

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.23.012

不同标本类型及冻存对新型冠状病毒抗体检测效力的影响^{*}

贺建兰,李青峰,钟 晶,毕 雷,尚鹏程,汪 波,邢 燕,罗 涛,王玥莲,周 觅[△]
成都市公共卫生临床医疗中心检验科,四川成都 610061

摘 要:**目的** 探讨新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者同源血清与血浆中的特异性免疫球蛋白 M(IgM)和免疫球蛋白 G(IgG)抗体检测结果的差异。**方法** 选取 2020 年 2—3 月在成都市公共卫生临床医疗中心住院的 COVID-19 确诊病例 58 例。采用化学发光免疫分析技术分别检测血清和血浆的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)特异性 IgM 和 IgG 抗体及冷冻前后血清 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体。采用秩和检验对血清与血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体的 S/CO 值进行比较。**结果** 血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体的 S/CO 值比较,差异有统计学意义($P=0.000\ 2$);血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体的 S/CO 值比较,差异有统计学意义($P=0.005\ 6$)。Spearman 相关性分析显示,冻存前后标本 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体具有相关性($r=0.984\ 5, P<0.05$)。**结论** 血清和血浆标本用于检测 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体同样有效,冻存后标本检测效力低于新鲜血液标本。

关键词:新型冠状病毒; 免疫球蛋白 M; 免疫球蛋白 G; 新型冠状病毒肺炎
中图法分类号:R563.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2020)23-3432-03

Effects of different specimen types and frozen storage on the detection
effectiveness of SARS-CoV-2 antibody^{*}
HE Jianlan, LI Qingfeng, ZHONG Jing, BI Lei, SHANG Pengcheng,
WANG Bo, XING Yan, LUO Tao, WANG Yuelian, ZHOU Mi[△]
Department of Clinical Laboratory, Public Health Clinical Center of
Chengdu, Chengdu, Sichuan 610061, China

Abstract:**Objective** To explore the difference in the detection results of specific immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) antibodies in homologous serum and plasma of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) patients. **Methods** Fifty-eight confirmed cases of COVID-19 hospitalized in Chengdu Public Health Clinical Medical Center from February to March 2020 were selected. Chemiluminescence immunoassay was used to detect Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) specific IgM and IgG antibodies in serum and plasma, and SARS-CoV-2 specific IgG antibodies in serum before and after freezing. Rank sum test was used to compare the S/CO values of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG antibodies in serum and plasma. **Results** The difference of S/CO value of SARS-CoV-2 specific IgM antibody in serum and plasma was statistically significant ($P=0.000\ 2$). The S/CO value of SARS-CoV-2 specific IgG antibody in serum and plasma was compared, and the difference was statistically significant ($P=0.005\ 6$). Spearman correlation analysis showed that SARS-CoV-2 specific IgG antibody was correlated before and after cryo-storage ($r=0.984\ 5, P<0.05$). **Conclusion** Serum and plasma samples are equally effective in detecting SARS-CoV-2 specific IgM and IgG antibodies, and the efficacy of samples after cryopreservation is lower than that of fresh blood samples.

Key words: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; immunoglobulin M; immunoglobulin G; Corona Virus Disease 2019

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)已纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病,按甲类传染病管理,《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》(试行第七版)增加了抗体检测的内容,抗体检测在 COVID-19 诊疗过程中发挥了重要的作用^[1-6]。因此,血清新型

冠状病毒(SARS-CoV-2)特异性免疫球蛋白 M(IgM)和免疫球蛋白 G(IgG)抗体检测的准确性和可靠性对疾病的诊断、治疗至关重要。本研究拟对 COVID-19 确诊病例使用不同类型标本的特异性 IgM 和 IgG 抗体检测效力进行了初步探讨,并分析了标本冻存对检

^{*} 基金项目:四川省科学技术厅项目(2020YFS0558,2020YFS0564)。
作者简介:贺建兰,女,主管技师,主要从事临床免疫研究。 [△] 通信作者, E-mail:23130580@qq.com。

测结果的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 2—3 月在成都市公共卫生临床医疗中心住院的 COVID-19 确诊病例 58 例,男 33 例,女 25 例,年龄 29~88 岁。将入选患者分为两部分,其中 20 例用于比较血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体水平,收集其入院当日同源血清、血浆标本 20 份,检测 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体的 S/CO 值;其余 38 例于入院当日采集静脉血并检测血清 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体,然后于-80℃冰箱保存,并于 2020 年 3 月取出血液标本,于室温下复溶,充分混匀后上机检测,期间无反复冻融。比较冻存前后血清 IgG 抗体水平差异。本研究经医院伦理审查委员会审核通过。

