

新型冠状病毒血清特异性抗体检测的假性问题 分析和对策探讨

宁明哲,陶月,陈雨欣,柏兵(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科,南京 210008)

摘要:新型冠状病毒肺炎对全球造成了巨大威胁。目前血清抗体检测,成为该疾病诊断和流行控制的关键指标。我国“新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)”中,已明确将新型冠状病毒抗体检测作为临床确诊标准。在临床实际工作过程中,笔者发现新型冠状病毒抗体检测存在着假阳性或者假阴性的问题,给临床解读造成困扰。该文针对新型冠状病毒抗体检测方法的设计和原理,分析可造成假阳性和假阴性结果的原因,并指出解决方法,从而促进对新冠病毒抗体检测更好的理解,以及为临床提供更加全面的结果解读。

关键词:新型冠状病毒肺炎;新型冠状病毒;IgM 抗体;IgG 抗体;假阳性;假阴性

中图分类号: R373.19; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-129-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.031

SARS-CoV-2 Serological Antibody Testing: Problems of False Detections and the Solutions

NING Ming-zhe, TAO Yue, CHEN Yu-xin, BAI Bing

(Department of Laboratory Medicine, Gulou Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: The novel coronavirus pneumonia (COVID-19) outbreak has caused a global disaster. Currently, the antibody testing has become the key for controlling of this pandemic. The guidelines from the National Health Commission (trial version 7) recommend the antibody (IgM and IgG) testing for the COVID-19 diagnosis and therapy. However, false positive and negative detections are often found in clinical laboratories. The author therefore here discuss the possible reasons and solutions of the questionable results, based on the designs and principles of the immunoassays developed for the COVID-19 antibody detection. This review will facilitate better understanding of the COVID-19 antibody detection and more appropriate interpretation of the results for clinicians.

Keywords: novel coronavirus; antibody; false positive; false negative

2019年底发现的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)迅速席卷全球,已成为全球的公共卫生大事件,对全球各地区人民的生命健康和经济带来巨大损失。新型冠状病毒感染导致的疾病称为新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19),据世界卫生组织的实时数据统计,截止2020年7月4日,全球COVID-19确诊病例达1 130多万例,死亡人数超过52万。目前,我国的防控防疫工作已取得阶段性成果,COVID-19抗体检测是进行流行病学调查的主要方法。同时,国家卫生健康委员会2020年3月3日发布的“新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)”,已明确将COVID-19 IgM和IgG抗体作为临床确诊标准^[1]。然而,在4月份国家药品监督管理局也提出抗体检测试剂仅用作对SARS-CoV-2核酸检测阴性疑似病例的补充检测^[2-5],或在疑似病例诊断中与核酸检测协同使用,不作为SARS-CoV-2感染者确诊和排除的依据,也不适用

于一般人群的筛查。这提示现有SARS-CoV-2抗体检测试剂使用过程中可能存在一定的假阴性和假阳性情况。

目前被国家药品监督管理局批准的COVID-19抗体检测试剂盒厂家有广州万孚生物技术股份有限公司、唐山英诺特生物技术有限公司、博奥赛斯(重庆)生物科技有限公司、厦门万泰凯瑞生物技术有限公司、珠海丽珠试剂股份有限公司、珠海经济特区海泰生物制药有限公司、上海芯超生物科技有限公司、南京诺唯赞医疗科技有限公司、博奥赛斯(重庆)生物科技有限公司、广东和信健康科技有限公司与丹娜(天津)生物科技有限公司。上述检测试剂盒主要检测SARS-CoV-2特异性的IgM和IgG抗体,检测方法包括酶联免疫法、化学发光法及胶体金免疫层析法,包被的抗原包括SARS-CoV-2的N蛋白(Nucleoprotein)、M蛋白(Membrane protein)和S蛋白(Spike glycoprotein)。需要提出

作者简介: 宁明哲(1978-),女,硕士,主任技师,主要从事临床免疫实验室检查,E-mail: 54669182@qq.com。

通讯作者: 柏兵, E-mail: bb00004@outlook.com。

的是,本次流行的 SARS-CoV-2 与曾经流行的 Bat-SL-CoV, SARS-CoV 与 MERS-CoV 相比, N, M 和 S 蛋白在氨基酸序列上具有极高的相似性(90%左右)^[6]。这是检测方法中的抗原设计及结果判断应当考虑的因素。除此之外, COVID-19 的基因末端多出一个新的 ORF10 基因, 表达 38 个氨基酸。用它作为抗原表位, 可极大保证 COVID-19 抗体检测的特异性, 但目前的相关研究和应用很少。

由于包被抗原选择的复杂性、高质量抗体制备的困难性以及免疫学检测方法本身的局限性, 敏感度高、特异度强的试剂盒需要通过严格的性能验证。由于疫情的迫切性, 上述在极短时间内生产出的 COVID-19 抗体检测试剂盒, 虽然总体性能尚可, 但也出现了一些检验结果与临床表现和流行病学特征不相符的现象。现对它们进行初步探讨, 并提供一些应对思路。

