

## 血液样本灭活处理对三种SARS-CoV-2抗体检测方法结果的影响

薛雄燕<sup>1</sup>, 朱嫦琳<sup>1</sup>, 黄少珍<sup>1</sup>, 潘练华<sup>1</sup>, 徐建华<sup>2</sup>, 李炜焯<sup>1</sup>

<sup>1</sup>佛山市第一人民医院检验科, 广东 佛山 528000; <sup>2</sup>广州中医药大学顺德医院医学检验中心, 广东 佛山 528333

**摘要:**目的 探讨56 ℃ 30 min灭活处理对不同方法测定2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)抗体检测结果的影响。方法 本文为回顾性研究。收集2020年2月12~18日在佛山市第一人民医院确诊为新型冠状病毒肺炎患者血清样本、血浆样本及全血样本各11份,同时收集同期疑似病例及其他疾病患者血清、血浆及全血样本各10份,采用双盲法,在样本采用56 ℃ 30 min灭活处理前后,分别采用免疫层析法检测样本中的SARS-CoV-2总抗体、采用荧光免疫层析法检测样本中的SARS-CoV-2 IgM抗体、采用化学发光免疫分析法检测血清及血浆样本SARS-CoV-2 IgM及SARS-CoV-2 IgG,比较灭活前与灭活处理后样本的抗体检测结果,并采用Pearson相关性分析灭活前后检测IgM及IgG半定量检测结果的相关性。结果 免疫层析法检测灭活前后血清与血浆样本中SARS-CoV-2总抗体的阳性样本符合率为90.9%,阴性符合率为100.0%,总符合率均为95.2%。免疫层析法检测灭活前后全血样本中SARS-CoV-2总抗体的总符合率为100.0%。荧光免疫层析法检测灭活前后血清、血浆及全血样本中SARS-CoV-2 IgM抗体的阳性符合率均为100.0%,阴性符合率均为0%,总符合率均为47.6%。化学发光免疫分析法检测灭活前后血清样本中SARS-CoV-2 IgM及IgG抗体及血浆中的IgG抗体,阳性符合率、阴性符合率及总符合率均为100.0%,检测血浆IgM抗体的总符合率为95.2%。采用Pearson相关对灭活前后血清及血浆样本IgM和IgG半定量检测结果进行相关性分析,其中IgM灭活前后结果的相关系数为0.9999(95%CI:0.9998~1.000,  $P < 0.001$ ), IgG灭活前后结果的相关系数为0.9999(95%CI:0.9998~1.000,  $P < 0.001$ )。结论 56 ℃ 30 min灭活处理血液样本对免疫层析法及化学发光免疫分析法检测SARS-CoV-2抗体结果几乎无影响,可在检测前先行灭活以降低检验人员感染风险,荧光免疫层析法不可使用灭活后样本进行检测。

**关键词:**2019新型冠状病毒;病毒灭活;抗体;血清;血浆

## Effect of heat inactivation of blood samples on the efficacy of three detection methods of SARS-CoV-2 antibodies

XUE Xiongyan<sup>1</sup>, ZHU Changlin<sup>1</sup>, HUANG Shaozhen<sup>1</sup>, PAN Lianhua<sup>1</sup>, XU Jianhua<sup>2</sup>, LI Weixuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Laboratory, Foshan First People's Hospital, Foshan 528000, China; <sup>2</sup>Medical Laboratory Center, Shunde Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Foshan 528333, China

