·生物医药前沿·

新型冠状病毒中和抗体胶体金测试卡检测不同人群中和抗体的可行性分析

周志军[1],彭　焱[1],纪德铭[1],张　勇[2],冯　璐[1],李陶敬[2],夏冬梅[1],胡　勇[1],李策生[1]
(1 国药集团武汉血液制品有限公司科研开发部,武汉 430207;
2 北京天坛生物制品股份有限公司研发中心,北京 100024)

[**摘要**] **目的**:比较2种不同原理制备的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)中和抗体胶体金测试卡与SARS-CoV-2假病毒中和实验的相关性,评估半定量的中和抗体胶体金测试卡用于不同人群的SARS-CoV-2中和抗体检测的可行性。**方法**:分别采用厂家A胶体金测试卡(双抗原夹心法)、厂家B胶体金测试卡(竞争阻断法)和SARS-CoV-2假病毒中和法进行检测,比较这2种胶体金方法与中和实验的相关性和敏感度;在确定了测试卡厂家后,检测新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情暴发前制备的静注人免疫球蛋白及特异性免疫球蛋白,考察其特异性;对ELISA高稀释倍数新冠疫苗免疫后血浆进行原倍和稀释品检测,判断是否有hook效应;检测不同ELISA稀释倍数档位的单份免疫后血浆,判断阳性率,观察色度变化;将ELISA低稀释倍数血浆按照比色卡筛选$120NT_{50}$和$300NT_{50}$这2个档位血浆,制备混浆,比较胶体金测试卡与ELISA和中和抗体的相关性。**结果**:厂家A和厂家B对英国国家生物制品标准化和质量控制研究所(NIBSC)第1代国际标准品20/136(抗SARS-CoV-2人免疫球蛋白国际标准品)的检测限分别为0.612 5和5 IU·mL^{-1};对不同档位的混浆(新冠病毒疫苗免疫后血浆及COVID-19康复者恢复期血浆)的检测结果与中和抗体效价相关性好,检测ELISA高稀释倍数(10 000以上)新冠病毒疫苗免疫后血浆未出现hook效应;不同ELISA稀释倍数的单份血浆的阳性率在稀释倍数160以上达到100%,但是色度深浅不一,在稀释倍数640以上色度均一性较高,且色度随着ELISA稀释倍数增高整体逐渐变深。按照比色卡色度筛选的Ppool $120NT_{50}$和Ppool $300NT_{50}$与中和抗体效价接近。**结论**:采用双抗原夹心法的厂家A中和抗体测试卡检测COVID-19康复者恢复期血浆和新冠病毒疫苗免疫后血浆的结果与假病毒中和实验效价的相关性优于采用竞争抑制法的厂家B产品及间接ELISA,且检测线的色度深浅与中和抗体水平正相关,可半定量检测用于不同人群的中和抗体筛查。

[**关键词**] 新型冠状病毒;中和抗体胶体金测试卡;假病毒中和实验效价;ELISA稀释倍数;检测限;免疫后血浆;康复者恢复期血浆
[**中图分类号**] R974　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003－3734(2021)19－1775－08

The feasibility analysis of SARS-CoV-2 neutralizing antibody colloidal gold test card for the detection of neutralizing antibodies in different populations

ZHOU Zhi-jun[1], PENG Yan[1], JI De-ming[1], ZHANG Yong[2], FENG Lu[1], LI Tao-jing[2], XIA Dong-mei[1], HU Yong[1], LI Ce-sheng[1]
(1 *Sinopharm Wuhan Plasma-derived Biotherapies Co., Ltd., Wuhan* 430207, *China*;
2 *Beijing Tiantan Biological Products Co., Ltd., Beijing* 100024, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To compare the correlation between the results of SARS-CoV-2 neutralizing antibody colloidal gold test cards prepared by two different principles and the SARS-CoV-2 pseudovirus neutralization experiment, and to evaluate the feasibility of the neutralizing antibody colloidal gold test card for the SARS-CoV-2