1 COVID-19 抗体检测中的假阳性问题

1.1 既往冠状病毒感染 COVID-19 属于 β 家族的冠状病毒^[7]。根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库, β 家族冠状病毒该家族中有六种、173 个病毒。COVID-19 中的 N 蛋白、P 蛋白、S 蛋白在氨基酸序列上除与非典型性肺炎病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV) 和中东呼吸综合征病毒(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV) 有高达 90% 以上的相似度外, 还有多种其它冠状病毒在基因序列比对中显示有类似氨基酸序列。这些病毒多数不致病, 但因为具有类似序列, 可以在人体内产生干扰性抗体, 从而导致 COVID-19 抗体检测的假阳性问题。该种情况一般导致 IgG 抗体假阳性, 但不排除 IgM 假阳性。

1.2 交叉抗体的存在 人体正常情况下含有 10^{11} (1 000 亿) 个 B 细胞, 至少可结合 1 000 万种不同抗原表位以上的抗体^[8]。而正常机体每天产生 10^9 个新的 B 细胞。如此庞大的表位结合多样性, 完全有可能随机产生能与包被在检测载体中的抗原片段结合的抗体。另外, 人体在环境中可受到近 1 400 种病原体感染, 或接受各种致敏原的刺激, 会产生更多新的抗体, 极大增加了不同人体间抗体库构成的复杂性, 使得干扰抗体可以随机存在。这种情况下的假阳性, 应仅 IgG 抗体或 IgM 抗体阳性^[10]。

1.3 高浓度弱亲和力的抗体或蛋白干扰 根据抗原抗体结合的反应公式 $[Ab]+[Ag]=[Ag-Ab]$ 及解离常数 $K_d=[Ab]*[Ag]/[Ag-Ab]$ 。Kd 越大, 亲和力越小。一般鼠单抗的亲和力在 1nmol/L 左右 (10^{-9} mol/L), 兔单抗的亲和力在 0.01nmol/L 左右 (10^{-10} mol/L)。人体正常血清中 IgM 总浓度约为 1mg/ml, 针对某

一表位的抗体 IgM 浓度估计在总 IgM 浓度的万分之一以下, 因此其有效浓度不超过 1nmol/L。在抗原为 10nmol/L (约 1 μ g/ml) 和 Kd 为 1nmol/L 的情况下, 1nmol/L 的 IgM 将与 9% 的抗原结合。当 Kd 降低 1 000 倍 (1 000nmol/L) 时, 仅有 0.1% 的抗原被结合, 导致检测信号将降低 100 倍。然而, 当这种低亲和力的抗体浓度 1 000 倍增高时 (1 000nmol/L), 近 50% 的抗原被结合。而这种亲和力高浓度的杂质分子在血液中经常存在。比如, 一般细胞因子的浓度在 1ng/ml 左右, 而清蛋白在 50mg/ml 左右, 有着千万倍数的差异, 可对检测造成干扰。

1.4 方法学本身的问题 特别是胶体金免疫层析法。这种方法方便快捷、便于床边诊断, 但检测过程中没有充分的清洗过程, 难以有效去除非特异性结合物质。这种情况下, 可用缓冲液手工充分洗涤。真阳性的结果, 一般不受洗涤明显影响。

1.5 其它常见因素的干扰 如类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)^[9]、补体、嗜异性抗体、溶菌酶等。

2 COVID-19 抗体检测中的假阴性问题

2.1 检测试剂中的抗原设计与制备 这些抗原蛋白的制备一般采用肽段合成或在质粒表达的方法。合成的肽段和在大肠埃希菌中所表达的肽段没有人体中正常情况下的翻译后修饰 (post-translational modification)。在真核细胞中表达的蛋白的翻译和修饰是否与 COVID-19 所感染的肺泡上皮细胞中产生的修饰相同尚不清楚。比如 SARS-CoV 的 S 蛋白有高达 23 个糖基化位点和 7 个二硫键。这些被修饰的位点对线性和空间抗原表位有着决定性作用, 在合成或重组表达的抗原中未必完全存在, 这样就可能检测的假阴性。

2.2 双抗原夹心法容易产生假阴性结果 这种方法需要两个抗原与抗体特异性反应同时存在。前已述及, 由于抗原抗体反应的平衡性及 Kd 常数, 抗原与抗体并非 100% 结合。假如只有 70% 结合时, 两者同时结合, 以形成最终的有效被检测物时, 只有近一半 (49%)。双抗原夹心法检测抗体的另一个缺点是空间位阻问题。包被抗原与标记抗原在待测血清标本中并非游离存在。因为血清的蛋白浓度极高 (50~70 μ g/ μ l), 蛋白容易相互附着。一个抗体双臂上抗原结合区域之间的空间较小。当包被抗原与标记抗原与待测血清中的蛋白有相互附着时, 会因为空间位阻的原因而影响其与待测抗体的结合, 而造成检测的假阴性。

2.3 试纸条的胶体金免疫层析法更易产生假阴性结果 相对于其它常规免疫学检测方法中 30 min 左右的抗原抗体结合时间, 胶体金试纸条法的反应时间一般在 1 min 内完成, 抗原抗体可能无法充分混

