

献浆员中新型冠状病毒SARS-CoV-2中和抗体检测分析

张黎[#], 聂建辉[#], 李倩倩, 吴佳静, 王威, 刘欢, 秦海洋, 王佑春, 黄维金^{*}, 侯继锋^{*} (中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法与标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的: 静注人免疫球蛋白 (IVIG) 和新冠肺炎恢复者的血浆已被推荐用于重症新冠肺炎患者的治疗。因此, 血浆中新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 中和抗体水平需要得以及时评价。本研究利用不需要在生物安全三级实验室操作的SARS-CoV-2假病毒中和抗体检测方法, 建立了快速检测中和抗体的策略。**方法:** 采用新型冠状病毒SARS-CoV-2假病毒, 对1080份健康献血员血浆及26批次IVIG的SARS-CoV-2中和抗体进行检测。初筛采用1:30倍稀释检测; 对初筛阳性 (抑制率 $\geq 50\%$ 为阳性) 的样本进行复试, 复试采用1:30、1:90和1:270三个梯度; 对于复试阳性的样本进行中和特异性分析, 进一步检测针对水疱性口炎病毒 (VSV)、严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 的中和活性。**结果与结论:** 在1:30倍稀释时, 26批次IVIG的SARS-CoV-2中和抗体均为阴性, 1080份献血员血浆中SARS-CoV-2中和抗体阳性率为0.6% (6/1180); 对6份阳性血浆的特异性分析显示均为对VSV、SRAS-CoV或MESR-CoV假病毒的非特异中和作用。本研究表明该假病毒中和抗体检测方法和快速检测策略可以用于IVIG、健康献血员和感染者恢复期血浆中的中和抗体检测, 发现IVIG针对SARS-CoV-2无特异的中和抗体活性, IVIG在临床重症治疗中发挥的是非病毒特异的辅助治疗作用。

关键词: 新型冠状病毒SARS-CoV-2; 中和抗体; 静注人免疫球蛋白; 血浆; 筛选

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)03-0260-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.03.002

基金项目: 十三五传染病重大专项课题资助项目 (编号 2018ZX10731101-002-006、2018ZX10731101-002-009、2018ZX10731101-001-006); 创新生物技术药评价及标准化关键技术研究 (编号 2018ZX09101001)

作者简介: 张黎, 免疫学博士; 研究方向: 生物制品的技术开发、质量控制研究; Tel: (010) 53851698; E-mail: zhangli@nifdc.org.cn

共同第一作者: 聂建辉, 生物化学和分子生物学博士; 研究方向: 生物制品的技术开发、质量控制研究; Tel: (010) 53851705;

E-mail: niejhfirst@126.com

通信作者: 黄维金, 研究员; 研究方向: 疫苗质量控制研究; E-mail: huangweijin@nifdc.org.cn

侯继锋, 研究员; 研究方向: 血液制品质量控制研究; E-mail: houjif@nifdc.org.cn

Detection and Analysis of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies in Plasma Donors

Zhang Li[#], Nie Jianhui[#], Li Qianqian, Wu Jiajing, Wang Wei, Liu Huan, Qin Haiyang, Wang Youchun, Huang Weijin^{*}, Hou Jifeng^{*} (National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of National Health Commission for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Key Laboratory of Biological Product Quality Research and Evaluation of National Medical Products Administration, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: Human immunoglobulin for intravenous injection(IVIG) and the convalescent plasma of the COVID-19 patients are recommended for the treatment of patients with severe novel coronavirus pneumonia. Hence, the levels of neutralizing antibody against novel coronavirus SARS-CoV-2 in plasma need to be evaluated in time. In this study, a rapid screening strategy for determining neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 was established using the SARS-CoV-2 pseudovirus by which biosafety Level 3 laboratory is not required.

Methods: The novel SARS-CoV-2 pseudovirus was used to detect SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in 1080 healthy donors and 26 batches of IVIG. In the initial screening, 1 : 30 times dilution was used; in the repeated screening, dilutions of 1 : 30, 1 : 90 and 1 : 270 were used for the samples showed as positive in the initial screening (inhibition rate $\geq 50\%$); a neutralization-specific analysis was performed for the positive samples in the repeated screening, and their neutralizing activities for the vesicular stomatitis virus (VSV), severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) were further detected. **Results and Conclusion:** At 1 : 30 dilution, 26 batches of IVIG were all negative, and the positive rate of the 1080 blood donors was 0.6% (6/1080); 6 positive samples also showed nonspecific neutralizing effect on VSV, SARS-CoV and MERS-CoV in the further specific identification assay. This study showed that the pseudovirus based rapid SARS-CoV-2 neutralizing antibody assay could be apply to the evaluation of neutralizing antibodies of IVIG in healthy donors and convalescent plasma in infected persons. It demonstrated that IVIG had no specific neutralizing antibody activity against SARS-CoV-2, and IVIG might play a non-viral-specific supplementary role in the clinical treatment of severe patients.