**Abstract: Objective** To evaluate the effects of heat inactivation of blood samples at 56 ℃ for 30 min on the results of SARS-CoV-2 antibody detection using different methods. **Methods** This retrospective study was conducted in 11 patients with established diagnosis of COVID-19 and 10 patients with diseases other than COVID-19 in our hospital. We collected samples of serum, plasma and whole blood from each patient between February, 12 and 18, 2020, and with a double-blind design, the samples were examined for SARS-CoV-2 antibodies before and after heat inactivation at 56 ℃ for 30 min. In all the samples, the total SARS-CoV-2 antibodies were detected using immunochromatography, and the IgM antibodies were detected using fluorescence immunochromatography; the IgM and IgG antibodies in the serum and plasma samples detected with chemiluminescence immunoassay. We compared the detection results and analyzed the correlation of semi-quantitative detection results of IgM and IgG antibodies before and after heat inactivation of the samples. **Results** With immunochromatography, the coincidence rate of the total SARS-CoV-2 antibody detection before and after heat inactivation of the serum and plasma samples was 90.0% in COVID-19 cases and 100.0% in the negative cases, resulting in a total coincidence rate 95.2%; for the whole blood samples, the total coincidence rates of the total SARS-CoV-2 antibodies were 100.0%. For detection of IgM antibodies in the serum, plasma and whole blood samples using fluorescence immunochromatography, the coincidence rates in SARS-CoV-2-positive and negative cases and the total coincidence rate before and after inactivation were 100.0%, 0 and 47.6%, respectively. For detection of serum IgM and IgG antibodies and plasma IgG antibodies with chemiluminescence immunoassay, the coincidence rates in SARS-CoV-2-positive and negative cases and the total coincidence rate before and after inactivation were all 100.0%, and the total coincidence rate of plasma IgM antibodies was 95.2%. Pearson correlation analysis of the semi-quantitative results of IgM and IgG detection in the serum and plasma samples showed a correlation coefficient of 0.9999 (95%CI: 0.9998-1.000,  $P < 0.001$ ) between the results before and after sample inactivation. **Conclusion** Heat inactivation of blood samples at 56 ℃ for 30 min does not obviously affect the results of immunochromatography and chemiluminescent immunoassay for detection of SARS-COV-2 antibodies but can reduce the risk of infection for the operators. Heat-inactivated samples can not be used in fluorescence immunochromatography for SARS-CoV-2 antibody detection.

**Keywords:** SARS-CoV-2; heat inactivation; antibodies; serum; plasma

收稿日期:2020-02-26

基金项目:佛山新型冠状病毒感染的肺炎应急攻关专项(2020001000431)

作者简介:薛雄燕,主任技师,E-mail: xxyan@fsyy.com

通信作者:李炜焯,主任技师,E-mail: lwxuan@fsyy.com

2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)可引起新型冠状病毒肺炎(新冠肺炎),对我国人民的健康造成了巨大的威胁<sup>[1-2]</sup>,已作为急性呼吸道传染病已被我国纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病,按

照甲类传染病管理。由于SARS-CoV-2主要通过呼吸道飞沫和密切接触传播,早发现传染源并进行隔离治疗,是防治新冠肺炎的重要手段<sup>[3]</sup>。目前实验室检测仍是诊断新冠肺炎的重要依据,但由于其传染性强,检验人员进行样本检测时将面临极大的风险<sup>[4]</sup>,而在检验前将样本进行病毒灭活则能大大降低风险。目前已有文献报道使用56℃ 30 min和75%乙醇处理咽拭子标本对后续SARS-CoV-2核酸检测无明显影响<sup>[5]</sup>,而灭活样本对SARS-CoV-2抗体检测是否存在影响尚未见报道。因此本研究探讨56℃ 30 min灭活方式对不同方法检测SARS-CoV-2抗体的结果是否存在影响,报道如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究资料

血液样本来自于我院急诊科、感染科及重症医学科的住院患者,收集日期为2020年2月12~18日。其中阳性样本来源于新型冠状病毒肺炎确诊患者,确诊标准为《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)》<sup>[6]</sup>,阴性样本来源于同期非新冠肺炎患者,并排除免疫功能障碍、恶性肿瘤及使用肝素治疗等患者。所有病例入院时同时采集3管血:黄色带促凝管采血管采集静脉血3 mL,3000 r/min离心15 min后分离血清备用;紫色EDTA-K2抗凝管采集静脉血2 mL,3000 r/min离心15 min后分离血浆备用;紫色EDTA-K2抗凝管采集静脉血2 mL为全血标本。所有研究对象或家属均签署知情同意书。

### 1.2 检测原理及判读标准

免疫层析法 SARS-CoV-2新型冠状病毒抗体检测试剂(免疫层析法)试剂盒购自广州万孚生物技术股份有限公司,检测原理是采用免疫层析技术,应用捕获法检测人血清、血浆、全血中的2019新型冠状病毒总抗体。当检测区及质控区各出现一条红色反应线为阳性,质控区出现一条红色反应线为阴性。

荧光免疫层析法 SARS-CoV-2新型冠状病毒IgM抗体检测试剂(荧光免疫层析法)试剂盒购自广州万孚生物技术股份有限公司,检测原理是采用捕获法及荧光免疫层析技术,检测人血清、血浆、全血中的2019新型冠状病毒IgM抗体,采用免疫荧光检测仪扫描荧光信号。仪器结果显示界面直接显示“阳性”、“疑似阳性”及“阴性”。

