



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104991056 B

(45)授权公告日 2017.01.04

(21)申请号 201510473549.7

审查员 李进进

(22)申请日 2015.08.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104991056 A

(43)申请公布日 2015.10.21

(73)专利权人 武汉林勉生物技术有限公司

地址 430030 湖北省武汉市硚口区解放大道同馨花园

(72)发明人 李方和 李时君 刘汉华

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 张火春

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

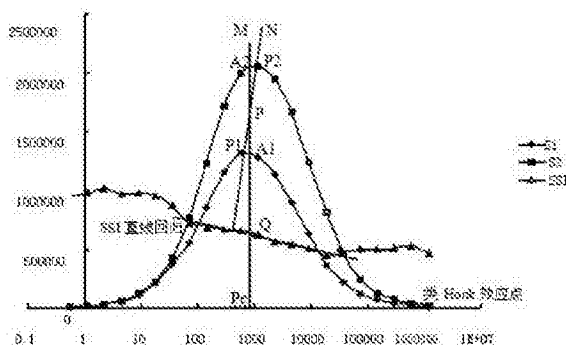
权利要求书3页 说明书21页 附图3页

(54)发明名称

一种血清学检测与定量分析的方法

(57)摘要

本发明涉及一种血清学检测定量分析方法。在半对数坐标图像上,以X轴为靶物质浓度的对数值,Y轴为信号强度及信号饱和度指数,根据T1、T2时点测得系列参比标准品实验信号S1、S2及SSDI绘制S1、S2 HB双向剂量反应曲线及SSI曲线;采用拟合法确证HB双向曲线中函数x与y以及SSDI的关系;确定函数图像分析的界点A1、A2及Q,构成复合HB双向剂量反应曲线图像分析体系;根据被分析标本所测得的实验信号Y,及SSDI值与Q值比较的结果,在相应的曲线区段进行函数x的查读,将查读的对数结果转化为实际检测浓度并报道实验结果。所建立的实验方法能拮抗浓度依赖性Hook效应干扰,并能极大拓宽靶物质定量检测范围。



1. 一种血清学检测定量分析的方法,其特征在于:包括如下步骤:

1) 实验过程:在存在标记与未标记对应免疫反应试剂及信号生成相关试剂的实验容器中分别加入当次参比标准品、拟合样品、阴阳性对照或待测标本,所述的对应免疫反应试剂是指抗原及抗体,混合后放置,以使其发生免疫反应,并产生可供测定的实验信号,于发生免疫反应的T1、T2时点分别进行实验信号S1、S2的检测;将其输入专项实验分析系统进行处理,并按照实验者指令输出实验结果;

2) 函数关系的拟合:

(1) 同上实验条件下,采用超过100个浓度点样本,浓度范围设定涵盖整个HB双向曲线中有效分析区段图像,样本的浓度区间设定为质点间间隔0.025—0.10横轴读数距离,对此参比标准品进行10次或以上重复实验,取每个浓度点各次检测的实验信号平均值作为该点对应的实验信号进行高密度函数拟合分析;

(2) 将所生成的实验信号输入人工智能分析系统,人工智能分析系统的后台路径概况:

① 输入T1及T2两时点检测的实验信号值S1及S2;

② 计算出受检标本T1及T2时点S1与S2测值的比值,即实验信号饱和度,将实验信号饱和度转换成饱和度指数(Signal Saturation degree index, SSD1),转换方法为 $(S1/S2) \times 100 \times e$ , e为转换系数, SSD1在纵轴上的函数价值与实验信号y同;

③ 在平面半对数坐标图像上,根据系列参比标准品测定所获取的实验信号S1及S2,分别绘制出S1及S2两条Heidelberger双向剂量反应曲线,并将饱和度指数按照各自对应靶物质浓度依次标绘到前述半对数函数图像中,绘制出相应的信号饱和度指数曲线SS1,此三条曲线构成复合HB双向剂量反应曲线图像分析体系,其中Y轴为实验信号强度或SSD1, X轴为靶物质浓度的对数数值;

④ 采用拟合法确证HB双向曲线中函数x与y,以及信号饱和度指数曲线SS1中函数x与SSD1的关系:

通过拟合实验证实,HB双向剂量反应曲线图像中各HB双向曲线上的实测点(y)与其所对应的函数值(x)之间的关系可采用以下公式表述:

$$f(x) = a \times \exp\left(-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2\right), \text{拟合效果 } R^2 \geq 0.99$$

其中x:为靶物质浓度的自然对数;a:修正参数;b:对数均值;f(x)=实验信号(y);c:标准差;

