【学术快报 / Letters】

新型冠状病毒 ELISA 试剂盒灵敏度和特异度评价

李德昌^{1,2}, 张明霞³, 林大川^{2,4}, 胡云龙^{2,4}, 温志华^{1,2},
刘圣泽¹, 徐羽中⁵, 黄开松⁴, 张政³, 陈心春^{2,4}

1) 粤北第二人民医院检验科, 广东韶关 512000; 2) 深圳大学医学部-粤北第二人民医院联合实验室, 广东深圳 518066;
3) 深圳市第三人民医院国家感染性疾病临床研究中心, 广东深圳 518112; 4) 深圳大学医学部基础医学院,
广东深圳 518066; 5) 深圳市宝安区人民医院检验科, 广东深圳 518100

摘要: 探针反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法对呼吸道样品检测灵敏度有限, 血清学检测新型冠状病毒抗体逐渐被用作新型冠状病毒核酸检测的辅助工具. 本研究利用10名健康者、46名结核病患者及57例确诊新型冠状病毒感染者的血清, 对两种新冠病毒IgM酶联免疫检测试剂盒进行评估. 结果显示, 北京酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒对新冠病毒检测的灵敏度和特异度达到87.7%和83.9%, 检测效果较好; 珠海ELISA试剂盒对新冠病毒检测的灵敏度和特异度分别为70.1%和89.2%. 分析ELISA检测结果与患者发病时间发现, 新冠抗体IgM的检测阳性率在发病时间超过14 d的患者群体中, 高于发病时间为0~14 d的群体. 实验结果证明, 新型冠状病毒抗体IgM检测可用于临床新型冠状病毒的诊断, 但也显示两种新型冠状病毒抗体检测酶联免疫试剂盒在灵敏度和特异度方面存在一定的差异.

关键词: 分子生物学; 免疫学; 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 酶联免疫; 临床检测

中图分类号: R18

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2020.03224

Evaluation of the sensitivity and specificity of ELISA kits for the SARS-CoV-2 diagnosis

LI Dechang^{1,2}, ZHANG Mingxia³, LIN Dachuan^{2,4}, HU Yunlong^{2,4},
WEN Zhihua^{1,2}, LIU Shengze¹, XU Yuzhong⁵, HUANG Kaisong⁴,
ZHANG Zheng³, and CHEN Xinchun^{2,4}

1) Department of Clinical Lab, Guangdong North Second People's Hospital, Shaoguan 512000, Guangdong Province, P. R. China

2) Shenzhen University Medical School and Guangdong North Second People's Hospital Joint Laboratory,
Shenzhen 518066, Guangdong Province, P. R. China

3) National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518112,
Guangdong Province, P. R. China

4) School of Basic Medical Science, Shenzhen University, Shenzhen 518066, Guangdong Province, P. R. China

5) Shenzhen Baoan People's Hospital, Department of Clinical Lab, Shenzhen 518100, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Serological method has been used as an auxiliary tool in the clinical severe acute respiratory syndrome

Received: 2020-03-18; Accepted: 2020-03-28

Foundation: Guangdong Provincial Key Laboratory of Regional Immunity and Diseases (2019B030301009)

Corresponding author: Professor CHEN Xinchun. E-mail: chenxinchun@szu.edu.cn

Citation: LI Dechang, ZHANG Mingxia, LIN Dachuan, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of ELISA kits for the SARS-CoV-2 diagnosis [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2020, 37(3): 224-226. (in Chinese)

coronavirus 2 (SARS-CoV-2) diagnosis due to the low sensitivity of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method for respiratory specimens. The serums from 57 confirmed COVID-19 patients, 10 healthy cohorts and 46 tuberculosis patients were employed to determine the sensitivity and specificity of two commercially available enzyme linked immunosorbent (ELISA) kits in their detections of SARS-CoV-2. The sensitivity and specificity of ELISA kit from Beijing company can reach 87.8% and 83.9%, respectively, suggesting a high practical application value. In contrast, the ELISA kit from Zhuhai shows a lower sensitivity (70.1%) but a slightly higher specificity (89.2%). Moreover, a higher detection rate of SARS-CoV-2 IgM is observed in patients that have a longer duration of disease (more than 14 d after onset) than that of people presenting clinical symptoms less than 14 d. Collectively, these results prove the feasibility of SARS-CoV-2 IgM detections by ELISA in the clinical SARS-CoV-2 diagnosis, although these commercially available ELISA kits show different capacities in their diagnosis.