化学发光免疫分析法 新型冠状病毒SARS-CoV-2 IgM抗体检测试剂盒(化学发光免疫分析法)及新型冠状病毒SARS-CoV-2 IgG抗体检测试剂盒(化学发光免疫分析法)试剂盒购自深圳市新产业生物医学工程股份有限公司,检测原理是化学发光免疫间接法,采用SARS-CoV-2重组抗原包被磁性微球,小分子发光标记物标记抗人IgM或IgG单克隆抗体,利用底物液启动化学发光反应并产生光信号,检测相对光强度并计算

出待测抗体浓度。检测结果<0.900 AU/mL为无反应性,检测结果在0.900~1.10 AU/mL判断为可疑,检测结果 $\geq$ 1.10 AU/mL为有反应性。IgM检测范围为0.050~30.0 AU/mL,IgG检测范围为0.020~30.0 AU/mL。

### 1.3 检测方案

所有样本均同时采用免疫层析法及荧光免疫层析法检测SARS-CoV-2抗体,由于全血样本不能用于化学发光免疫分析法,因此血清和血浆样本采用化学发光免疫分析法检测SARS-CoV-2 IgM和IgG抗体。检测完毕后,所有样本置于56℃水浴箱放置30 min灭活病毒。灭活后样本按原来检测方案全部复测1次,比较灭活前与灭活处理后抗体检测结果。所有操作符合生物安全要求。

### 1.4 统计学分析

免疫层析法及荧光免疫层析法为定性试验,检测结果为分类变量,采用“阴性”、“疑似”或“阳性”表示。化学发光免疫分析法为半定量实验,根据检测数值判定为“有反应性”、“可疑”或“无反应性”。分别计算样本灭活前后检测结果的阳性符合率、阴性符合率及总符合率,采用Pearson相关分析灭活前后血清及血浆样本IgM和IgG半定量检测结果。采用GraphPad Prism 5.0软件进行绘图及统计学分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 灭活前与灭活处理后免疫层析法检测结果

采用免疫层析法检测灭活前后样本中SARS-CoV-2总抗体,比较结果发现,血清与血浆阳性各11例灭活前为阳性的样本,经56℃ 30 min灭活后处理后,各有1例变为阴性,而灭活前为阴性的血清及血浆样本各10例,阳性样本符合率为90.9%。灭活处理后全部均为阴性,阴性符合率为100.0%。血清样本及血浆样本灭活前与灭活处理后的总符合率均为95.2%( $\kappa=0.905$ , $P<0.001$ )。全血11例阳性样本与10例阴性样本灭活前与灭活后检测结果完全一致,总符合率为100.0%( $\kappa=1.000$ , $P<0.001$ ,表1)。

### 2.2 灭活前与灭活处理后荧光免疫层析法检测结果

采用荧光免疫层析法检测灭活前后样本中SARS-CoV-2 IgM抗体,比较结果发现,血清、血浆及全血样本经56℃ 30 min灭活处理后,所有样本的检测结果均为阳性,其中阳性符合率为100.0%,但阴性符合率为0%,总符合率为47.6%。

### 2.3 灭活前与灭活处理后化学发光免疫分析法检测结果

采用化学发光免疫分析法检测灭活前后血清及血浆样本中SARS-CoV-2 IgM及IgG抗体,经56℃ 30 min灭活处理后再检测,其中血清IgM、IgG及血浆IgG检测结果与灭活前一致,阳性符合率、阴性符合率及总符合

表1 灭活前与灭活处理后免疫层析法检测结果

Tab.1 Immunochromatographic results before and after heat inactivation of the samples

Sample	Before inactivation	n	After inactivation		Coincidence rate (%)	κ	P	95CI %
			Positive (+)	Negative (-)				
Serum	Positive (+)	11	10	1	95.2	0.905	0.000	0.000-0.000
	Negative (-)	10	0	10				
Plasma	Positive (+)	11	10	1	95.2	0.905	0.000	0.000-0.000
	Negative (-)	10	0	10				
Whole blood	Positive (+)	11	11	0	100.0	1.000	0.000	0.000-0.000
	Negative (-)	10	0	10				

表2 灭活前与灭活处理后荧光免疫层析法检测结果

Tab.2 Fluorescence immunochromatographic results before and after heat inactivation of the samples

Sample	Before inactivation	n	After inactivation			Coincidence rate (%)	κ	P	95CI %
			Positive (+)	Gray zone (±)	Negative (-)				
Serum	Positive (+)	10	10	0	0	47.6	0	-	-
	Gray zone (±)	1	1	0	0				
	Negative (-)	10	10	0	0				
Plasma	Positive (+)	10	10	0	0	47.6	0	-	-
	Gray zone (±)	1	1	0	0				
	Negative (-)	10	10	0	0				
Whole blood	Positive (+)	10	10	0	0	47.6	0	-	-
	Gray zone (±)	1	1	0	0				
	Negative (-)	10	10	0	0				