信号饱和度指数曲线SS1上各实测点SSD1,限两HB双向曲线图像内侧点值,及其与所对应的函数值(x)之间的关系可以采用以下公式表述:

$$f(x) = a + b \times x, \text{拟合效果 } R^2 \geq 0.95$$

其中x:为靶物质浓度的自然对数;a:截距,是指当x=0时,Y的取值本底信号的大小;b:斜率,是指x变化一个单位时Y的增减量;

$$y = f(x) = \text{SSD1} = (S1/S2) \times 100 \times e \text{ (e为转换系数)};$$

3) 拟合函数图像分析界点的确定

(1) 计算两HB双向曲线的顶点P1及P2,公式: $P(y) = f(x) = \mu$ ,其中, $\mu = b$ ,即实验数据模拟出的模型参数的对数均值,为P1或P2在顶点对应的浓度对数值;

(2) 确认两顶点在X轴读数差值的中点Pe(公式: $Pe(x) = (P1(x) + P2(x))/2$ ),经Pe点对X

轴做垂线M,并与S1、S2及SS1三曲线分别相交于A1、A2及Q,分别算出三者的实验信号,即y或SSD1值;

(3)编程以建立以复合HB双向剂量反应曲线为参比对象的血清学均相免疫实验定量分析系统;

#### 4)浓度参比标准品及设定

设定当次常规参比标准品,以步骤2建立的HB双向剂量反应曲线为基础,其浓度以大致达成双向曲线的下述线性区位为目标,具体设定包括:①本底核对参比,0靶物质,阈值设定参照;②敏感性控制参比,低浓度端,曲线正态分布的三阶导数的围起点处;③线性状态控制,左右拐点附近,正态分布曲线的围二阶导数起点处;④Y值高点控制,正态分布曲线的围一阶导数起点(即围顶点)处;⑤类Hook效应控制点设定,其浓度设定以所产生实验信号在强度上与敏感性控制参比品所产生的实验信号相对应;

#### 5)实验结果分析:

(1)通过浓度参比标准品检测、数据的输入、调出适宜当次结果分析,即前述步骤2)、3)建立的数据分析系统;通过A1界点可将S1双向曲线不对称地分为左右两部分,顶点P1位于界点A1的左侧,其中右侧高x值区段为实验结果判读区段;通过A2界点可将S2双向曲线不对称地分为左右两部分,顶点P2位于界点A2的右侧,其中左侧低x值区段为实验结果判读区段;通过实验标本序号的输入锁定待分析实验标本实测与计算数据;通过测定标本SSD1与Q值的比较确定待测标本参比分析的曲线及相应区段,即当测定标本的SSD1大于Q值时,根据其T2时点测值y在S2曲线的左侧区段查读实验结果;当测定标本SSD1小于Q值时,根据其T1时点测值y在S1曲线的右侧区段查读实验结果;

(2)采用输入参比标准品检测数据所调出的前述步骤2)、3)建立的数据分析系统中的阈值对上述5)(1)项分析结果做进一步分析,其S2测值小于对应曲线阈值者为阴性,所述对应曲线阈值为阴性孔均值乘以2.1倍;

(3)采用输入参比标准品检测数据所调出的前述步骤2)、3)建立的数据分析系统中的类Hook效应控制点对上述步骤5)(1)项分析结果做进一步分析,其S1测值小于对应曲线类Hook效应控制点参比信号者为存在类Hook效应影响的实验标本,靶物质浓度高于类Hook效应控制点,定量分析结果仅供参考,该结果以定性方式报道为超高浓度阳性;

(4)经上述分析后,根据被分析标本所测得的实验信号Y,在相应的曲线区段进行函数x的计算,将计算的对数结果转化为实际检测浓度并报道实验结果。

2. 根据权利要求1所述的血清学检测定量分析的方法,其特征在于:所述的血清学检测是指均相免疫,类均相免疫,及其它抗原、抗体及其实验信号生成系统三者存于同一实验体系中,能在一定时段内实施二次以上实验信号探测,且不妨碍体系中免疫反应进程,不影响所依托常规实验方法原有检测结果的实验方法。

3. 根据权利要求1所述的血清学检测定量分析的方法,其特征在于:步骤1)所述的待测标本系指需要进行免疫检测的含或不含靶物质的溶液。

4. 根据权利要求1所述的血清学检测定量分析的方法,其特征在于:步骤1)所采用的试剂包括免疫试剂、信号生成试剂、连接试剂、信号展示与强化试剂中的一种或一种以上。

5. 根据权利要求1所述的血清学检测定量分析的方法,其特征在于:步骤1)所述的反应时间设定取决于所依托实验免疫反应的进程,主要反应时点设定为:T0时点,即抗原与抗体