Keywords: novel coronavirus SARS-CoV-2; neutralizing antibody; intravenous injection of human immunoglobulin; plasma; screening

新型冠状病毒SARS-CoV-2引起的新型冠状病毒肺炎 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) 最早报道于2019年12月^[1]。截至3月中旬, 全球已超过15万人感染, 5700余人死亡, 世界卫生组织已宣布发生全球大流行^[2]。该病毒目前尚无疫苗和特效药, 临床上主要采用抗病毒和支持治疗疗法^[3]。静注人免疫球蛋白 (Intravenous Immunoglobulin, IVIG) 作为预防用药和重症治疗用药, 在临床上广泛使用^[4-6]。

SARS-CoV-2感染的肺炎诊疗快速指南中提出, 重症患者依据病情可酌情早期使用注射用免疫球蛋白 (IVIG)^[7]。了解IVIG中SARS-CoV-2中

和抗体水平, 以及其来源的健康献浆员的SARS-CoV-2中和抗体水平, 可以评价IVIG是否具有特异的抗SARS-CoV-2作用, 为临床使用提供实验室支持数据。重型和危重型新型冠状病毒肺炎诊断和治疗专家共识建议: “将含有新型冠状病毒抗体的人恢复期血浆用于病情进展较快、重型和危重型患者, 可以作为特异性治疗的一种选择。如使用恢复期血浆, 应检测血浆中保护性抗体滴度水平”^[8]。目前的中和抗体检测主要在生物安全三级实验室内进行。利用活病毒细胞培养的中和试验检测, 对实验室等级要求高, 严重限制了临床大规模的推广使用。开发出可在生物安全二级实验室或者普通实验

室开展的快速中和抗体检测方法,可以服务于临床重症患者治疗,迫在眉睫。本实验室已经构建成功了SARS-CoV-2假病毒,并且建立了中和抗体检测方法^[9]。在此基础上,本研究采用了一种单一稀释度初筛、阳性样品系列稀释复试确定滴度的策略,可以解决临床中和抗体检测的迫切需求。

本研究主要报告基于假病毒中和抗体方法,检测健康献血员血浆以及IVIG中SARS-CoV-2的中和抗体水平,评价普通人群血浆对SARS-CoV-2的中和能力,从而分析IVIG在治疗新型冠状病毒感染中是否发挥特异的抗病毒作用。

1 材料与方法

1.1 血浆和IVIG

1080份血浆样品来自山东某浆站的合格原料血浆,来自广西环江,年龄18~55岁,均数40岁,男女比例为1:1.3;26批次IVIG样品来自国内多家血液制品公司批签发合格产品;SARS-CoV-2阳性血清由北京科兴生物制品有限公司提供;SARS-CoV恢复期病人血清(SARS-CoV抗体国家参考品)为本实验室保存;MERS DNA疫苗免疫的小鼠血清为本实验室保存^[10]。

1.2 假病毒

SARS-CoV-2、SARS及MERS假病毒由本实验室构建。其中SARS-CoV-2的Spike基因序列来自GeneBank:MN908947,克隆到pcDNA3.1载体,并构建以VSV为骨架的复制缺陷型病毒。具体构建方法参考本实验室前期文献^[9-10]。

1.3 细胞

Huh-7细胞来自日本生物制品研究中心(JCRB, 0403),293T细胞来自ATCC(CRL3216)。

1.4 主要试剂

DMEM高糖培养基和PBS缓冲液,购自Hyclone公司;胎牛血清,购自PanseraES公司;1%青霉素链霉素双抗、HEPES缓冲液和0.25%胰酶-EDTA,均购自吉诺公司;化学发光检测试剂,购自Perkinelmer公司。

1.5 假病毒滴度检测

取SARS-CoV-2病毒液进行3倍系列稀释,

每个稀释度6个平行孔,共9个稀释度,每孔加入100 μ L稀释液。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,每孔加入 2×10^4 个/100 μ L细胞。于37℃,5%CO₂培养箱静置培养,24小时后进行化学发光检测。高于细胞对照平均值的10倍的孔判定为阳性孔。采用Reed-Muench法计算病毒滴度。

1.6 SARS-CoV-2中和抗体效价检测

取待测血清或者IVIG置96孔细胞培养板中稀释至一定浓度,并进行3倍系列稀释。加入一定滴度的假病毒液,混合后于37℃孵育1小时。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,每孔加入 2×10^4 个/100 μ L细胞。于37℃,5%CO₂培养箱培养,24小时后进行化学发光检测。同一批检测板设阳性对照,加入阳性样品,包括SARS-CoV-2阳性血清、SARS恢复期病人血清或MERS DNA疫苗免疫的小鼠血清;每个板设一列作为空白对照,加入细胞培养液不加假病毒;每个板再设一列为病毒对照,加入细胞和假病毒。试验成立的条件:阳性对照为阳性,病毒对照发光均值/细胞对照发光值大于1000。计算不同样本对于病毒感染的抑制率:抑制率=1-实验组的发光强度/病毒对照组的发光强度,抑制率 $\geq 50\%$ 判定为阳性。