1.2 研究方法 采用磁微粒和化学发光技术,按照间接法原理进行免疫检测。全自动化学发光免疫分析仪(美国贝克曼 Access2)、试剂盒购自四川沃文特生物技术有限公司。首先将血清或血浆标本、分析缓冲液、生物素化的 SARS-CoV-2 抗原包被的链亲和素磁珠及碱性磷酸酶(ALP)标记的鼠抗人 IgM/IgG 抗体加入反应管中孵育,形成“免疫磁珠-SARS-CoV-2 IgG 抗体-酶结合物”复合物,再通过洗涤,将未被结合的酶结合物及其他物质去除。然后,加入发光底物(AMPPD),酶结合物催化发光底物发射光子,光子的数量与标本中 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体水平呈正相关。

1.3 标本采集 所有研究对象均采集空腹静脉血 5 mL,分别置于含分离胶和含枸橼酸盐的采血管内,静置待血液凝固,2 500×g 离心 5 min 分离血浆。分别收集血清或血浆备用。

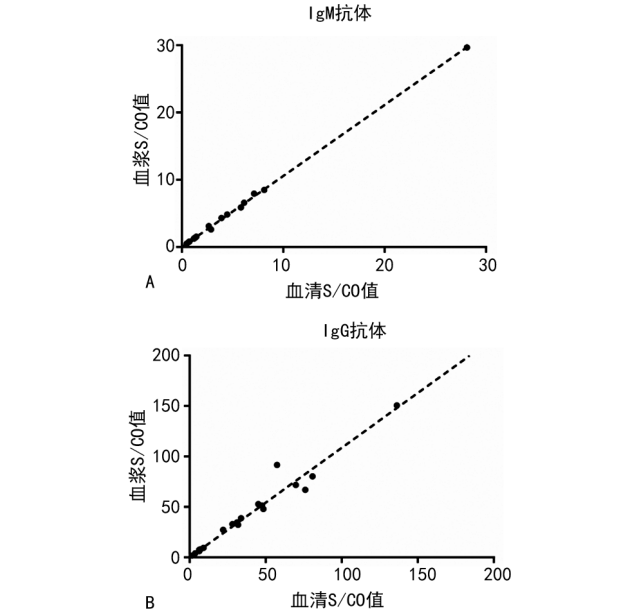
1.4 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体检测 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体检测遵照化学发光免疫分析仪操作指南。全自动化学发光测定仪根据校准品的相对发光强度(RLU)自动计算阳性判断值(cut-off 值)。阴性(-):S/CO 值<1.00,待检标本中未检出 SARS-CoV-2 特异性 IgM 或 IgG 抗体;阳性(+):S/CO 值≥1.00,待检标本中检出 SARS-CoV-2 特异性 IgM 或 IgG 抗体。

1.5 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行数据统计分析,SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体 S/CO 值采用秩和检验,非正态分布资料以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示;变量间相关性采用 Spearman 相关性分析法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 COVID-19 确诊患者同源血清与血浆 IgM 和 IgG 抗体 S/CO 值比较 Spearman 相关性分析显示,血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体相关系数(r)=0.999 6,SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体 r =0.976 7,SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体拟合线斜率为 1.060(95%CI:1.045~1.068),SARS-CoV-2 特

性 IgG 抗体拟合线斜率为 1.086 (95%CI:1.011~1.161),提示血清和血浆的 S/CO 值均呈线性相关,见图 1。血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体的 S/CO 值均略高于血清。血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体的 S/CO 值比较,差异有统计学意义($P=0.000\ 2$);血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体的 S/CO 值比较,差异有统计学意义($P=0.005\ 6$)。血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体阳性标本数相同,配对结果一致,表明该差异并不影响定性结果判读,定性分析结果也相同,见表 1。



注:A为血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体的 S/CO 值关系分析;B为血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体的 S/CO 关系分析。

图 1 血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体的 S/CO 值关系分析

表 1 血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体的 S/CO 值分析及定性结果			
项目	标本类型	S/CO 值 [$M(P_{25} \sim P_{75})$]	定性标本阳性率 [$n(\%)$]
IgM 抗体	血清	1.44(1.19~5.49)	16(80.0)
	血浆	1.57(1.25~5.62)	16(80.0)
IgG 抗体	血清	31.54(7.52~55.24)	20(100.0)
	血浆	33.72(8.24~63.33)	20(100.0)

2.2 冻存前后标本 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体 S/CO 值关系分析 Spearman 相关性分析显示,冻存前后标本 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体的 S/CO 值具有相关性($r=0.984\ 5, P<0.05$),斜率仅为 0.748 1 (95%CI:0.711 9~0.784 3),见图 2。同时,定性分析中也出现 2 例标本在冻存前 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体检测为阳性,而在冻存后 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体检测为阴性。