在实验方法规定的免疫反应条件下混合并开始免疫反应过程的时点;T1时点,免疫反应过程中第一次进行实验信号检测的时点;T2时点,免疫反应过程中第二次进行实验信号检测的时点;免疫反应的时段规划为T1时段:T0至T1时点所间隔的时间段;T2时段:T0至T2时点所间隔的时间段;免疫反应的总时段长度因实验方法不同及其对实验结果的要求不同而有所区别,其范围限定在2-60min之间,T1与T2时段长度的比例为0.1到0.95。

## 一种血清学检测与定量分析的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外免疫分析技术领域,具体地涉及一种在检测实验样本时能拮抗浓度依赖性Hook效应干扰,并能拓宽靶物质定量检测范围的检测方法。

### 背景技术

[0002] 血清学检测以抗原抗体的免疫结合为依托,实验状态下,参与反应的抗原抗体的分子特征、免疫复合物(Immune complement, IC)的分子大小、数量多寡及其产生实验信号的能力(强弱)是血清学检测动力学研究的主要内容。在血清学检测建立的早期,学者们发现在同一的实验体系内,被检测抗原的浓度与实验信号的强度呈正相关(相关关系以 $Y=ax+b$ 描述),并将这一现象用于对被检测物质浓度状态的评价。随后研究者发现,实验信号与靶物质浓度的直线相关只能保持在较为狭小的浓度范围,由此造成的定量范围狭窄是当前血清学检测技术的主要缺陷。超出此浓度范围即表现出潜带(包括前带与后带)现象,即由两者构成的函数曲线在高低浓度端出现定向弯曲。这种曲线偏离的特征又被称为Hook效应(即钩状效应)。稍后(上世纪初叶),Heidelberger等对这一现象做系统的研究,发现随着靶物质浓度持续的序贯升高,实验信号由低升高,达一定程度后再由高降低(并最后可望回归到阈值状态),其函数图像在常数坐标上呈偏锋状态序贯升降的双向曲线状态,在半对数坐标上则构成与正态分布类似的序贯升降的双向曲线状态。该曲线状态的形成原因在低浓度端取决于实验标本中被测定物质的浓度,而中、高浓度端则取决于实验体系中抗原与抗体两者的分子比例改变,及由此造成的免疫复合物分子信号生成能力的序贯性降低。由于这一研究对免疫反应动力学的阐述至关重要,后来者便以发现者名字命名,将根据该结果绘制的函数图像称之为Heidelberger双向剂量反应曲线(HB双向剂量反应曲线,简称HB双向曲线)。

[0003] 需要注意的是,Heidelberger等所处时代实验条件十分局限,后来学者的研究亦多数局限在对该结果的承袭与验证,实验结果相对粗糙且未能排除多种因素干扰,因而使这项极具理论价值的研究未与血清学检测的技术实践发生关联。

[0004] 综上所述,在实验技术发展臻于完备的当今,Hook效应成为制约血清学检验技术发展的主要因素,定量范围狭窄为广义的Hook效应的一种表现形式。随着标记免疫学技术在敏感性上的大幅提升,尤其是在某一时段内我国部分固相免疫实验的反应方式由经典的二步法转变为一步法(如一步法ELISA),并在临床检验中大量普及应用后,由Hook效应引起的检验结果失真甚至错误便成为一个较为常见的临床现象。它的存在严重妨碍了科研数据的准确性,并对临床诊断、治疗及其预后的判断造成显然的负面影响。如果发生于某些特殊临床检测如采用一步法ELISA或化学发光技术进行血清HBsAg筛选,则可造成50%或以上临床标本的定量结果偏离真值,部分强阳性标本测值降低或显著降低,甚至导致个别具有高度传染性的强阳性标本出现假阴性结果。这种漏检一旦发生在献血员筛选,则势必导致输血相关性肝炎的严重临床事件。

