

研究报告

新型冠状病毒(2019-nCoV) IgM /IgG 抗体
检测试剂的研制及性能评价张赛¹ 向乐¹ 李林海² 李辉军³ 王刚¹ 钱纯巨^{4*}

(1 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司 深圳 518116 2 中国人民解放军南部战区总医院 广州 510010)

(3 华中科技大学同济医学院附属同济医院 武汉 430030 4 华中科技大学生命科学与技术学院 武汉 430074)

摘要 目的: 建立新型冠状病毒(2019 novel coronavirus 2019-nCoV) IgM /IgG 胶体金抗体联合检测试剂的制备方法, 并对检测试剂的性能指标进行评价。方法: 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 分别用刺突蛋白(S蛋白)受体结合域(receptor binding domain, RBD)和核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NP)作为标记抗原, 硝酸纤维素膜上包被鼠抗人IgM单抗(M线)和鼠抗人IgG单抗(G线), 并用二硝基苯酚-牛血清白蛋白(DNP-BSA)和兔抗DNP多抗为独立C线质控系统制备胶体金检测试剂; 比较RBD蛋白和NP蛋白临床测试符合率, 选取较优抗原制备检测试剂, 对试剂交叉、干扰反应性、加速稳定性及临床诊断特异性和灵敏度进行性能评价。结果: RBD蛋白临床测试总符合率98.48%(389/395); NP蛋白临床测试总符合率89.11%(352/395), RBD蛋白总符合率高于NP蛋白。选用RBD蛋白制备检测试剂盒, 与13种常见病病原体抗体阳性样本均无交叉反应; 样本中的甘油三酯、血红蛋白、胆红素、类风湿因子(RF)、人抗鼠抗体(HAMA)、抗核抗体(ANA)对测试结果无干扰。试剂盒50℃加速破坏6周稳定。临床确诊样本及排除样本测试IgM灵敏度为78.31%(65/83), 特异性为98.90%(721/729); IgG灵敏度为92.77%(77/83), 特异性为99.31%(724/729); IgM和IgG联合检测灵敏度为92.77%(77/83), 特异性为98.35%(717/729); 一致性检验Kappa值为0.883 0, $P < 0.05$ 。结论: 2019-nCoV IgM/IgG抗体检测试剂(胶体金法)检测性能的特异性和灵敏度高, 检测速度快, 操作便携, 可作为已有的2019-nCoV核酸检测法的补充手段。

关键词 新型冠状病毒 抗体 胶体金 免疫层析

中图分类号 Q819

新型冠状病毒(2019-nCoV)是人畜共患的正单链RNA病毒, 有包膜, 属冠状病毒科。该科分为 α 、 β 、 δ 和 γ 四个属, 2019-nCoV属于 β 属, 可引起新型冠状病毒肺炎(COVID-19)^[1]。2020年3月3日国家卫生健康委员会发布了《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》^[2], 指出确诊病例在原有核酸检测和测序基

础上增加“血清学检测”作为依据, 即“新型冠状病毒特异性IgM抗体和IgG抗体阳性”或“新型冠状病毒特异性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”也可确诊。目前新型冠状病毒检测技术主要有分子诊断的基因测序技术^[3-4]、荧光定量PCR技术(RT-PCR)^[5-6]、基因编辑技术^[7-8]及血清免疫学检测的胶体金法^[9-10]、化学发光法^[11-12]和酶联免疫吸附ELISA法^[13]。COVID-19确诊病例诊断的“金标准”是病毒核酸的检出, 不过, 受样本类型、样本质量和检测技术等

收稿日期: 2020-06-23 修回日期: 2020-07-07

* 通讯作者 电子信箱: chungeng_qian@hust.edu.cn

方面因素限制,基于核酸的检测存在一定程度“假阴性”,给临床诊断和疫情防控带来较大困难^[14]。血清抗体检测技术具备灵敏度高、特异性强、试剂与方法稳定、安全性高等优点,可以作为2019-nCoV核酸检测阴性疑似病例的补充检测方法,该方法在回顾性流行病学调查也具有重要意义。