[**基金项目**] 国家科技部重点专项资助项目(2020YFC0841800);2019-nCoV染恢复期患者特异血浆和特异免疫球蛋白制备
[**作者简介**] 周志军,研究员,目前主要从事诊断试剂评估及生物制品检测方法的建立。E-mail:2586066803@qq.com。共同第一作者:李陶敬,硕士研究生,主要从事血液制品研发及临床。E-mail:litaojing@sinopharm.com。
[**通讯作者**] 胡勇,硕士研究生,主要从事血液制品研发。E-mail:huyong1@sinopharm.com。李策生,研究员,主要从事血液制品研发制造。联系电话:(027)86636770,E-mail:licesheng@sinopharm.com。

neutralizing antibody detection in different populations. **Methods**: Two kinds of SARS-CoV-2 neutralizing antibody colloidal gold test cards using double antigen sandwich method (manufacturer A) and competitive blocking method (manufacturers B) were used to detect the samples with SARS-CoV-2 neutralizing antibody titers. Detection sensitivity and the correlation between the two methods and the neutralization experiment were compared. The intravenous human immunoglobulin and specific immunoglobulin prepared before the outbreak of COVID-19 epidemic were detected to investigate the specificity of the eligible test card. In order to determine whether there is a hook effect, individual immunized plasma samples of high ELISA titers were tested with series of dilutions and original dilution. Single post-immunized plasma samples were detected with different ELISA titers, the positive rates were determined and the color changes were observed. Single post-immunized plasma samples were screened in the low-dilution area of ELISA according to chromaticity of $120NT_{50}$ and $300NT_{50}$ on the colorimetric card to prepare pooled plasma. The results were compared with the currently used indirect ELISA method. **Results**: The detection limits of manufacturers A and B for the first-generation NIBSC international standard 20/136 (anti-SARS-CoV-2 human immunoglobulin international standard) were 0.612 5 and 5 IU·mL^{-1}, respectively. The results of different titers of pooled plasma (both of post-immunization with SARS-CoV-2 vaccine and COVID-19 convalescence plasma) have a good correlation with the neutralizing antibody titer. The post-immunization plasma with high ELISA dilutions (above 10 000) did not show hook effect. The positive rate of individual plasma of different ELISA dilution levels reached 100% when the dilution was above 160, and the uniformity of the chromaticity was higher when the dilution level was above 640. The overall chromaticity became darker as the ELISA dilution increased. The chromaticities of Ppool $120NT_{50}$ and Ppool $300NT_{50}$ screened according to the colorimetric chart were close to the neutralizing antibody titers. **Conclusion**: The correlation between the results of the manufacturer A neutralizing antibody test card using the dual antigen sandwich method to detect SARS-CoV-2 neutralizing antibody in convalescent plasma and post-immunization plasma and the titer of the pseudovirus neutralization experiment is better than that of the manufacturer B product using the competitive inhibition method and indirect ELISA. And the color brightness of the detection line is positively correlated with the level of neutralizing antibody, which can be used for preliminary screening of neutralizing antibody in different populations.

[**Key words**] SARS-CoV-2; neutralizing antibody colloidal gold test card; pseudovirus neutralization test titer; ELISA dilution; detection limit; post-immunization plasma; convalescent plasma

国药集团武汉血液制品有限公司(以下简称武汉血制公司)从新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情暴发初期就开始使用 COVID-19 康复者恢复期血浆研制静注 COVID-19 人免疫球蛋白,但其原料血浆来源稀缺且不可持续[1]。当前国内新型冠状病毒疫苗(以下简称为新冠病毒疫苗)已陆续获得附条件批准上市,其安全性和有效性已有大量数据支撑[2-4],使得采用新冠病毒疫苗免疫后健康人血浆大规模制备静注 COVID-19 人免疫球蛋白成为可能。选择合适检测方法筛选含高滴度抗新型冠状病毒(SARS-CoV-2,曾称为 2019-nCoV)中和抗体的新冠病毒疫苗免疫后血浆尤为重要,在早期市场上没有中和抗体检测试剂盒的情况下,武汉血制公司测试了 5 种基于 SARS-CoV-2 病毒刺突蛋白 S 的受体结合域(recombinant receptor binding domain, RBD) IgG 检测试剂盒,对其检测新冠病毒疫苗免疫后血浆的适用性进行研究,并筛选确定 2 种质量符合要求的试剂盒建立定量检测方法,经验证后可用于新冠病毒疫苗免疫后血浆的 IgG 检测。虽然特异性 IgG 抗体水平在一定程度上能代表中和抗体水平,但是本研究发现 ELISA 稀释倍数相同的新冠病毒疫苗免疫后血浆中和抗体水平低于 COVID-19 康复者恢复期血浆的中和抗体水平,虽然相同来源的血浆其 ELISA 稀释倍数与中和抗体效价呈正相关,但这提示间接 ELISA 检测的 IgG 结果并不适用于不同来源血浆之间的新冠中和抗体比较,也不利于对不同人群的中和抗体水平进行统一的评判,因此寻找一个与中和抗体相关性更好的快速检测方法尤为重要。