1.7 SARS-CoV-2中和抗体快速检测策略

初筛采用1:30倍稀释,检测SARS-CoV-2中和抗体;对初筛抑制率 $\geq 50\%$ 的样本进行复试,复试采用1:30、1:90和1:270三个梯度;对于复试阳性的样本进一步检测针对VSV、SARS和MERS病毒的中和活性,分析其中和特异性。

2 结果

2.1 IVIG中新型冠状病毒中和抗体的检测结果

所有试验的阳性对照和细胞对照均成立。图1为SARS-CoV-2阳性血清的检测结果,为一个典型的S型曲线。26批次IVIG经检测,在1:30倍稀释时,抑制率均 $< 50\%$,SARS-CoV-2中和抗体均为阴性。

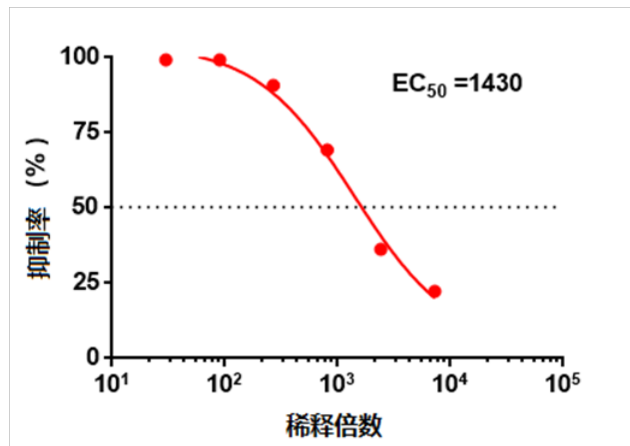


图1 新型冠状病毒中和抗体的典型抑制曲线

2.2 血浆中新型冠状病毒中和抗体的检测结果

对1080份健康献浆者经过初筛和复试，1：30稀释时，6份样本的抑制率 $\geq 50\%$ ，SARS-CoV-2中和抗体阳性率为6/1180（0.6%）。6份阳性样品的抑制率较低，抑制率均值为60%，均小于80%，具体见表1。1：90及1：270稀释时，所有样本均为阴性。

2.3 阳性样本的中和特异性验证

为检测阳性样本的中和作用是否为SARS-CoV-2特异性中和，同时检测了相同假病毒体系

的其他3个病毒：VSV、SARS-CoV和MERS-CoV。SARS-CoV恢复期病人血清和MERS DNA疫苗免疫的小鼠血清的抑制曲线同图1类似，阳性对照成立。实验同样采用复孔检测1：30、1：90、1：270三个稀释度，结果显示编号419、727和1153号的3份阳性样本在1：30稀释度下对3种病毒均有微弱的抑制作用，提示该中和为非特异性中和作用；编号132、645和1146的3份样品对2种病毒有弱的中和作用；1：90及1：270稀释时，所有样本均为阴性。具体见表1。

表 1 阳性血浆的 SARS-CoV-2 中和抗体抑制率 %

编号	SARS-CoV-2			VSV	SARS-CoV	MERS-CoV
	初测	复测	均值			
132	55	55	55	46	57	21
419	82	74	78	79	85	85
645	50	51	50	39	71	25
727	61	63	62	48	84	41
1146	55	52	54	60	64	18
1153	61	60	60	67	70	39

3 讨论

新型冠状病毒的爆发,在不到4个月内传遍全球,夺去了近6000人的生命^[1-2,11]。由于没有疫苗及特效药,隔离成为防止病情扩散的主要手段。然而大范围的停工停产,给中国乃至全世界带来了巨大的经济损失。如何找到快速有效的治疗方案,拯救危重患者,防止疫情扩散,成为广大医务工作者和科研工作者的当务之急。