研究显示感染2019-nCoV后,人体会在约7d产生针对病毒的免疫球蛋白M(immunoglobulin M,IgM)抗体,约14d左右会产生病毒的免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)抗体^[15]。联合检测IgM和IgG抗体可以监测患者整个疾病过程的抗体表达水平,同时检测IgM和IgG抗体也可以提高检测的阳性率^[9]。目前已上市2019-nCoV抗体检测试剂盒主要选择刺突蛋白(S蛋白)受体结合域RBD蛋白和核衣壳NP蛋白作为标记抗原,选择合适的抗原材料对试剂盒灵敏度及特异性指标有着重要影响。本研究首次采用胶体金免疫层析法系统研究了RBD抗原和NP抗原对试剂盒临床性能的影响,并对试剂盒的性能指标进行了验证,以评估试剂盒在临床应用中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样本来源 在中国人民解放军南部战区总医院测试COVID-19确诊病例血清样本27例,COVID-19排除病例血清样本368例;在华中科技大学同济医学院附属同济医院测试确诊血清样本83例;本实验室收集保存的2017~2018年健康体检人群的血清及血浆(EDTA-2K和枸橼酸钠抗凝剂)样本共计729例。

1.1.2 主要试剂 氯金酸、柠檬酸三钠、碳酸钾、甘油三酯、血红蛋白、胆红素购自Sigma公司(美国);牛血清白蛋白购自Proliant公司(新西兰);海藻糖、吐温20、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾购自国药集团化学试剂有限公司(上海);玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜购自Merck公司(德国);滤血膜、吸水纸、PVC板购自金标生物科技有限公司(上海);类风湿因子RF、人抗鼠抗体HAMA、抗核抗体ANA购自Seracare公司(美国);鼠抗人IgM单抗、鼠抗人IgG单抗购自菲鹏生物有限公司(东莞);DNP-BSA、兔抗DNP多抗购自佰桥瑞景生物科技有限公司(北京);RBD抗原、NP抗原、2019-nCoV质控品为深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司自产;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 胶体金溶液的制备 采用柠檬酸三钠还原法制备金溶液。取1000ml超纯水于加热磁力搅拌器上加热至沸腾,加入2%的柠檬酸三钠9ml,当溶液再次沸腾后,迅速加入1%氯金酸溶液10ml,当溶液颜色变为深红色后继续煮沸5min,关闭加热器,冷却后以超纯水恢复到原体积。用纳米粒度仪测定胶体金颗粒的均直径及Zeta电位,合格的胶体金溶液室温避光保存。

1.2.2 胶体金标记偶合物的制备 分别取100ml胶体金至三个干净的烧杯中,按照优化的标记pH条件,分别加入0.2mol/L碳酸钾2.5ml、0.7ml和0.1ml调整pH,300r/min搅拌10min后分别加入NP蛋白、RBD蛋白、DNP-BSA蛋白各1mg,搅拌15min;分别加入10%BSA 2ml,继续搅拌20min;搅拌结束后,将标记后的胶体金转移至50ml离心管中,设置离心机参数(离心力:25000g,25min,4℃)进行离心。离心结束后,小心拿出离心管,切勿晃动,吸走上清液,收集沉淀,用偶合物稀释液复溶至1ml,4℃避光保存。用纳米粒度仪测定胶体金偶合物颗粒的均直径及Zeta电位。

1.2.3 IgM/IgG抗体联合检测试纸条的制备 将样本垫和偶合物垫分别用样本垫处理液和偶合物稀释液浸泡处理5min,50℃烘干24h。用偶合物稀释液稀释胶体金标记2019-nCoV抗原偶合物(NP蛋白偶合物或RBD蛋白偶合物)和胶体金标记DNP-BSA蛋白偶合物,体积占比分别为15%和8%,用喷金机按6μl/cm喷线,40℃干燥24h。用含0.01mol/L、pH7.4PBS、5%海藻糖的包被液分别稀释鼠抗人IgM单抗、鼠抗人IgG单抗和兔抗DNP多抗浓度为1.5mg/ml、1.0mg/ml和0.8mg/ml,分别作为检测线(IgM线、IgG线)和质控线(C线)捕获抗体包被在硝酸纤维素膜(NC膜)上,50℃烘干24h。将制备好的NC膜、偶合物垫、滤血膜、样本垫及吸水垫依次黏贴在PVC底板上,用切条机裁切为3mm/条,装入检测卡,铝箔袋封装。试纸条结构示意图如图1所示。