COVID-19 疫情暴发后,我国迅速研制 SARS-CoV-2 的核酸检测试剂和抗体快速检测试剂,其中胶体金检测卡的操作简单,无需专用设备,不受场地人员限制,还具有成本低、快速出结果等优势[5]。早期的新冠病毒 IgM/IgG 抗体检测测试卡(如胶体金法)采用的间接测试法,检测人血清、血浆和指尖全血样本中的抗体,均为定性检测试剂[6],只能作为新冠病毒感染的辅助手段,并未在国内广泛使用。

随着技术升级和对新冠病毒的深入了解,这些抗体快速检测试剂的质量已有大幅提升,抗体检测已由IgM/IgG 抗体升级到中和抗体检测,主要用于疫苗免疫后效果观察,其检测结果偏于中和抗体水平较低的区间,且为定性检测。而武汉血制公司制备静注 COVID-19 人免疫球蛋白所需要的原料血浆是中和抗体水平较高的区间,且需定量检测。目前已筛选 2 种采用不同检测原理制备的新冠病毒中和抗体测试卡产品,比较其测试结果与假病毒中和实验结果的相关性,并就其用于不同人群的中和抗体检测的可行性进行了探讨。

材料与方法

1 测试卡和检测样品

1.1 测试卡 测试卡 A 为厂家 A 生产的 Huian V-Pass® SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Rapid Test (Colloidal Gold),货号:208-220,批号:210401。测试卡 B 为厂家 B 生产的 Lungene COVID-19 Neutralization Rapid Test Cassette(WB/S/P),批号:S202107074。

1.2 检测样品 抗 SARS-CoV-2 人免疫球蛋白 WHO 第 1 代国际标准品[英国国家生物制品标准化和质量控制研究所(NIBSC),编号:20/136]。

COVID-19 康复者恢复期血浆样品包括:按照不同 ELISA 稀释倍数分档的混合血浆 Rpool 160(ELISA 稀释倍数 160 ~ 320 血浆 40 份混合)、Rpool 320(ELISA 稀释倍数 320 ~ 640 血浆 40 份混合)、Rpool 640(ELISA 稀释倍数 640 ~ 1280 血浆 65 份混合)、Rpool 1280(ELISA 稀释倍数 1 280 ~ 2 560 血浆 7 份混合)。

新冠病毒疫苗免疫后血浆样品包括:按照不同 ELISA 稀释倍数分档的混合血浆 Ppool 160(ELISA 稀释倍数160 ~ 320 血浆 85 份混合)、Ppool 320(ELISA 稀释倍数 320 ~ 640 血浆 90 份混合)、Ppool 640(ELISA 稀释倍数 640 ~ 1 280 血浆 86 份混合)、Ppool 1280(ELISA 稀释倍数 1 280 ~ 2 560 血浆 86 份混合);ELISA 稀释倍数在 160 ~ > 100 000 的单份血浆;Ppool 120NT_{50}(胶体金比色卡判定结果在 120NT_{50} ~ 300NT_{50}血浆 75 份)、Ppool 300NT_{50}(胶体金比色卡判定结果在 > 300NT_{50}血浆 74 份混合)。

COVID-19 疫情暴发前制备的人免疫球蛋白产品:破伤风人免疫球蛋白(批号:20191102)、狂犬病人免疫球蛋白(批号:20200201)、乙肝免疫球蛋白(批号:20190701)、静注人免疫球蛋白(批号:201801001,201801003,202001002)。

2 SARS-CoV-2 中和抗体胶体金检测方法及判断标准

2.1 厂家 A 采用免疫胶体金抗原夹心法 先将血清/血浆样本或者稀释品(可在孔外用生理盐水稀释到所需浓度)10 μL 滴加至加样孔(S)内,随后滴加样本缓冲液 2 滴(约 60 μL)至加样孔(S)内。加样后,15 min 内取比色卡与检测卡反应窗内 C 线、T 线呈色目测判读结果。15 min 以后判读结果视作无效。反应窗内同时显示 T 线和 C 线,判为阳性。反应窗内仅显示 C 线,判为阴性。