匀及反应,造成假阴性的结果,而且阳性结果的线性定量关系较差。另外,在胶体金试纸条检测COVID-19抗体的方法中,抗原包被膜条,胶体金标记抗人IgM或IgG。在人血清标本中IgM和IgG的含量极高,而真正待测抗体的浓度应该在万分之一以下,而胶体金标记的二抗与血清标本中如此高浓度的IgM或IgG完全结合,导致因灵敏度不足而出现的检测假阴性。

2.4 其它导致检测假阴性的常见问题 如基质干扰、钩状反应等。

3 COVID-19 抗体检测问题的解决思路

3.1 同时检测针对SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体^[10-11],在接触感染源后的第一个星期左右,IgM和IgG可同时出现阳性。同时检测针对SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体可提高敏感度。

3.2 动态检测SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体感染初期,第一次抗体检测阳性时,在3~7天后再次检测,IgM和IgG水平一般都出现4倍升高。

3.3 建议用不同蛋白(如联用N蛋白和S蛋白)或不同序列的肽段作为包被抗原的试剂盒,进行复查。如为假阳性,两者同时阳性的可能性较小。

3.4 对金标试纸条可能存在的假阳性,可考虑用磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤震荡3~5次;对金标试纸条的假阴性,可考虑将前端含有胶体金的垫片取下,先将试纸条插入血清中进行充分层析。然后将膜条移入新的滤纸,并在洗脱的胶体金中进行层析。

3.5 对于非特异性蛋白吸附造成空间位阻的问题,可在样本中加入较强的去垢剂。一般免疫学检测方法中所用的缓冲液仅含0.05%的吐温-20,不足以去除较强干扰蛋白的吸附。此时可考虑选择1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),甚至RIPA(Radio Immunoprecipitation Assay)缓冲液。这可适用于胶体金试纸条法,但不适用于抗原或抗体被动吸附于固相载体上的免疫学方法。

3.6 怀疑为类风湿因子(RF)等干扰时,可直接检测RF水平;当RF水平较高时,可考虑为RF水平的干扰。

4 结论

血清新型冠状病毒特异性的抗体检测是对疑似新型冠状病毒患者的补充检测。但是如果将抗体检测应用于临床大规模检测时,则需要考虑潜在检测假阳性和假阴性的问题,本文也提出了一些解决思路。相信随着对SARS-CoV-2研究的深入,抗体检测方法和检测性能会愈发完善,从而有可能用于大规模人群的筛查和诊断中,以更好地帮助临床诊断和流行病的回顾性研究。

参考文献:

[1] 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(试行第七版)[EB/OL].(2020-03-4)[2020-03-04].<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>. National Health Commission of the People's Republic of China. The guideline of diagnosis and treatment of COVID-19 (Pilot Release 7) [EB/OL].(2020-03-4)[2020-03-04].<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [2] MEYER B, DROSTEN C, MU LLER M A. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls[J]. Virus Research, 2014, 194: 175-183.
- [3] LU Hongzhou, STRATTON C W, TANG Yiwei. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle[J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(4):401-402.
- [4] 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/OL]. 检验医学与临床, 2020, 17(9): 1161-1163, 1165. LU Yan, JU Jun, LI Dehong. Novelcoronavirus detection rate is improved by combining nucleic acid and serological markers with multiple types of specimens[J/OL]. Laboratory Medicine and Clinic, 2020, 17(9): 1161-1163, 1165.
- [5] 王露莹, 陈品儒, 郑国湾, 等. 新型冠状病毒检测方法的研究进展[J/OL]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 411-416. WANG Luying, CHEN Pinru, ZHENG Guowan, et al. Research progress on detection methods of SARS-CoV-2 [J/OL]. Drugs & Clinic, 2020, 35(3): 411-416.
- [6] GRIFONI A, SIDNEY J, ZHANG Yun, et al. A Sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2[J]. Cell Host & Microbe, 2020, 27(4): 671-680.e2.
- [7] LU Roujian, ZHAO Xiang, LI Juan, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. The Lancet, 2020, 395(10224):565-574.
- [8] REES A R. Understanding the human antibody repertoire[J]. MAbs, 2020, 12(1): 1729683.
- [9] 上海市医学会检验医学分会. 新型冠状病毒核酸和抗体检测临床应用专家共识[J/OL]. 国际检验医学杂志, 2020,41(14):1665-1669. Shanghai Medical Association Laboratory Medicine Branch. Consensus of novel coronavirus nucleic acid and antibody detection for clinical application[J/OL]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020,41(14):1665-1669.
- [10] 郑培明, 崔发财, 张福明, 等. 新型冠状病毒IgM和IgG抗体不同检测方法在新型冠状病毒感染中的临床应用评价[J]. 检验医学, 2020, 35(4):291-294. ZHENG Peiming, CUI Facai, ZHANG Fuming, et al. Clinical evaluation of different detection methods of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in the COVID-19 diagnosis[J]. Laboratory Medicine, 2020, 35(4):291-294.

收稿日期: 2020-06-27 修回日期: 2020-07-06