

新型冠状病毒肺炎特异性 IgM 抗体两种方法检测比较分析*

徐云云,李宗光,刘海燕,胡安群

(安徽省安庆市立医院检验科 246003)

[摘要] **目的** 对胶体金免疫层析法和荧光免疫层析法检测 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)进行比较,并初步探讨 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体的消长情况。**方法** 通过胶体金免疫层析和荧光免疫层析两种试剂盒对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者和对照组(2019-nCoV 流行期间经临床诊断排除 COVID-19 者)血清中 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体进行检测,并对不同病程的 COVID-19 患者血清特异性 IgM 抗体检测结果进行统计分析。**结果** 胶体金免疫层析法总阳性率(81.25%)略低于荧光免疫层析法(88.75%),两种方法的总阳性率为 91.25%;两种方法的特异度均为 96%;两种方法均显示 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体最早可在感染 2019-nCoV 3 d 内即可产生,可持续存在 1 个月不消失,在病程的 15~30 d 内阳性率最高;荧光免疫层析法中,早期组与治疗后期组、治愈随访组比较,血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),早期组与治疗初期组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗初期组、治疗后期组与治愈随访组间两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 荧光免疫层析法检测 2019-nCoV IgM 抗体的灵敏度高于胶体金免疫层析法,特异度无差别,且,并在 15~30 d 内达高峰。血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体检测可应用于 2019-nCoV 感染的筛查并与核酸检测结果互为补充。

[关键词] 2019 新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;2019-nCoV 特异性 IgM 抗体

[中图分类号] **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)14-0-0

Comparison and analysis of two methods for detection of COVID-19 specific IgM antibodies*

XU Yunyun, LI Zongguang, LIU Haiyan, HU Anqun, Department of Clinical Laboratory

(Laboratory Department, Anqing City Hospital, Anqing, Anhui 246003, China)

[Abstract] **Objective** The colloidal gold immunochromatographic method and fluorescent immunochromatographic method for the detection of 2019 new coronavirus (2019-nCoV) were compared, and the growth and decline of 2019-nCoV-specific IgM antibodies were initially discussed. **Methods** Colloidal gold immunochromatography and fluorescence immunochromatography kits were used to detect 2019-nCoV-specific IgM antibodies in serum of patients with new type of coronavirus pneumonia (COVID-19) and control groups, and serum-specific IgM antibodies of COVID-19 patients in different courses were analyzed statistically. **Results** The total positive rate of colloidal gold immunochromatography (81.25%) was slightly lower than that of fluorescent immunochromatography (88.75%). The total positive rate of both methods was 91.25%; the specificity of both methods is 96%. Both methods showed 2019-nCoV-specific IgM antibodies could be produced as early as 3 days after infection with 2019-nCoV, it persisted for 1 month and didn't disappear, and reached a peak within 15-30 days. In the fluorescence immunochromatography, the serum 2019-nCoV-specific IgM antibody levels in the early group were significantly different from those in the late treatment group and the follow-up group after cure ($P < 0.05$). There was no significant difference between the early group and the early treatment group ($P > 0.05$). There was no significant difference between the early treatment group, the late treatment group and the cured follow-up group ($P > 0.05$). **Conclusion** The sensitivity of fluorescence immunochromatography for detecting 2019-nCoV IgM antibodies is higher than that of colloidal gold immunochromatography, and there is no difference in specificity; The serum 2019-nCoV specific IgM antibody detection can be applied to the screening of 2019-nCoV infection, which can become supplement of nucleic acid test results.

[Key words] 2019 novel coronavirus; corona virus disease 2019; 2019-nCoV-specific IgM antibody

2019 年 12 月以来,湖北省武汉市部分医院陆续发现不明原因肺炎病例,对病例呼吸道标本通过采用病毒全基因组序列分析、核酸检测、病毒分离等多种实验室方法被证

实为一种从未在人体中发现的 β 属冠状病毒新毒株^[1-2],并于 2020 年 1 月 12 日被世界卫生组织命名为 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)。

* 基金项目:安徽省安庆市新型冠状病毒肺炎疫情应急科技计划项目(2020Z1004)。 作者简介:徐云云(1990—),硕士,初级检验师,主要从事临床免疫学研究。 △ 通信作者, E-mail: haq0828@hotmail.com。