2.2 厂家 B 采用免疫胶体金竞争阻断法 血清/血浆样本或者稀释品(可在孔外用生理盐水稀释到所需浓度)25 μL 滴加至加样孔(S)内,随后滴加样本缓冲液 1 滴(约 35 μL)至加样孔(S)内。加样后,15 min 内目测判读结果。只有 C 线显色或者 T 线显色浅于 C 线判为阳性,T 线等于或浓于 C 线判为阴性。

3 SARS-CoV-2 假病毒中和抗体检测方法

取样品稀释至一定浓度,并进行 2 倍系列稀释,使之落在线性范围内。取稀释样品置于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL,加入一定工作滴度的假病毒液,混合后于 37 ℃孵育 1 h。将 Huh-7 细胞用胰蛋白酶消化成单个细胞悬液后,接种上述 96 孔细胞培养板,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养,24 h 后进行化学发光检测。以上检测由武汉血制公司完成。

4 测试卡 A 和测试卡 B 的灵敏度检测

将 2 种测试卡按照各自的反应模式检测 NIBSC20/136。在孔外系列稀释后上样,判断测试卡的检测限。根据结果确定测试卡厂家进行后续实验。

5 测试卡 A 的特异性

将由 COVID-19 疫情暴发前采集的血浆制备的静注人免疫球蛋白和特异性免疫球蛋白原倍上样检测,判断阴阳性。

6 测试卡 A 检测不同来源不同档位混合血浆检测结果及与 ELISA 方法的符合率

将免疫后血浆的混浆 Ppool 160,Ppool 320,Ppool 640,Ppool 1280 和 COVID-19 康复者恢复期血浆的混浆 Rpool 160,Rpool 320,Rpool 640,Rpool 1280 原倍上样进行检测,判断阴阳性,观察 T 线色度变化。

7 测试卡 A 检测单份免疫后血浆

将 ELISA 稀释倍数 5 000 以上的单份血浆原倍上样,观察测试卡是否有 hook 效应;将 ELISA 稀释

倍数 10 000 以上的单份血浆进行 10 倍系列稀释，确定其检测限；从 ELISA 稀释倍数 <160，160 ~320，320 ~640，640 ~1 280，>1 280 分档血浆中各取不少于 10 份的单份血浆进行检测，观察阳性率和 T 线色度变化；比较胶体金与 ELISA 检测的符合度和相关性。

8　胶体金测试卡进行半定量结果判定

取免疫后血浆，按照附带比色卡色度 60NT_{50}，120NT_{50}和 300NT_{50}判定单份免疫后血浆 NT_{50}结果，选取 >120NT_{50}和 >300NT_{50}这 2 档色度制备 Ppool 120NT_{50}和 Ppool 300NT_{50}混合血浆。

用比色卡判定内控参考品及混浆 Ppool 120NT_{50}和 Ppool 300NT_{50}的色度，并进行假病毒中和检测，评估胶体金测试卡半定量检测应用于血浆筛查可行性。

结　　果

1　假病毒中和抗体的检测结果

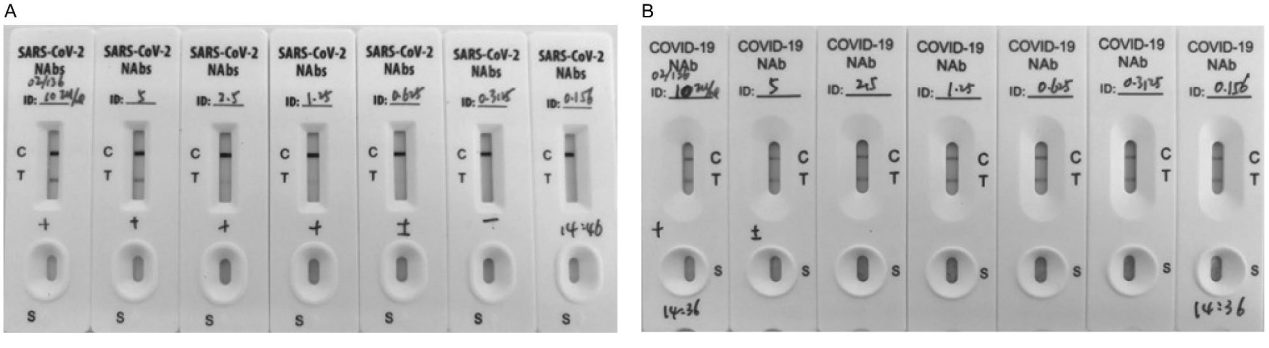
不同来源混浆的 SARS-CoV-2 假病毒中和抗体检测结果见表 1，结果显示 Ppool 640 与 Rpool 160 的中和抗体水平相当，Ppool 120NT_{50}与 Ppool 320 相当，Rpool 320 与 Ppool 300NT_{50}相当。