1.2.4 标记抗原筛选 分别采用NP蛋白和RBD蛋白作为标记抗原制备检测试纸条,测试COVID-19确诊病例血清样本27例,COVID-19排除病例血清样本368例,比较两种抗原制备检测试剂的灵敏度和特异性。

1.2.5 稳定性测试 选择临床总符合率较好的抗原进行稳定性验证,将制备好的试剂卡置于50℃烘箱,每隔两周用高、低浓度质控品进行测试,每个样本重复测试3次,比较第2周、4周、6周加速破坏试剂与对照试剂(0周)条带显色的差异。

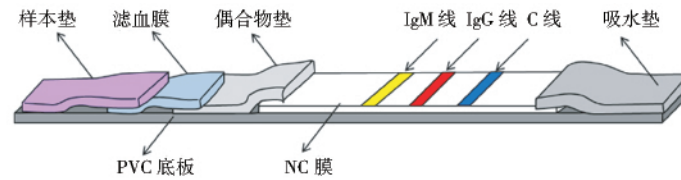


图1 IgM /IgG 抗体联合检测试纸条结构图

Fig. 1 Structure chart of test strip for IgM and IgG antibody combined detection

1.2.6 交叉反应分析 本实验室收集的甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、EB 病毒、巨细胞病毒、风疹病毒、人类免疫缺陷病毒、梅毒螺旋体、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒共 13 种病原体 IgM 或 IgG 抗体阳性血清样本,用试剂卡分别进行检测,观察 IgM 线和 IgG 线条带显色情况。

1.2.7 干扰测试 向高、低质控品中分别添加 10mg/ml 甘油三酯、3mg/ml 血红蛋白、0.4mg/ml 胆红素、1000IU/ml 类风湿因子(RF)、600ng/ml 人抗鼠抗体(HAMA)、500AU/ml 抗核抗体(ANA),以未添加干扰物质的质控品作对照,比较上述干扰物质对试剂条带显色的影响。

1.2.8 临床性能评价 用同一批试剂卡测试 83 例 COVID-19 确诊血清样本及 729 例健康体检人群的血清、血浆(EDTA-2K 和枸橼酸钠抗凝剂)样本。使用 IBM SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析,采用 Kappa 检验 统计研制的新型冠状病毒胶体金抗体检测试剂与临床诊断的一致性。

2 结果

2.1 胶体金及胶体金偶合物粒径和 Zeta 电位分析

采用动态光散射法(DLS)表征胶体金及胶体金偶合物微粒的粒径大小及分布^[16],结果如表 1 和图 2 所示。制备的胶体金平均直径 $26.11 \pm 0.06\text{nm}$,分布系数 PDI 为 0.06 ± 0.01 ,近单分散体系,表明胶体金纳米粒子粒径均一,尺寸分布较窄。Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标,体系稳定与否通常以 Zeta 电位是否大于 $\pm 30\text{mV}$ 为标准^[17],本研究制备的胶体金 Zeta 电位为 $-40.40 \pm 2.01\text{mV}$,表明制备的胶体金溶液稳定性较好。

从表 1 和图 2 中可以看出,NP 蛋白标记后粒径与 RBD 蛋白相比,粒径明显变大,尺寸分布中有大的颗粒出现;与胶体金相比,NP 蛋白、RBD 蛋白、DNP-BSA 蛋白的 Zeta 电位均降低,可能是金纳米颗粒表面吸附蛋白后,电荷量减小的原因,而 NP 蛋白 Zeta 电位仅为 $-21.63 \pm 1.05\text{mV}$,偶合物已处于相对不稳定状态,有聚集趋势。