基于 2019-nCoV 可通过呼吸道、密切接触、长时间高浓度气溶胶暴露史传播,以及人群的普遍易感性^[3],早发现、早隔离、早治疗成为此次疫情控制的关键。实时荧光 RT-PCR 检测 2019-nCoV 核酸阳性是新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 诊断的金标准^[3]。核酸检测具有早期敏感、特异性高等优势,但对于核酸检测结果的准确性与样本类型、质量、实验因素、试剂盒性能及患者感染周期等因素有关^[4-5],常出现 COVID-19 影像学表现与核酸检测结果不一致的病例^[6]。

为进一步加强对病例的早发现、早治疗、提高救治能力,减少疾病传播,本研究采用胶体金免疫层析法和荧光免疫层析法两种方法检测 COVID-19 患者血清中特异性的 IgM 抗体,探讨 IgM 抗体检测的临床价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

80 例患者均为安徽省安庆市立医院北院区(新型冠状病毒病定点医院)收治的通过实时荧光 RT-PCR 确诊的 COVID-19 住院病例,根据病程将其分为早期组(发病 7 d 内采血),治疗初期组(发病 8~14 d 采血),治疗后期组(发病 15 d 后至出院前采血),治愈随访组(治愈出院并隔离 14 d 后采血)。其中男 46 例,女 34 例,年龄为(44±13)岁。所有确诊病例均符合中华人民共和国国家卫生健康委员会印发的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第六版)》的通知的诊断标准。健康对照组病例 30 例,为 2019-nCoV 流行期间经临床诊断排除 COVID-19 者。

1.2 试剂与仪器

胶体金免疫层析法 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体检测试剂盒由军事医学研究院微生物流行病学研究所和北京热景生物技术股份有限公司(产品批号 20200235)提供;荧光免疫层析法 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体检测试剂由广州万孚生物技术股份有限公司(产品批号 W27714304A)提供;广州万孚生物技术股份有限公司干式荧光免疫分析仪(型号 FS-205)。

1.3 方法

采集对照组与 COVID-19 患者血清 3 mL,3 500 r/min 离心 10 min 后,取上层血清,按照两种试剂盒的操作说明进行操作检测。所有操作均在生物安全柜中进行。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,经 Kolmogorov-Smirnov Test 检验正态性,符合正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种免疫层析法检测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体的灵敏度与特异度

80 例 COVID-19 患者中,胶体金免疫层析法检测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体阳性 65 例,阴性 15 例;荧光免疫层析法检测 2019-nCoV IgM 抗体阳性 71 例,阴性 9 例。见表 1。胶体金免疫层析法和荧光免疫层析法检测 2019-

nCoV 特异性 IgM 抗体的敏感度分别为 81.25%(65/80)和 88.75%(71/80),两种方法的总灵敏度为 91.25%。在 50 例对照组中,胶体金免疫层析法检测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体阴性 48 例,阳性 2 例,特异度为 96%(48/50);荧光免疫层析法检测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体阴性 48 例,阳性 2 例,特异度为 96%(48/50)。

表 1 两种免疫层析法检测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体结果(n)

荧光免疫层析法	胶体金免疫层析法		总计
	阴性	阳性	
阴性	7	2	9
阳性	8	63	71
总计	15	65	80

2.2 两种免疫层析法不同病程 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体检测结果

两种方法均在病程的 15~30 d 内阳性率最高。在病程的 0~3 d、4~7 d、8~14 d、15~21 d、22~30 d、>30 d 胶体金免疫层析阳性率分别为 66.67%、37.5%、73.68%、92.86%、100%、86.67%;荧光免疫层析法阳性率分别为 66.67%、62.5%、84.21%、96.43%、100%、93.33%。见表 2。

表 2 两种免疫层析法不同病程 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体的检测结果[n(%)]

病程	病例数 (n)	胶体金免疫层析法		荧光免疫层析法	
		阴性数	阳性数	阴性数	阳性数
0~3 d	3	1(33.33)	2(66.67)	1(33.33)	2(66.67)
4~7 d	8	5(62.5)	3(37.5)	3(37.5)	5(62.5)
8~14 d	19	5(26.32)	14(73.68)	3(15.79)	16(84.21)
15~21 d	28	2(7.14)	26(92.86)	1(3.57)	27(96.43)
22~30 d	7	0	7(100)	0	7(100)
31~	15	2(13.33)	13(86.67)	1(6.67)	14(93.33)
总计	80	15(18.75)	65(81.25)	9(11.25)	71(88.75)