IVIG作为从健康人血浆中提取的免疫球蛋白制剂,因含有多种抗体成分,被认为具有增强免疫力的功能。研究报道,IVIG已广泛应用于婴幼儿重症肺炎^[4]、成人急性病毒性肺炎^[6]以及老年重症肺炎^[5]等肺炎的联合治疗,并取得较好的疗效。因此,在新型冠状病毒疫情防控中,IVIG作为辅助用药,也在临床上广泛用于救治肺炎患者^[7-8]。然而,IVIG的应用是否对于新型冠状病毒的治疗有直接作用,尚未明确。另外,此次新型冠状病毒感染潜伏期为1~14天,且不同个体感染临床症状差异性大。虽有约2%的感染者会发展为重症甚至死亡,但也有许多轻症或无症状感染者存在^[2]。分析不同个体对于该病毒的抵抗力差异的原因,正常人群中是否存在针对该病毒的中和抗体,不同个体的不同感染状态是否与其本身具有新型冠状病毒特异性免疫球蛋白相关,为本课题研究的目的之一。在恢复期病人特异性免疫血浆尚不充足的情况下,能否在正常献浆者中筛选到中和活性稍高的样本进行免疫球蛋白生产,用于临床治疗,亦为本课题研究的初衷。

本研究共检测了1080份正常献血员的血浆,以及26批次IVIG制品中的新型冠状病毒中和抗体含量。结果提示6个样本在较低稀释度下(1:30),具有中和新型冠状病毒的能力,后来对假病毒载体相关的VSV和2个类似的冠状病毒进行非特异性分析,证明6份样品的中和活性均为非特异性中和。可见,健康人群几乎不具备中和SARS-CoV-2的能力。因此,IVIG制品的应用,仅有助于预防并发症,不具备治疗新冠病毒感染的作用。应尽快鼓励恢复期病人捐献血浆,生产特异性免疫球蛋白,用于治疗新型冠状病毒肺炎^[12]。

由于假病毒中和抗体检测实验本身是基于细胞学的试验,存在一定的检测误差,为了提高检测结果的准确性和可重复性,样品检测时一般通

过多次实验、设定平行孔或不同系列稀释度的方法确定最终阳性样品,检测过程相对烦琐。本研究设计了初筛和复试实验策略,是因为假病毒方法学验证时,发现背景人群的非特异抑制水平为血清稀释30倍。只有稀释度超过30倍以上阳性的样品,才可能具有特异抗病毒中和活性,所以选择30倍稀释作为初筛稀释度。单一稀释度初筛,减少了大量的实验室工作。对阳性样品进行非特异性分析,可以避免假阳性反应。一般假阳性容易发生在检测稀释度比较低的情况下。感染恢复者血清中的中和抗体水平很高,曾利用该方法检测多份感染恢复者血清,其中和抗体水平一般在几百到几千的水平。采用恢复者血浆治疗重症患者,可以发挥更大的临床治疗效果。

总之,本研究建立的方法和检测策略,预期可以用于新冠肺炎感染恢复者血浆中和抗体水平的检测和人群感染的血清流行病学调查。

参考文献:

- [1] WU J T, LEUNG K, LEUNG G M. Nowcasting and Forecasting the Potential Domestic and International Spread of the 2019-nCoV Outbreak Originating in Wuhan, China: a Modelling Study[J]. *Lancet*, 2020, 395 (10225): 689-97.
- [2] WHO. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report-55[EB/OL]. [2020-03-10]. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200315-sitrep-55-covid-19.pdf?sfvrsn=33daa5cb_6.
- [3] LI Q, GUAN X, WU P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia [J]. *N Engl J Med*, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [4] 周金芳, 张延峰. 糖皮质激素联合丙种球蛋白对小儿肺炎的影响 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15 (27): 86-89.
- [5] 韦安猛, 张伟华. 丙种球蛋白治疗老年重症肺炎36例临床观察 [J]. *医药论坛杂志*, 2015, 36 (6): 74-75.
- [6] 司马芳. 大剂量丙种球蛋白冲击疗法对成人急性重症病毒性肺炎患者治疗效果分析 [J]. *药品评价*, 2019, 16 (5): 34-39.
- [7] 北京协和医院新型冠状病毒感染的肺炎诊治专家组. 北京协和医院关于“新型冠状病毒感染的肺炎”诊疗

- 建议方案 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59 (3): 186-188.
- [8] 中国研究型医院学会危重医学专业委员会, 中国研究型医院学会危重医学专委会青年委员会. 重型和危重型新型冠状病毒肺炎诊断和治疗专家共识 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200218-00001.
- [9] NIE J, LI Q, WU J, et al. Establishment and Validation of APseudovirus Neutralization Assay for SARS-CoV-2 [J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, DOI: 10.1080/22221751.2020.1743767.
- [10] 马建, 贺鹏飞, 赵晨燕, 等. SARS 和 MERS 中和抗体假病毒检测方法的建立 [J]. 病毒学报, 2019, 35 (2): 189-196.
- [11] TRILLA A. One World, One Health: The Novel Coronavirus COVID-19 Epidemic [J]. Med Clin (Barc), 2020, DOI:10.1016/j.medcli.2020.02.002.
- [12] 杨晓明, 侯继锋. 康复期血浆应用于急性病毒性传染病现状及其治疗新型冠状病毒肺炎前景 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002999.
- (收稿日期 2020年2月28日 编辑 王雅雯)