率为 100.0% ( $\kappa=1.000, P<0.001$ ), 1 例血浆 IgM 灭活前为可疑 (1.079 U/mL), 灭活后检测结果为无反应性 (0.889 U/mL), 因此血浆 IgM 总符合率为 95.2% ( $\kappa=0.881, P<0.001$ , 表3)。

表3 灭活前与灭活处理后化学发光免疫分析法检测结果

Tab.3 Chemiluminescence immunoassay results before and after heat inactivation of the samples

Sample	Item	Before inactivation	n	After inactivation			Coincidence rate (%)	κ	P	95CI %
				Positive (+)	Gray zone (±)	Negative (-)				
Serum	IgM	Positive (+)	5	5	0	0	100.0	1.000	<0.001	0.000-0.000
		Gray zone (±)	1	0	1	0				
		Negative (-)	15	0	0	15				
	IgG	Positive (+)	7	7	0	0	100.0	1.000	<0.001	0.000-0.000
		Gray zone (±)	0	0	0	0				
		Negative (-)	14	0	0	14				
Plasma	IgM	Positive (+)	5	5	0	0	95.2	0.881	<0.001	-
		Gray zone (±)	1	0	0	1				
		Negative (-)	15	0	0	15				
	IgG	Positive (+)	7	7	0	0	100.0	1.000	<0.001	0.000-0.000
		Gray zone (±)	0	0	0	0				
		Negative (-)	14	0	0	14				

## 2.4 灭活前与灭活处理后化学发光免疫分析法检测结果相关性分析

采用Pearson相关对灭活前后血清及血浆样本IgM和IgG检测结果进行相关性分析,其中IgM灭活前后结果的相关系数为0.9999(95%CI:0.9998~1.000, $P<0.001$ ),IgG灭活前后结果的相关系数为0.9999(95%CI:0.9998~1.000, $P<0.001$ ,图1)。

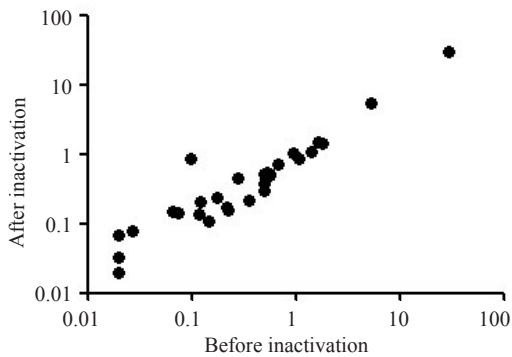


图1 灭活前后化学发光法检测IgM结果相关性

Fig.1 Correlation between chemiluminescence immunoassay results before and after heat inactivation of the samples.

## 3 讨论

SARS-CoV-2属于 $\beta$ 属冠状病毒,与蝙蝠SARS样冠状病毒同源性超过85%,具有高度的传染性,可引起新冠肺炎<sup>[7]</sup>。SARS-CoV-2对紫外线和热敏感,56℃30min、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒<sup>[8]</sup>。SARS-CoV-2核酸检测阳性是确诊新冠肺炎的主要实验室依据<sup>[9]</sup>,然而,核酸检测耗时较长,且易受到取材等因素的影响存在一定的假阴性,因此,SARS-CoV-2抗体检测是诊断新冠肺炎的重要辅助手段,是核酸检测的良好补充。由于已确证医学实验室人员在接触患者血液、尿液、粪便等样本时可产生气溶胶,造成检验人员的感染<sup>[4]</sup>,除了做好生物安全防护外,在不影响检测结果的前提下,若能在检测前将样本进行灭活处理,将大大降低感染的几率。因此,本研究通过比较不同方法检测灭活前与灭活处理后样本的结果差异,探讨56℃30min灭活处理对不同方法测定SARS-CoV-2抗体检测结果的影响。

本研究发现,免疫层析法检测SARS-CoV-2总抗体的结果基本不受样本灭活的影响,其所有样本类型的阴性符合率均达到100%,而11例灭活前检测结果为阳性的血清及血浆样本中,只有1例在灭活后转变成阴性,阳性符合率为90.9%。采用化学发光免疫分析法检测血清IgM、IgG及血浆IgG的结果与灭活前一致,阳性符合率、阴性符合率及总符合率为100.0%,血浆IgM 1例灭活前为可疑阳性,灭活后检测结果为无反应性,因此血浆IgM总符合率为95.2%。提示灭活处理对检测