2.3 荧光免疫层析法不同病程 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体的检测

早期组(1.72±1.07)与治疗后期组(3.69±2.54)、治愈随访组(3.46±2.33)比较,血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),早期组与治疗初期(2.63±1.89)组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗初期组、治疗后期组与治愈随访组间两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。4 组血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体水平两两比较见表 3。

表 3 4 组间 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体水平的比较分析

比较组别	F	t	P
早期组 vs. 治疗初期组	4.363	-1.662	0.108
早期组 vs. 治疗后期组	11.349	-3.741	0.001

早期组 vs. 治愈随访组	5.118	-2.478	0.023
治疗初期组 vs. 治疗后期组	3.271	-1.564	0.124
治疗初期组 vs. 治愈随访组	0.452	-1.105	0.278
治疗后期组 vs. 治愈随访组	0.700	0.298	0.767

3 讨 论

2019-nCoV 为人类冠状病毒中的第七种,可引起肺炎。多项研究表明,2019-nCoV 与来自中华菊头蝠(马蹄蝠属)的蝙蝠 SARS 样冠状病毒(SARS-like CoVs)最为相似,核苷酸同源性约为 87.9%~98.7%^[7-8],与中东呼吸综合症冠状病毒(MERS-CoV)的相似性约为 50%^[9],对人的感染性很强。2019-nCoV 可通过呼吸道、密切接触等多种途径传播,使得 COVID-19 在短时间内迅速传播至全国乃至其他国家(日本、韩国、美国、泰国、越南、伊朗等^[10-15])。截止 2020 年 3 月 1 日,由国家卫生健康委员会最新统计发布的全国累计确诊病例达 79 968 例,累计死亡 2 915 例。现临床确诊主要依靠病毒基因序列测序和逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)^[3]。然而病毒基因序列测序操作繁琐,实验要求高,RT-PCR 虽具有良好的特异性,但是灵敏性仍有待提高。目前已有报道 2019-nCoV 核酸假阴性的情况^[16],给 2019-nCoV 感染诊断与防控带来巨大的影响。

本研究通过胶体金免疫层析法和荧光免疫层析法分别对 COVID-19 患者和对照组血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体进行检测,发现荧光免疫层析法(88.75%)的敏感度略大于胶体金免疫层析法(81.25%)。两种方法结合总的灵敏度为 91.25%。在 50 例对照组中,胶体金免疫层析法和荧光免疫层析法检测 2019-nCoV IgM 抗体特异度相同,均为 96%,其中 2 例两种方法检测结果均为“弱阳性”。回顾患者临床资料发现,2 例均系有 COVID-19 患者接触史,但核酸检测与影像学检查排除 COVID-19 的患者,可能是 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体为一种保护性抗体。因此两种方法检测血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体均有较高的灵敏度与特异度。

本研究对不同病程血清中 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体检测结果进行分析,发现两种方法在病程的 0~3 d、22~30 d 检出率相同,分别为 66.67%、100%。在 4~7 d、8~14 d、15~21 d 荧光免疫层析法的阳性率大于胶体金免疫层析法。>30 d 时胶体金免疫层析法阳性率大于荧光免疫层析。其中 2 例治疗期患者,胶体金免疫层析法呈强阳性结果,而荧光免疫层析法结果为阴性,可能是患者 IgM 抗体水平较高,荧光免疫层析法检测时出现抗原抗体反应的“后带现象”,从而出现“阴性”的结果。

2019-nCoV 作为一种全新的病毒,其感染后 IgM 抗体的消长情况还没有任何报道。从本研究采用荧

光免疫层析法对 80 例不同时期 COVID-19 患者血清中的 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体定量检测的结果来看,发现 IgM 抗体最早可在感染 2019-nCoV 后 2 d 产生。从病程时间的关系来看,病程的 1 周、2 周、3 周、1 个月阳性率逐渐增高,1 个月后降低。可推测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体在感染 2019-nCoV 1 周内即可产生,并可持续存在 1 个月不消失。从早期组、治疗初期组、治疗后期组及治愈随访期 4 组血清 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体比较结果分析来看,发现仅早期组与治疗初期组、治疗后期组差异有统计学意义($P < 0.05$),余组间进行比较差异均无统计学意义($P < 0.05$)。可能是病原微生物侵入机体后,激活 B 淋巴细胞产生抗体,需要一定时间,从而形成抗体检测的“空窗期”,且由于个体差异,不同个体“空窗期”的时间亦有所不同,早期组采血时间较早,IgM 抗体可能还未产生或者呈低浓度水平。治疗期患者随着病毒的不断复制增殖,血清抗体基本均已产生,抗体水平一定时间内维持较高水平,治愈恢复组患者血清距感染 2019-nCoV 时间较长,经过治疗后病毒复制亦得到控制,IgM 抗体亦逐渐减少甚至消失。