表 1　不同来源混合血浆的 SARS-CoV-2 假病毒中和检测结果

血浆来源	样本编号	假病毒中和抗体浓度/IC_{50}
免疫后血浆	Ppool 160	27
	Ppool 320	53
	Ppool 640	106
	Ppool 1280	292
	Ppool 120NT	66
	Ppool 300NT	259
康复者恢复期血浆	Rpool 160	96
	Rpool 320	190
	Rpool 640	474
	Rpool 1280	596

2　2 种测试卡检测 NIBSC 20/136 比较检测限

图 1A 为测试卡 A 的结果，T 线颜色与抗体水平正相关，检测限在 0.625 IU·mL^{-1}；图 1B 为测试卡 B 的结果，T 线颜色与抗体水平负相关，只有 C 线或者 T 线浅于 C 线判为阳性，故判断其检测限在 5 IU·mL^{-1}，敏感度测试卡 A 远高于 B。



A：测试卡 A 结果；B：测试卡 B 结果；+：明显阳性；±：弱阳性；−：阴性

图 1　2 种测试卡检测 NIBSC 20/136 的系列稀释品

3　测试卡 A 检测 COVID-19 疫情暴发前生产的静注人免疫球蛋白及特异性免疫球蛋白的结果

COVID-19 疫情暴发前已制备的免疫球蛋白产品有：破伤风人免疫球蛋白、狂犬病人免疫球蛋白、乙肝免疫球蛋白、静注人免疫球蛋白。所有样品检测结果均为阴性，说明胶体金测试卡特异性良好。结果见图 2。



图 2　厂家 A 测试卡特异性结果

4　测试卡 A 检测不同 ELISA 稀释倍数档位的混浆样品

图 3A 为 COVID-19 康复者恢复期血浆的不同档位混浆检测结果，图 3B 为免疫后血浆不同档位的混浆检测结果。结果显示相同来源混浆系列的 T 线色度与中和抗体及 ELISA 稀释倍数正相关，不同来源混浆即使有同样的 ELISA 稀释倍数，但是 COVID-19 康复者恢复期血浆的中和抗体效价高于免疫后血浆，胶体金测试卡的结果与中和抗体结果相关性更好，例如 Rpool 80 色度与 Ppool 320 接近。

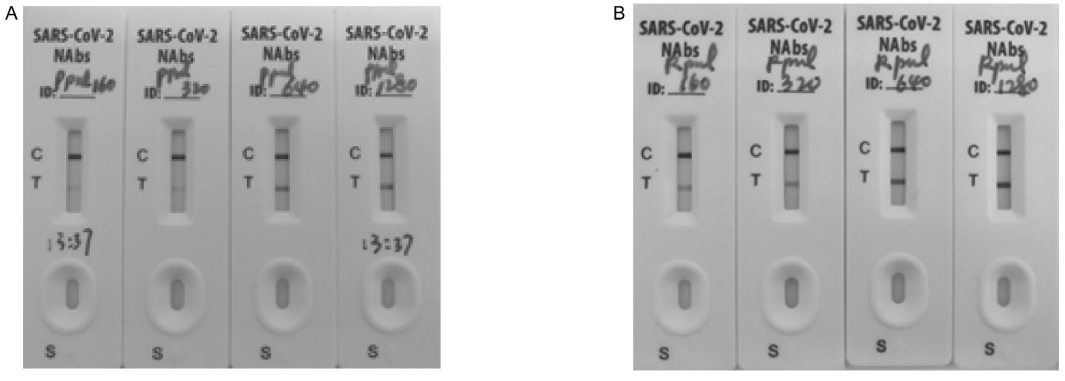


图 3　测试卡 A 检测免疫后不同稀释倍数档位的混合血浆

5　考察测试卡 A 检测单份高 ELISA 稀释倍数的免疫后血浆是否有 hook 效应

首先检测 ELISA 稀释倍数在 5 000 以上的单份血浆 7 份，发现 T 线色度随 ELISA 稀释倍数升高逐步加深，未出现 hook 效应，结果见图 4。随后对 ELISA 稀释倍数 10 000 以上的单份血浆进行 10 倍系列稀释品后检测，结果显示 ELISA 稀释倍数 10 000，20 000 和 30 000 各一份的单份血浆检测限为 100 倍稀释阳性，ELISA 稀释倍数 50 000 的单份血浆检测限为 1 000 倍稀释阳性，ELISA 稀释倍数 100 000 以上的单份血浆检测限为 2 000 倍稀释阳性，T 线色度在整个检测范围内与 ELISA 稀释倍数正相关，结果见表 2。