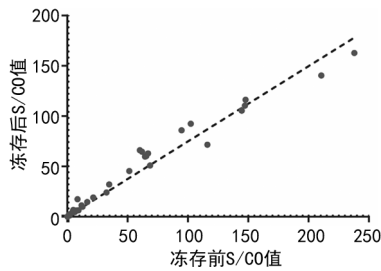


图 2 冻存前后血清标本 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体的 S/CO 值关系分析

3 讨 论

《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》针对 COVID-19 诊断标准新增了如下内容:(1)确诊病例第三条血清 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体阳性,血清 SARS-CoV-2 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;(2)COVID-19 疑似病例排除标准为疑似病例连续 2 次呼吸道病原核酸检测阴性(采样时间至少间隔 24 h),且发病 7 d 后 SARS-CoV-2 特异性抗体 IgM 和 IgG 抗体仍为阴性^[6]。有研究表明,IgM 和 IgG 抗体联合检测对 COVID-19 的诊断、疗效固体及预后均具有价值^[7-10]。徐万洲等^[11]研究表明,血清 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体联合检测可作为 SARS-CoV-2 感染的有效筛查和诊断指标,是 COVID-19 核酸检测假阴性的有效补充。唐鹏等^[12]研究比较了化学发光和胶体金法检测 SARS-CoV-2 特异性抗体的阳性检测值等,提出在 COVID-19 的诊疗过程中,抗体的检测可以辅助弥补咽拭子核酸检测的不足,化学发光法测定总抗体优于胶体金法。

在对 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体检测时,除了需要选择灵敏度和特异度较好的检测试剂盒外,标本类型也非常重要^[13-15]。有研究表明,在登革热病毒的检测中,血清和血浆标本同样有效^[8]。本研究通过比对 COVID-19 确诊患者同源血清与血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体 S/CO 发现,血清和血浆 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体均存在高度相关性,拟合线斜率接近 1.0,且定性分析结果完全一致。本研究结果表明,血清和血浆标本具有同样的检测效力,但需要注意的是,血清和血浆标本 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体存在一定差异,尽管在本研究中并未影响定性分析,但在大样本量的临床实践中仍有出现差异的可能,差异原因有待进一步研究。

本研究结果显示,即使在 -80℃ 冻存,且避免反复冻融的理想情况下,仅仅保存 3 周,标本 S/CO 明显下降且有 2 个标本出现了定性分析的偏差。因此,为保证检测结果的准确性,应尽量选择新鲜血液标本进行 SARS-CoV-2 特异性 IgM 和 IgG 抗体检测。

参考文献

[1] ZHU N,ZHANG D,WANG W,et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China[J]. N Engl J

Med,2020,382(7):727-733.
[2] MUNSTER V J,KOOPMANS M,VAN DOREMALEN N,et al. A novel coronavirus emerging in China[J]. N Engl J Med,2020,382(8):692-694.
[3] World Health Organization. WHO Director-general's opening remarks at the media briefing on COVID-19 [EB/OL]. (2020-03-11) [2020-04-27]. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19---11-march-2020>.
[4] HUANG C,WANG Y,LI X,et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet,2020,395(10223):497-506.
[5] LI Q,GUAN X,WU P,et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J]. N Engl J Med,2020,382(13):1199-1207.
[6] 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(试行第七版)的通知(国卫办医函[2020]103号)[EB/OL]. (2020-03-04) [2020-04-27]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
[7] TO K K,TSANG O T,LEUNG W S,et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2:an observational cohort study[J]. Lancet Infect Dis,2020,20(5):565-574.
[8] SHEN C,WANG Z,ZHAO F,et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma[J]. JAMA,2020,323(16):1582-1589.
[9] 里进,叶光明,陈良君,等. 新型冠状病毒核酸检测假阴性结果原因分析及对策[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):221-225.
[10] 罗效梅,王静,张娅,等. 全血 SARS-CoV-2 特异性抗体检测对 2019-冠状病毒病的临床应用价值分析[J]. 西南大学学报(自然科学版),2020,42(3):30-34.
[11] 徐万洲,李娟,何晓云,等. 血清 2019 新型冠状病毒 IgM 和 IgG 抗体联合检测在新型冠状病毒感染中的诊断价值[J/OL]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):230-233.
[12] 唐鹏,赵自武,刘颖娟,等. 化学发光和胶体金法检测新型冠状病毒特异性抗体比较及其临床意义[J]. 武汉大学学报(医学版),2020,41(4):517-520.
[13] 鲁彦,居军,李德红. 核酸和血清学指标结合,多类型标本联检,提高新型冠状病毒检出率[J]. 检验医学与临床,2020,17(9):1161-1163.
[14] BLACKSELL S D,LEE S J,CHANTHONGTHIP A,et al. Comparison of performance of serum and plasma in pan-bio dengue and Japanese encephalitis virus enzyme-linked immunosorbent assays[J]. Am J Trop Med Hyg,2012,87(3):573-575.
[15] PINSKY N A,HUDDLESTON J M,JACOBSON R M,et al. Effect of multiple freeze-thaw cycles on detection of measles,mumps,and rubella virus antibodies[J]. Clin Diagn Lab Immunol,2003,10(1):19-21.