表 1 胶体金及胶体金偶合物粒径和 Zeta 电位

Table 1 Particle size and zeta potential of colloidal gold and its coupling

	Z-Average (d. nm)	PDI	Zeta potential (mV)
胶体金	26.11 ± 0.06	0.06 ± 0.01	-40.40 ± 2.01
NP 蛋白偶合物	87.78 ± 0.47	0.24 ± 0.01	-21.63 ± 1.05
RBD 蛋白偶合物	33.95 ± 0.52	0.25 ± 0.01	-31.97 ± 0.06
DNP-BSA 蛋白偶合物	40.97 ± 0.31	0.23 ± 0.01	-30.93 ± 0.31

2.2 NP 蛋白与 RBD 蛋白灵敏度和特异性比较

从表 2 中可以看出采用 NP 蛋白作为标记抗原时,IgM 抗体的灵敏度较低,检出率为 62.96%,而 RBD 蛋白为 77.78%;同时 NP 蛋白作为标记抗原时 IgM 抗体的特异性也较差,仅为 90.22%,有近 10%的假阳率,RBD 蛋白检测 IgM 特异性为 99.73%,特异性较好。结果表明,使用 RBD 蛋白作为标记抗原比 NP 蛋白有更

高的 IgM 检测灵敏度和特异性;对于 IgG 抗体检测,RBD 蛋白与 NP 蛋白作为标记抗原的检测灵敏度和特异性差异不大;使用 RBD 蛋白作为标记抗原,IgM 和 IgG 联合检测灵敏度为 92.59%,特异性为 98.91%,总符合率 98.48%,临床测试性能较优,后续采用 RBD 蛋白进行工艺验证及性能评价。

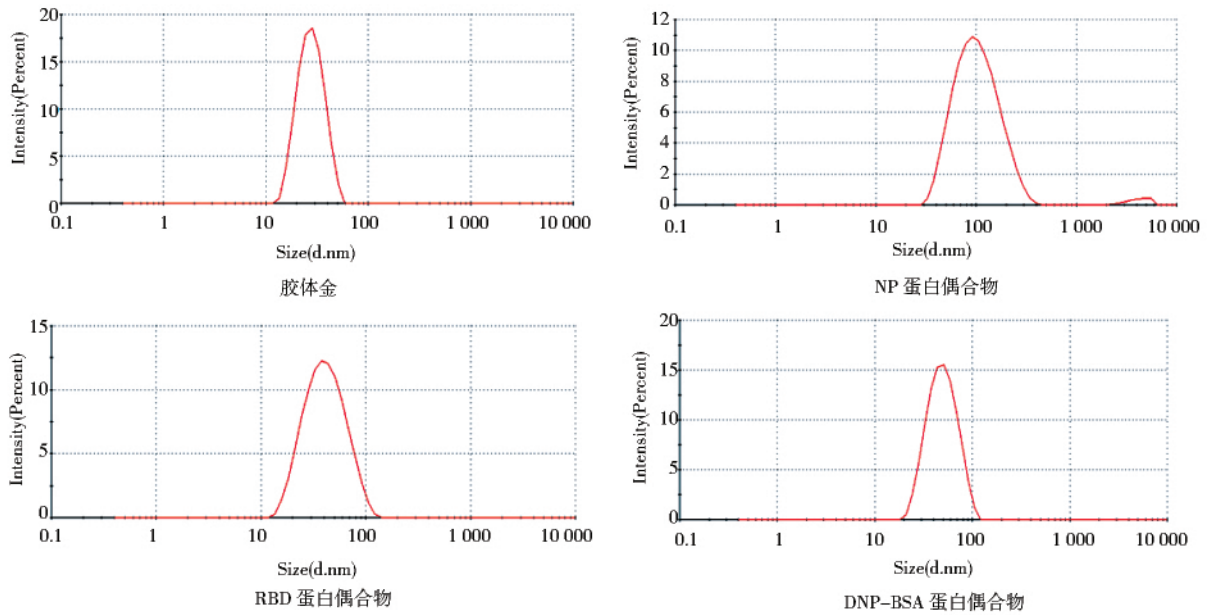


图2 胶体金及胶体金偶合物粒径分布图

Fig.2 Particle size distribution of colloidal gold and its coupling

表2 NP 蛋白与 RBD 蛋白灵敏度和特异性比较

Table 2 Comparison of sensitivity and specificity between NP protein and RBD protein