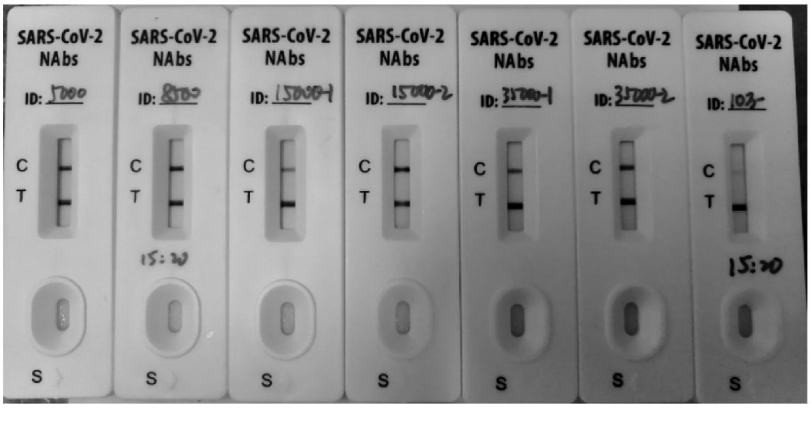


图 4　厂家 A 检测 ELISA 稀释倍数 >5 000 的单份免疫后血浆结果

表 2　测试卡与 ELISA 稀释倍数的符合率

ELISA 稀释倍数	Hook 效应	胶体金稀释倍数	胶体金结果解释
>5 000	未出现	—	—
>10 000	未出现	100	样本 100 倍稀释为阳性，1 000 倍稀释为阴性
>20 000	未出现	100	样本 100 倍稀释为阳性，1 000 倍稀释为阴性
>30 000	未出现	100	样本 100 倍稀释为阳性，1 000 倍稀释为阴性
>50 000	未出现	1 000	样本 1 000 倍稀释为阳性，1 0000 倍稀释为阴性
>100 000	未出现	2 000	样本 2 000 倍稀释为阳性，2 0000 倍稀释为阴性

hook 效应是指因抗体浓度太高而发生假阴性的现象，如发生应表现为 T 线变浅

6 测试卡 A 检测不同 ELISA 稀释倍数的单份免疫后血浆

ELISA 稀释倍数 <160 的单份血浆阳性率为 2/10，稀释倍数 160 ~ 320 的单份血浆阳性率 10/10，有 3 份 T 线较弱，稀释倍数 320 ~ 640 的阳性率 10/10，T 线明显，色度有差异，稀释倍数 640 以上的 T 线明显，色度基本均一。色度随着 ELISA 稀释倍数增高整体逐渐变深。结果见表 3。

表 3 测试卡与 ELISA 稀释倍数的符合率

ELISA 分档结果	胶体金测试	T 线颜色深浅分布/份			
	阳性份数/测试份数(阳性率/%)	无颜色	浅色	较深	深
<160	2/10(20)	8	2	0	0
160 ~ 320	10/10(100)	0	3	7	0
320 ~ 640	10/10(100)	0	0	8	2
640 ~ 1 280	10/10(100)	0	0	2	8
>1 280	10/10(100)	0	0	0	10

7 按照测试卡附带比色卡判定 3 档血浆

按照比色卡上 60NT_{50}，120NT_{50} 和 300NT_{50} 这 3 个色度对 ELISA 低稀释倍数的单份血浆评判，结果见表 4，ELISA 稀释倍数越高，测试卡的符合率越高。

表 4 测试卡与 ELISA 稀释倍数的符合率

ELISA 稀释倍数	总份数 (n)	阴性		>60NT_{50}		>120NT_{50}		>300NT_{50}	
		数量(n)	比例/%	数量(n)	比例/%	数量(n)	比例/%	数量(n)	比例/%
<160	23	11	47.8	6	26.1	6	26.1	0	0
160 ~ 320	96	0	0	9	9.4	64	66.7	23	23.9
320 ~ 640	56	0	0	0	0	5	8.9	51	91.1