Key words: molecular biology; immunology; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); coronavirus disease 2019 (COVID-19); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); clinical diagnosis

冠状病毒在系统分类学上属套式病毒目(Nidovirale)冠状病毒科(Coronaviridae),具有囊膜,基因组为线性的单股正链核糖核酸病毒^[1].在2019年末新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)疫情爆发前,共有6株冠状病毒导致人类群体感染事件.其中包括2003年在中国爆发的严重急性呼吸综合征和2012在中东地区开始爆发的中东呼吸系统综合征冠状病毒大规模感染事件^[2-3].目前,临床诊断SARS-CoV-2的重要手段是探针反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法,但其检测效率通常只有30%~50%,导致需要多次检测,甚至需提取下呼吸道如肺泡灌洗液才能减少漏检^[4].对新型冠状病毒抗体的检测能提高对新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)的检出率,是新型冠状病毒核酸检测诊断方法的重要辅助方法.本研究利用健康人群、结核病人和已确诊的新型冠状病毒病人的血清,对酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测新冠病人进行了评估.

1 研究对象和方法

1.1 研究对象及样本

本研究共采集10名健康人、46例结核患者和57例新型冠状病毒感染者(以下简称新冠患者)的血液,用于血清学检测.10名健康者血液样品来源于中国深圳市南山区;46例确诊结核患者血液样品来源于深圳市宝安区人民医院和粤北第二人民医院;57例确诊的新冠患者血样为随机招募,均来自深圳市第三人民医院,核酸检测均为阳性.健康者

和结核病患者为对照组,均无报告的新型冠状病毒流行病学史,且利用上海捷诺核酸检测试剂盒检测连续两次为阴性.采集所有参与者外周血5 mL,分别置于含肝素钠的试管中充分混匀,于800g离心10 min制备血清,获得的血清可即时检测或-80℃下保存直至使用.

1.2 ELISA方法检测SARS-CoV-2特异性IgM抗体

本研究评估的新型冠状病毒酶联免疫检测试剂盒购自珠海和北京厂家试剂公司(以下分别简称珠海试剂盒和北京试剂盒).ELISA试剂盒开发的原理是以新型冠状病毒SARS-CoV-2重组抗原(北京)或者抗人IgM μ 链单克隆抗体(珠海)先包被微孔板,随后检测血清中SARS-CoV-2特异性IgM抗体或全部IgM抗体,最后利用酶标记的抗人IgM二抗或酶标记的重组新型冠状病毒抗原,最终检测最后结合的血清中的新型冠状病毒特异性IgM抗体.详细检测步骤、临界值计算和阳性结果判断参阅试剂盒说明书.

1.3 统计分析

所有统计分析均在GraphPad Prism 7软件中进行,采用卡方和费希尔精确检验分析比较不同组间差异.当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义.

2 研究结果

2.1 两种酶联免疫试剂盒的灵敏度和特异度

在对10名健康者、46例结核病患者和57例确诊新冠患者血样检测中,珠海试剂盒分别检出0例、6例假阳性和40例新冠阳性,灵敏度和特异度分别为70.1%和89.2%;北京试剂盒检出结果分别为2例、7例假阳性和50例新冠阳性,灵敏度和

特异度分别为 87.7% 和 83.9% (表 1). 由表 1 此可见, 北京试剂盒对新型冠状病毒检测的敏感性高于珠海试剂盒的, 综合检测效果更好.