	IgM		IgG		IgM/IgG 联合	
	NP 蛋白	RBD 蛋白	NP 蛋白	RBD 蛋白	NP 蛋白	RBD 蛋白
灵敏度	62.96% (17/27)	77.78% (21/27)	92.59% (25/27)	92.59% (25/27)	92.59% (25/27)	92.59% (25/27)
特异性	90.22% (332/368)	99.73% (367/368)	96.74% (356/368)	99.18% (365/368)	88.86% (327/368)	98.91% (364/368)
总符合率	88.35% (349/395)	98.23% (388/395)	96.46% (381/395)	98.73% (390/395)	89.11% (352/395)	98.48% (389/395)

Sensitivity = true positive number / (true positive number + false negative number) × 100%; Specificity = true negative number / (true negative number + false positive number) × 100%; Total coincidence rate = (true positive number + true negative number) / total test number × 100%

2.3 加速稳定性

50℃加速稳定性测试结果如表3所示,高、低两个浓度质控品,第0周、2周、4周、6周的IgM和IgG条带显色强度一致。表明,所制备的IgM/IgG抗体检测试剂在50℃环境加速破坏6周稳定。根据CLSI加速稳定性评价程序^[18]及同类产品加速稳定性研究数据,该试剂盒效期预测可达到常温(25℃)18个月。

2.4 交叉反应

如表4所示,甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、EB病毒、巨细胞病毒、风疹病毒、人类免疫缺陷病毒、梅毒螺旋体、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒共13种病原体抗

体阳性血清样本,试剂盒IgM和IgG显色条带均为阴性,无交叉反应,表明试剂的特异性较好。

2.5 干扰测试

干扰测试结果如表5所示,在质控品中分别添加10mg/ml甘油三酯、3mg/ml血红蛋白、0.4mg/ml胆红素、1000IU/ml类风湿因子(RF)、600ng/ml人抗鼠抗体(HAMA)、500AU/ml抗核抗体(ANA),与表3中对照条带显色一致,表明试剂抗干扰能力强。

2.6 临床性能评价

83例COVID-19确诊血清样本及729例健康体检人群的血清、血浆样本临床统计结果如表6所示,IgM/IgG联合检测灵敏度92.77%(95%CI:84.93%~97.30%),

表 3 加速稳定性结果

Table 3 The results of accelerated stability

		0 周		2 周		4 周		6 周	
		IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
质控品 1	1	+	++	+	++	+	++	+	++
	2	+	++	+	++	+	++	+	++
	3	+	++	+	++	+	++	+	++
质控品 2	1	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
	2	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
	3	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+

“+/-” stands for weak positive, “+” stands for positive, and “++” stands for strong positive

表 4 交叉反应结果

Table 4 The results of cross reaction

	2019-nCoV	
	IgM	IgG
甲型流感病毒 IgM 抗体阳性血清	-	-
乙型流感病毒 IgM 抗体阳性血清	-	-
呼吸道合胞病毒 IgM 抗体阳性血清	-	-
腺病毒 IgM 抗体阳性血清	-	-
肺炎支原体 IgG 抗体阳性血清	-	-
肺炎支原体 IgM 抗体阳性血清	-	-
肺炎衣原体 IgG 抗体阳性血清	-	-
肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清	-	-
EB 病毒衣壳抗原 IgG 抗体阳性血清	-	-
EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体阳性血清	-	-
巨细胞病毒 IgG 抗体阳性血清	-	-
巨细胞病毒 IgM 抗体阳性血清	-	-
风疹病毒 IgG 抗体阳性血清	-	-
风疹病毒 IgM 抗体阳性血清	-	-
人类免疫缺陷病毒抗体阳性血清	-	-
梅毒螺旋体抗体阳性血清	-	-
乙型肝炎病毒表面抗体阳性血清	-	-
丙型肝炎病毒 IgG 抗体阳性血清	-	-

