体引发的新发急性呼吸道传染病,对其实验室诊断的方法需要实验人员在以往知识的基础上进行研究验证。传染病常用的实验室诊断方法包括核酸检测、病毒分离、血清学抗体检测等方法。目前最新版的诊疗方案已经将血清学检测方法纳入病例确诊的方法之中,目前已有的血清学抗体检测方法包括胶体金法、ELISA、化学发光法、微量中和法等,对于这些方法在新型冠状病毒肺炎病例检测应用的报道还屈指可数^[6]。由于血清学检测具有不依赖设备、生物安全风险低、简单快速等优点^[7],因此是一种有利于在基层实现的检测方法,可与核酸检测协同使用,取长补短^[8]。为了研究胶体金法和