8 测试卡 A 的比色卡判定 NT_{50} 混浆

图 5 为按照比色卡判定的单份血浆混和后混浆结果，Ppool 120NT_{50} 和 Ppool 300NT_{50} 混浆色度基本与比色卡的色度一致，假病毒中和活性结果分别为 66IC_{50} 和 259IC_{50}，说明测试卡检测中和抗体结果与假病毒中和实验结果相关，按照比色卡色度判读血浆中和抗体效价可行，即测试卡 A 可用于不同来源血浆的中和抗体的半定量检测。

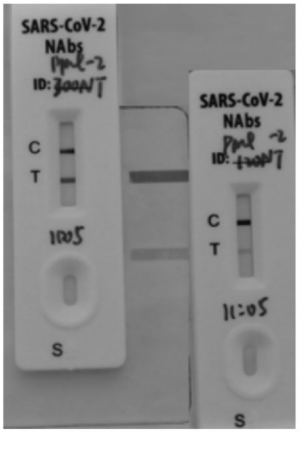


图 5 测试卡 A 附带的比色卡判定免疫后血浆结果

讨 论

目前国内 SARS-CoV-2 中和抗体检测主要是真病毒中和实验和假病毒中和实验，但是这 2 种方法对设备厂房实验室条件和人员素质要求极高，检测成本也高，时间长，且变异系数大，并不适合大规模中和抗体筛查。随后出现的间接 ELISA 检测在相同来源的血浆中与中和实验具有一定相关性，但是 COVID-19 康复者恢复期血浆和免疫后血浆 2 个来源不同的系列中，同样的 ELISA 稀释倍数却有相差极大的中和抗体效价，因此提示我们 ELISA-IgG 检测不能用于不同来源血浆之间的中和抗体水平的比较。中和抗体被认为是对抗病毒的有效抗体。虽然免疫后中和抗体水平高低不能完全代表对于人群的保护效果，而在于再次接触病毒后免疫应答的程度，但是高中抗体水平可能意味着更长久的保护力。因此比较在不同人群(比如 COVID-19 康复者、疫苗免疫后人群)的中和抗体是对疫苗的研发具有启示有意义的，也可以为疫情防控政策制定、加强免疫政策制定提供数据支撑。

定性检测用的中和抗体胶体金试剂，在其说明

书中标示了性能特性,包括检测限即敏感度,样品类型兼容性即血浆、血清和全血的使用方式,交叉反应即特异性包含对不同病毒株的反应,干扰实验即对样品基质中干扰物质的耐受浓度,临床性能包括对病毒感染者、健康体检者及疫苗接种者的阴阳性符合率。预期用途是新冠病毒感染后的病毒消除、疾病的预后观察及新冠病毒疫苗接种后的免疫有效性评价。此类试剂适用于不同人群的中和抗体评价,包括 COVID-19 康复者和疫苗免疫后人群,弥补间接法 ELISA-IgG 对不同背景人群的检测差异。该方法也更适用于高效价血浆筛选制备 COVID-19 人免疫球蛋白。从原理上说,胶体金法的敏感度低于 ELISA,可在减轻稀释操作对检测结果的影响的情况下达到对高效价样品的检测。

目前市场上的 ELISA 中和抗体检测试剂盒基本采用的是竞争法,认为 RBD 与血管紧张素转化酶 2(ACE2)的结合被阻断的能力更能代表中和抗体的水平[7-8],而使用该原理的测试卡 B 在本研究的评估过程中显示敏感度低,分析原因可能是竞争法导致的色度与中和抗体水平负相关这个体系造成阴阳性不易判断。测试卡 A 采用的双抗原夹心法制备的测试卡虽然检测的是总 RBD 抗体,但是与中和抗体结果正相关,敏感度高于测试卡 B(竞争阻断法)。相较于检测特异性抗体的 ELISA 法,胶体金中和抗体结果更能反映不同人群的新冠中和抗体真实水平,且比基于细胞实验的中和抗体检测方法操作更为简单,环境和设备依赖性更低,更为快速便捷,可以作为检测中和抗体的替代方法,既可用于 COVID-19 康复者恢复期血浆的检测,也可用于新冠病毒疫苗免疫后血浆的检测。