基于以上研究,笔者认为荧光免疫层析法检测 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体的敏感度略大于胶体金免疫层析法,特异度两者相同。两种检测方法结合总灵敏度高达 91.25%。2019-nCoV 特异性 IgM 抗体在感染 2019-nCoV 1 周内即可产生,并可持续存在 1 月不消失。建议将 RT-PCR 和 2019-nCoV 特异性 IgM 抗体的检测两种方法结合起来,使病原学和血清学结果互相补充,以利于 2019-nCoV 感染的早期诊断、治疗监测和流行病学调查。本研究也存在一些不足:部分患者病程时间掌握稍有偏差,各病程样本例数较少,检测时间点不统一,且缺乏对同一病例的连续追踪观察,尚不能完全反映 COVID-19 患者体内的特异性抗体产生及变化规律。在后期试验中,笔者将进一步对治愈随访患者 2019-nCoV 血清特异性 IgM 和 IgG 抗体进行追踪检测,为疾病的防治与 2019-nCoV 抗体的消长规律提供参考依据。

参考文献

- [1] XU X T, CHEN P, WANG J F, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [J/OL]. *Sci China Life Sci.* [2020-03-02]. [https:// link.springer.com/ article/10.1007% 2Fsl427020-1637-5](https://link.springer.com/article/10.1007%2Fsl427020-1637-5).
- [2] 史河水, 韩小雨, 樊艳青, 等. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎临床特征及影像学表现[J/OL]. *临床放射学杂志.* [2020-03-02]. ht-

- tp://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1187.R.202006.1616.004.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感染的肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知(2020-02-18)[EB/OL]. [2020-03-02]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/Zhengce-wj/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/OL]. 中国病毒学, 2005, 20(3): 228-231.
- [5] 郭晓波, 蔺京, 来春艳, 等. 新型冠状病毒与实时荧光 RT-PCR 核酸检测[J/OL]. 陕西医学杂志, [2020-03-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1104.R.20200225.1848.004.htm>.
- [6] 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]. 重庆医学. [2020-02-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.
- [7] ZHOU P, YANG X, WANG X, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J/OL]. Nature. [2020-02-18]. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-2017>.
- [8] CERAOLO C, GIORGI F M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus[J/OL]. J Med Virol. [2020-02-06]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25700>.
- [9] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J/OL]. Lancet. [2020-02-18]. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30251-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30251-8/fulltext).
- [10] SHIRATO K, NAO N, KATAN H, et al. Development of Genetic Diagnostic Methods for Novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan [J/OL]. Japanese Journal of Infectious Diseases. [2020-02-18]. http://attach.pubtsg.com:8088/attach/show?query=c-5bDtCVxTuOMk1pAmvBF_wiPbvQ3kd3J9OLc8sgrmSZoJnMkYzdH5Bf2t160OxZ&view=true&type=.pdf.
- [11] K I M, 2019-nCoV TFF. Epidemiologic characteristics of early cases with 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) disease in Korea[J/OL]. Epidemiology and Health. [2020-02-09]. <https://www.e-epih.org/journal/view.php?doi=10.4178/epih.e2020007>.
- [12] CDC. First travel-related case of 2019 novel coronavirus detected in United States [EB/OL]. [2020-03-02]. <https://www.cdc.gov/media/>.
- [13] SOOKAROMDEE P, WIWANITKIT V. Imported novel coronavirus infections: observation on active and passive case detection in thailand[J/OL]. Population Health Management. [2020-03-02]. <https://doi.org/10.1089/pop.2020.0014>.
- [14] LAN T P, THUONG V N, QUANG C L, et al. Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in vietnam[J]. N Engl J Med, 2020, 382: 872-874.
- [15] SONG F, SHI N, SHAN F, et al. Emerging coronavirus 2019-nCoV pneumonia [J/OL]. Radiology. [2020-03-02]. <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2020200274>.
- [16] SUI X, HUANG Y, SONG W, et al. Clinical featurea of pulmonary cryptococcosis in thin-section CT in immunocompetent and non-AIDS immunocompromise patients[J]. Radiol Med, 2020, 125(1): 31-38.

(收稿日期: 2019-12-18 修回日期: 2020-02-02)