2.2 IgM 阳性结果与发病时间关系分析

在对患者发病时间和抗体 IgM 检测结果关系的分析中, 发现珠海试剂盒在检测发病时间超过 14 d 的患者时, IgM 检测的阳性比例 (26/30) 明显高于发病时间为 0 ~ 14 d 的患者 (14/27), 且差异具有统计学意义 (表 2). 另外, 北京试剂盒的检测结果显示, 相对于发病时间为 0 ~ 14 d 的群体 (22/27), 发病时间超过 14 d 的患者的 IgM 检测阳性也高些 (28/30), 但差异在统计学上不显著.

表 1 两种酶联免疫试剂盒检测临床
新冠病人敏感度和特异度评估

Table 1 Sensitivity and specificity of two ELISA kits
in the clinical diagnosis of SARS-CoV-2

试剂盒	10 名健 康对照	46 例结核 患者对照	57 例新 冠患者	敏感 度/%	特异 度/%
	假阳性 例数	假阳性 例数	阳性 例数		
珠海 ELISA	0	6	40	70.1	89.2
北京 ELISA	2	7	50	87.7	83.9

表 2 珠海试剂盒 IgM 检测率与
发病天数关系 ($P < 0.01$)

Table 2 Relation between detection rate by Zhuhai
kit and onset time ($P < 0.01$)

费希尔检验	发病 0 ~ 14 d	发病 > 14 d	总计
阳性	14	26	40
阴性	13	4	17
总计	27	30	57

3 讨 论

决定血清学诊断效果因素有很多, 如检测的抗体类型. IgM 较早于 IgG 抗体产生, 因为 IgM 产生无需同型转换, 且表达会在感染后期下降, 因此, 在特异性方面 IgG 抗体类型检测效果可能会好于 IgM 类型的检测, 但在感染早期 IgM 检测灵敏度可能会更高. 本研究在两种试剂盒检测中, 均在结核患者血样中检测到假阳性, 可能与 IgM 固有的特异

性问题相关. 北京试剂盒最早包被于微孔板的是 SARS-CoV-2 重组 N 抗原, 而珠海试剂盒包被于微孔板的是抗人 IgM μ 链的抗体, 因此, 北京试剂盒第 1 步捕获的只有 SARS-CoV-2 的 N 蛋白特异性 IgM 抗体, 而珠海试剂盒第 1 步捕获的是所有 IgM 抗体, 包括 SARS-CoV-2 各种成分诱导形成的 IgM 抗体. 尽管珠海试剂盒最终显色的也只有 N 抗原的 IgM 抗体, 此差异是否跟两种试剂盒检测灵敏度差异相关需进一步探索. 核酸检测是新型冠状病毒感染确诊的重要方法, 然而, 该方法灵敏度不高、检测时间长、所需设备要求高和操作步骤复杂, 因此 SARS-CoV-2 抗体检测方法逐渐被开发^[5]. 本研究结果确认了对新型冠状病毒抗体 IgM 的检测具有临床新型冠状病毒检测的可行性.

基金项目: 广东省组织器官区域免疫与疾病重点实验室资助项目 (2019B030301009)

作者简介: 李德昌 (1966—), 男, 广东第二中医院副主任医师. 研究方向: 感染科疾病, E-mail: lidechangsg@sina.com

引 文: 李德昌, 张明霞, 林大川, 等. 新型冠状病毒 ELISA 试剂盒灵敏度和特异度评价 [J]. 深圳大学学报理工版, 2020, 37(3): 224-226.

参考文献 / References:

- [1] FEHR A R, PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis [M]. Methods in Molecular Biology, Berlin: German: Springer. 2015, 1282: 1-23.
- [2] ST-JEAN J R, JACOMY H, DESFORGES M, et al. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion [J]. Journal of Virology, 2004, 78 (16): 8824-8834.
- [3] CHAN J F, LAU S K, TO K K, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(2): 465-522.
- [4] WANG Bin, POTTER S J, LIN Yiguang, et al. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(5): 2339-2344.
- [5] LI Zhengtu, YI Yongxiang, LUO Xiaomei, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis [J]. Journal of Medical Virology. (2020-02-27) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25727>.

【中文责编: 晨 兮; 英文责编: 艾 琳】