结果影响较小,对化学发光免疫分析法检测血清IgM、IgG结果基本无影响。采用荧光免疫分析法检测SARS-CoV-2 IgM,灭活前结果为阴性的标本,灭活处理后所有检测结果均为阳性,阴性符合率为0,表明此方法不可采用56℃30min灭活处理后的样本进行检测。

针对免疫层析法1例在经灭活处理后变成阴性的阳性样本,结合化学发光免疫分析法检测IgM及IgG结果进行进一步分析,发现两种方法前后不一致的样本来源于同一例患者。查阅其病历资料,发现此患者处于感染初期,化学发光免疫分析法检测血浆IgM检测结果为1.079 U/mL,处于灰区0.9~1.10 U/mL,经灭活处理后结果为0.889 U/mL,变为无反应性,IgG在灭活前后结果均为无反应性,考虑由于本身抗体滴度较低,处于临床诊断的临界值附近,需复查或结合临床症状综合判断。

化学发光免疫分析法检测SARS-CoV-2 IgM或IgG为半定量方法,通过光电倍增管测出相对光强度,与样本中的待测抗体呈一定正相关比例关系,可在一定程度上反应患者体内IgM及IgG浓度的变化,可用于SARS-CoV-2感染的辅助诊断。最近有文献报道,患者恢复期血清可能用于新冠肺炎的治疗<sup>[10-11]</sup>,IgM及IgG半定量检测有助于了解患者体内抗体水平,对临床上开展抗体的采集有一定的指导意义。采用Pearson相关性分析灭活前后血清及血浆样本IgM和IgG检测结果,IgM及IgG灭活前后结果的相关性良好,相关系数均达到0.9999(95%CI:0.9998~1.000, $P<0.001$ ),进一步证明56℃30min灭活处理不会对化学发光免疫分析法检测SARS-CoV-2 IgM或IgG结果造成影响,为了降低检验人员感染风险,可在检测前对标本进行灭活处理。

综上所述,56℃30min灭活处理血液样本对免疫层析法及化学发光免疫分析法检测SARS-CoV-2抗体结果几乎无影响,可在检测前先进行灭活以降低检验人员感染风险,荧光免疫层析法不可使用灭活后样本进行检测。然而,本研究存在一些不足:由于时间紧迫且样本来源较少,本次纳入研究的总样本量较小,且仅有1例抗体水平处于临床诊断灰区。在后续研究中应加大样本量,并增加灰区样本量,将有助于进一步明确灭活处理对检测结果的影响,为降低临床检验人员的感染风险提供新策略。

## 参考文献:

- [1] Nishiura H, Jung SM, Linton NM, et al. The extent of transmission of novel coronavirus in wuhan, China, 2020 [J]. J Clin Med, 2020, 24 (9). pii: E330. DOI: 10.3390/jcm9020330.
- [2] Hui DS, I Azhar E, Madani TA, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China [J]. Int J Infect Dis,

- 2020, 91: 264-6. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.01.009.
- [3] 关于印发医疗机构内新型冠状病毒感染预防与控制技术指南(第一版)的通知(国卫办医函[2020]65号)[EB/OL].2020. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/202001/b91fdab7c304431eb082d67847d27e14.shtml>.
- [4] 华文浩, 盛琳君, 宋丽红, 等. 生物安全 II 级实验室开展新型冠状病毒感染患者实验检测的风险评估与防控[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(00): E007-E007. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2010.0007.
- [5] 陈培松, 何宇婷, 黄裕立, 等. 不同方式灭活口咽拭子标本对 2019 新型冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测结果的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(00): E004-E004. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.0004.
- [6] 国家卫生健康委. “新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案”(试行第五版)[EB/OL]. 2020. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.
- [7] Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019- nCoV) causing an outbreak of pneumonia [J]. Clin Chem, 2020. pii: hvaa029. doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
- [8] 中华人民共和国卫生健康委员会. 国卫办医函[2020]109号.新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南(第四版). <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202002/573340613ab243b3a7f61df260551dd4.shtml>.
- [9] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveill, 2020, 25(3). DOI: 10.2807/1560-7917. ES. 2020. 25. 3.2000045.
- [10] Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis [J]. J Infect Dis, 2015, 211(1): 80-90. DOI: 10.1093/infdis/jiu396.
- [11] 李辉, 王业明, 徐九洋, 等. 2019新型冠状病毒抗病毒治疗有药可期[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(00): E002-E002. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2020.0002.

(编辑:孙昌朋)