“-” stands for negative, no color band

特异性 98.35% (95% CI: 97.14% ~ 99.15%) ,总符合率 97.78% (95% CI: 96.52% ~ 98.68%) 。部分临床测试结果如图 3 所示,阳性样本条带显色均一、阴性样本背景干净。

Kappa 检验一致性较好(Kappa 值 = 0.8830, P < 0.05) ,试验结果表明,本研究研制的新型冠状病毒 IgM/IgG 抗体检测试剂盒灵敏度和特异性良好,与临床

表 5 干扰测试结果

Table 5 The results of interference response

	质控品 1		质控品 2	
	IgM	IgG	IgM	IgG
甘油三酯	+	++	+/-	+
血红蛋白	+	++	+/-	+
胆红素	+	++	+/-	+
RF	+	++	+/-	+
HAMA	+	++	+/-	+
ANA	+	++	+/-	+

“+/-” stands for weak positive, “+” stands for positive, and “++” stands for strong positive

诊断符合率较高,可作为新型冠状病毒感染的有效筛查和诊断指标。

3 讨论

新型冠状病毒也称严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒 2,与 2003 年的 SARS 冠状病毒一样,由 RNA 核酸和蛋白等组成, RNA 容易降解,蛋白衣壳将 RNA 包裹在其中,加上一层由脂质和糖蛋白组成的包膜,从而使 RNA 得到保护。病毒核酸检测是确诊感染的“金标准”,但由于采样时间、部位,试剂质量,实验室质量管理体系等因素的影响,病毒核酸检测的“假阴性”也就无法完全避免。目前一个行之有效的办法,就是补充新型冠状病毒特异性 IgM 和 IgG 抗体检测。检测特异性抗体可以明确患者是否“近期或既往感染过新型冠状病毒”,有助于核酸检测阴性但临床上疑似患者的确诊。抗体检测对临床实验室的操作要求相对于核酸检测要低,可以快速、批量检测,且可以在基层医疗机构进行测试。



图3 临床测试图例(上图为阳性样本,下图为阴性样本)

Fig. 3 The legend of clinical test

The legend of clinical test (the upper picture shows the positive sample, and the lower picture shows the negative sample)

表6 临床性能统计结果

Table 6 Statistical results of clinical performance

	IgM	IgG	IgM/IgG 联合
灵敏度	78.31% (65/83)	92.77% (77/83)	92.77% (77/83) 95% CI: 84.93% ~97.30%
特异性	98.90% (721/729)	99.31% (724/729)	98.35% (717/729) 95% CI: 97.14% ~99.15%
阳性预测值	89.04% (65/73)	93.90% (77/82)	86.52% (77/89) 95% CI: 77.63% ~92.83%
阴性预测值	97.56% (721/739)	99.18% (724/730)	99.17% (717/723) 95% CI: 98.20% ~99.69%
总符合率	96.80% (786/812)	98.65% (801/812)	97.78% (794/812) 95% CI: 96.52% ~98.68%

Sensitivity = true positive number / (true positive number + false negative number) × 100%; Specificity = true negative number / (true negative number + false positive number) × 100%; Positive predictive value = true positive number / (true positive number + false positive number) × 100%; Negative predictive value = true negative number / (true negative number + false negative number) × 100%; Total coincidence rate = (true positive number + true negative number) / total test number × 100%

本研究比较了新型冠状病毒 NP 蛋白和 RBD 蛋白作为标记抗原,对试剂盒灵敏度和特异性的影响,发现 RBD 蛋白对 IgM 抗体检测的灵敏度和特异性都比 NP 蛋白优。NP 蛋白是冠状病毒中产生最早且含量较多