双抗夹心法容易出现 hook 效应,为此本研究特意对高 ELISA 稀释倍数的单份免疫后血浆进行了原倍和稀释品检测,结果显示在能检测的范围内,其 T 线色度均与抗体稀释倍数正相关,但是存在样品中和抗体水平极高时 C 线逐渐变浅的问题,此现象说明样品垫上包被的金标抗原并未达到饱和浓度,即当高浓度的中和抗体中和掉金标垫上所有的 RBD-金颗粒后,形成的中和抗体-金标-RBD 复合物涌动到 T 区,被包被在 T 区的重组病毒 RBD 抗原捕获,结合形成 RBD-中和抗体-金标-RBD 复合物,显现极浓的 T 线,就没有多余的 RBD-金颗粒能涌动到 C 区,与包被在 C 区的 RBD 单抗结合形成 C 线。例如,ELISA 稀释倍数大于 10 万的免疫后血浆、出现 T 线极深 C 线极浅的现象,但是稀释样品后检测卡表现正常,同时出现 C 线和 T 线解决的方案是让样品垫浸泡在金标抗原溶液中而不是喷涂在样品垫表面,虽然原料使用量会增加,但是能避免出现试剂盒说明书标示的 C 线不显色测试不成立的现象。

厂家 A 中和抗体测试卡能够半定量检测,其试剂盒配备了一个有中和抗体结果的比色卡,其比色卡使用的是 $60NT_{50}$,$120NT_{50}$和 $300NT_{50}$这 3 个色度,代表高中低不同的中和抗体水平,可用于新冠疫苗免疫后中和抗体的检测。

由于目前厂家 A 测试卡对于免疫后单份血浆的检测限在 ELISA 稀释倍数 160 附近,其色度并不均一,与 ELISA 完全吻合的稀释倍数在 640 以上,说明 ELISA 稀释倍数 160 ~ 640 这个区间测试卡结果与 ELISA 结果并不完全相符。本研究在 ELISA 稀释倍数 160 ~ 640 之间按照测试卡的 $120NT_{50}$和 $300NT_{50}$这 2 个色度进行 2 个 NT_{50}档位的单份血浆的筛选,结果显示与 ELISA 符合率在 90% 以上,将这 2 个 NT_{50}档位的混合血浆进行假病毒中和实验检测,比较 ELISA 稀释倍数档位和 NT_{50}档位的中和抗体水平差异,结果显示按照 NT_{50}档位收集的混浆与中和抗体的相关性更好,预示着测试卡 A 可能在未来用于免疫后高效价血浆的筛查。进一步的解决方案可在半定量的基础上根据筛浆标准重新标定比色卡或者引入便携式读卡机,根据筛浆标准制定标准曲线,建立起可追溯的定量检测系统,这将是一次新的尝试。

对于康复者恢复期血浆和免疫后血浆中和抗体谱的研究一直备受关注[9],课题组的其他研究已经发现康复者恢复期血浆中 RBD-IgM 和 RBD-IgA 阳性率及强阳性的占比都远高于免疫后血浆,RBD-IgG 水平虽然在间接 ELISA 检测结果相近,但是在中和抗体水平上相差 4 倍左右,这说明在总 IgG 水平相近的情况下,康复者恢复期血浆中中和抗体占比及中和抗体的亲和力高于疫苗免疫后血浆,因此有必要对 2 种来源不同的血浆进行更深入的基础研究,对新冠疫苗的研发也将具有启示意义。

[参 考 文 献]

[1] ALI S, UDDIN SM, ALI A, *et al*. Production of hyperimmune anti-SARS-CoV-2 intravenous immunoglobulin from pooled COVID-19 convalescent plasma [J]. *Immunotherapy*, 2021, 13(5): 397 - 407.

[2] WANG H, ZHANG Y, HUANG B, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 713 - 721, e9.
[3] XIA S, DUAN K, ZHANG Y, *et al*. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials[J]. *JAMA*, 2020, 324(10): 951 - 960.
[4] XIA S, ZHANG Y, WANG Y, *et al*. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(1): 39 - 51.
[5] YANG F, XIAO YX, CHEN B, *et al*. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip test using two monoclonal antibodies to detect H7N9 avian influenza virus[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(3): 396 - 400.
[6] 周志军,谢勇,岳胜兰,等. 抗新型冠状病毒抗体样本盘在其胶体金测试卡质量评价中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 43(1): 73 - 77, 83.
[7] CHEN XY, LI R, PAN ZW, *et al*. Human monoclonal antibodies block the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin converting enzyme 2 receptor[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(6): 647 - 649.
[8] MERCURIO I, TRAGNI V, BUSTO F, *et al*. Protein structure analysis of the interactions between SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor: from conformational changes to novel neutralizing antibodies[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1501 - 1522.
[9] HO M. Perspectives on the development of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2[J]. *Antib Ther*, 2020, 3(2): 109 - 114.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 09 - 06