的蛋白质,具有很强的免疫原性,但据报道 NP 蛋白抗体基本上在发病 10d 才开始大量产生,作为早期诊断指标可能存在一定的不足^[19]。袁国勇院士团队从 23 名患者中共收集到 108 份血清样本,对于大多数患者

而言,在出现症状的10天及以后,抗体水平都有所增加,从出现血清阳性反应的时间来看,抗RBD抗体比抗NP抗体更早^[20]。NP蛋白特异性较差,一方面可能是因为NP蛋白等电点(理论pI 10.07)较高,胶体金标记时容易聚集,非特异性吸附增加,这一点在图2 NP蛋白偶合物粒径分布可以看出;另一方面本研究采用的NP蛋白为全长片段,可能与普通冠状病毒的NP蛋白或其他干扰物质有一定的交叉反应性。

本研究所制备的试剂盒IgM的灵敏度稍低(78.31% 65/83),可能与发病及样本采集时间有关,本研究所用确诊样本并未获得该信息,对于早期或恢复期患者IgM浓度可能较低。但IgM/IgG联合检测灵敏度达92.77%(77/83),特异性为98.35%(717/729),总符合率97.78%(794/812),试剂盒灵敏度和特异性良好,与临床诊断符合率较高。本研究也采用加速破坏试验研究了试剂盒的稳定性,50℃加速破坏6周稳定,实时稳定性会持续进行验证。试剂盒交叉反应及干扰测试结果表明,试剂的特异性较好,与常见的病原体抗体均无交叉反应,抗样本内源性干扰能力强。但后续仍需进一步验证试剂盒检测的抗体与其他冠状病毒如SARS、OC43、HKU1、229E、NL63是否有交叉反应。研究发现,2019-nCoV感染患者的唾液核酸检测阳性率高达92%,通过病毒培养在唾液中可检测到活病毒^[21]。本研究开发的试剂盒目前可用于检测血清、血浆以及全血标本中的病毒抗体,后期将会拓展到唾液、尿液等无创标本的检测。

综上所述,本研究开发的2019-nCoV IgM/IgG抗体检测试剂盒(胶体金法)具有便捷、快速,及灵敏度和特异度高的优点。为了缩短检测窗口期,提高阳性检出率,在后续的临床实践研究中,可采用核酸和抗体联合检测的方式进行检测诊断,这对于新型冠状病毒感染的诊断和防控具有重要的意义。

致谢 感谢深圳市龙岗区科技发展资金“新型冠状病毒感染应急防治”科技专项(LGKXCXZX2020012)的支持。

参考文献

- [1] Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 1-6.
- [2] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 新型冠

状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版). [2020-03-03]. http://www.gov.cn:8080/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm.

Office of National Health Commission, Office of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Diagnosis and treatment scheme of new coronavirus pneumonia (Trial 7th edition). [2020-03-03]. http://www.gov.cn:8080/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm.

- [3] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [4] Paraskevis D, Kostaki E G, Magiorkinis G, et al. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 79: 104212.
- [5] Chu D K W, Pan Y, Cheng S M S, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*, 2020, 66(4): 549-555.
- [6] Corman V M, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, 25(3): 1-8.
- [7] An J H, Liao X J, Xiao T Y, et al. Clinical characteristics of the recovered COVID-19 patients with re-detectable positive RNA test. *medRxiv preprint*. [2020-03-30]. <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20044222>.
- [8] Broughton J P, Deng X D, Yu G X, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 870-874.
- [9] 李晖,李咏茵,张志高,等. 2019新型冠状病毒抗体胶体金检测方法的建立与临床性能评价. *中华传染病杂志*, [2020-03-03]. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn311365-20200221-00101>.
Li H, Li Y Y, Zhang Z G, et al. Establishment and clinical performance evaluation of 2019 novel coronavirus antibody colloidal gold detection method. *Chin J Infect Dis*, [2020-03-03]. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn311365-20200221-00101>.
- [10] Li Z T, Yi Y X, Luo X M, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, 2020, <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>.
- [11] 刘雄,柯跃华,刘威,等. 423例新型冠状病毒肺炎患者血清抗体检测结果与临床诊断应用价值研究. *中华实验和临床病*

- 毒学杂志, [2020-03-30]. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112866-20200313-00064>.
- Liu X, Ke Y H, Liu W, et al. Analysis of the Serum antibody test results and clinical diagnostic value in patients with new coronavirus pneumonia. *Chinese J Exp Clin Virol*, [2020-03-30]. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112866-20200313-00064>.
- [12] Long Q X, Liu B Z, Deng H J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 2020, <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>.
- [13] Okba N M A, Müller M A, Li W T, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv preprint, 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>.
- [14] Ai T, Yang Z, Hou H, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. *Radiology*, 2020, 26: 200642.
- [15] Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579: 270-273.
- [16] Jans H, Liu X, Austin L, et al. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (22): 9425-9432.
- [17] Hunter R J. Zeta potential in colloid science: principles and applications. London: Academic Press, 1982.
- [18] CLSI. EP25-A Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents; Approved Guideline. 2010. [2020-05-20]. https://clsi.org/media/1424/ep25a_sample.pdf.
- [19] 谭明凯, 区静怡, 黄颖, 等. 新型冠状病毒3种抗体试剂盒的性能评估及临床应用初探. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2020, 40(4): 250-255.
- Tan M K, Ou J Y, Huang Y, et al. Performance evaluation and clinical application of three antibody test kits for novel coronavirus. *Chin J Microbiol Immunol*, 2020, 40(4): 250-255.
- [20] 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. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, 20 (5): 565-574.
- [21] To K K, Tsang O T, Yip C C, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis*, Feb 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.

Development and Performance Evaluation of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for 2019 Novel Coronavirus Infection

ZHANG Sai¹ XIANG Le¹ LI Lin-hai² LI Hui-jun³ WANG Gang¹ QIAN Chun-gen⁴

(1 Shenzhen YHLO Biotech Co., Ltd., Shenzhen 518116, China)

(2 General Hospital of Southern Theater Command, Guangzhou 510010, China)

(3 Tongji Hospital affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

(4 College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective: To establish a colloidal gold technique assay for the rapid detection of immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) antibodies against 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and to evaluate its clinical performance. Methods: The colloidal gold was prepared by trisodium citrate reduction. The receptor binding domain (RBD) of spike protein and nucleocapsid protein (NP) were used as marker antigen. The nitrocellulose membrane was coated with mouse anti human IgM monoclonal antibody and mouse anti human IgG monoclonal antibody, and the detection reagent was prepared by using dinitrophenol-bovine serum albumin (DNP-BSA) and rabbit anti DNP polyclonal antibody as independent quality control. By comparing the clinical coincidence rate of RBD protein and NP protein, the better antigen was selected to prepare the detection reagent, and the performance of cross reactivity, interference reactivity, accelerated stability, specificity and sensitivity of clinical diagnosis were evaluated. Results: The total coincidence rate of RBD protein was 98.48% (389/395),

and that of NP protein was 89.11% (352/395) . There were no cross reaction with antibody positive samples of 13 common pathogens. Triglyceride , hemoglobin , bilirubin , rheumatoid factor (RF) , human anti mouse antibody (HAMA) and antinuclear antibody (ANA) in the samples did not interfere with the test results. The kit was stable after 6 weeks accelerated at 50°C. The sensitivity of IgM was 78.31% (65/83) , the specificity was 98.90% (721/729) , the sensitivity of IgG was 92.77% (77/83) , the specificity was 99.31% (724/729) , the sensitivity of IgM and IgG combined detection was 92.77% (77/83) , the specificity was 98.35% (717/729) , the kappa consistency test had a kappa value of 0.883 0 ($P < 0.05$) . Conclusion: The 2019-nCoV IgM/IgG antibody detection reagent (colloidal gold method) has the advantages of high specificity and sensitivity , fast detection speed and portable operation , which can be used as a supplementary method for the existing 2019-nCoV nucleic acid detection method.

Key words Novel coronavirus Antibodies Colloidal gold Immunochromatography