[0005] 二步法免疫(如二步法ELISA等)作为对Hook效应拮抗的一种方式,能将一步法结

果中低信号高值及假阴性结果转换成高信号溢值状态,但不能改变该部分标本定量结果偏离真值的状态,其定量范围亦未得到拓展。

[0006] 上世纪九十年代初,有学者对血清学检测中免疫反应时间与实验信号消长进行研究,发现随着反应时间的延长,实验信号强度增加,在相同间隔时段内检测,不同浓度标本实验信号增长的幅度不同,研究者据此找出能界定Hook效应发生时的最佳信号增长比率,以其做界点判定被测定标本有否发生Hook效应,并对出现Hook效应者进行稀释重测,取得理想的结果。该方法随后作为判定并矫正Hook效应的措施进入商业化临床应用,取得了较好的社会效益;Kornel Papik等对上述免疫反应动力学现象进行了进一步研究,在进一步系统印证上述现象的同时,提出一项拮抗Hook效应并同时拓展定量分析范围的新方法,将其用于血清铁蛋白的检测,取得了十分理想的实验结果;国内刘忠民等(2000年)采用相同的实验手段进行血清IgG检测,在进一步阐述HB双向剂量反应曲线特征的同时,还发现与Kornel Papik研究雷同的实验信号依时性改变可同时出现在抗原过剩及抗体过剩等两种实验状态下,从而使后来者有理由推断此类Hook效应拮抗方法可望同时用于抗原与抗体两者的检测。

[0007] 上述研究结果表明,HB双向剂量反应曲线是一个抗原抗体反应过程中客观存在的实验现象,尽管在良好的试验状态下,其曲线的各个部分均不同程度地具备稳定的剂量相关特征,但既往研究者一直未能将其用于血清学检测结果的定量参比分析。其原因可能包括①既往研究者对HB双向剂量反应曲线的特征缺乏深入认识;②既往沿用的函数分析方式(直线回归, $Y=ax+b$ )不能进行Hook现象处理,而简单的曲线回归难以在整体曲线上达成定量分析所需要的实验精度;③既往多数实验方法因实验过程、试剂、仪器等原因难以呈现适宜参比的曲线状态;④如何在双向反应曲线上与同一实验信号(Y)对应的两个靶物质浓度对映值中确认实验标本的靶物质浓度真值;以及⑤如何矫正HB双向曲线围顶点区段因顶点效应而导致的局部定量分析精度明显下降。这些技术难点的解决是推动HB双向曲线由理论走向实际应用的前提。

[0008] 均相免疫(包括由微球吸附技术参与的类均相免疫)实验指全部的反应与结果的观察均在同一个液相环境中进行的免疫学检测方法,操作过程比其它类型的血清学实验简洁。免疫沉淀(与免疫凝集)实验,光激发化学发光免疫分析实验(Light Initiated chemiluminescence assay, LiCA),以及均相酶免疫分析是这类方法的主要代表,亦是目前已经(或正在)商品化的主要均相免疫技术。例如我国近年推出的血清HBsAg检测光激发化学发光实验,具有很高的敏感性、便捷性与稳定性,定量检测范围等诸多实验品质亦与电化学发光等优秀检测技术相当,但因受Hook效应影响较固相免疫实验方法为甚,且不存在部分纠正Hook效应的过渡性措施(如固相免疫试验中的二步法免疫实验等)而造成大量无法定量与错误定量结果,不仅远未能占有应得的市场份额,反而与一步法ELISA等传统技术一起被排除于献血员筛选等规模化市场应用的行列。

[0009] 因此,本领域需要一种旨在纠正Hooks效应并拓展血清学检测定量范围的简便易行的血清学检测分析方法。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的是提出一种血清学定量检测及分析新方法。该方法以均相免疫或类

均相免疫技术为依托,能全方位保持原有血清学实验的技术特征,可用于抗原或抗体的检测,能拮抗浓度依赖性Hook效应干扰,并极大拓宽靶物质定量检测范围。

[0011] 上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0012] 一种旨在纠正Hook效应并拓展血清学检测定量范围的血清学检测方法,包括如下步骤:

[0013] 1、实验过程:在存在标记与未标记对应免疫反应试剂(抗原及抗体)及信号生成相关试剂的实验孔(管,或其他载体容器)中分别加入参比标准品、拟 合样品、阴阳性对照或待测标本,混合后放置,以使其发生免疫反应,并产生可供测定的实验信号,于发生免疫反应的T1、T2时点分别进行实验信号S1、S2的检测;将其输入专项实验分析系统进行处理,并按照实验者指令输出实验结果;

[0014] 2、函数关系的拟合:

[0015] 1)同上实验条件下,采用超过100个浓度点样本,浓度范围设定涵盖HB双向曲线有效分析区段图像,浓度区间设定为质点间间隔0.025—0.10横轴(X轴)读数距离,对此参比标准品进行10次或以上重复实验,取每个浓度点各次检测的实验信号平均值作为该点对应的实验信号进行高密度函数拟合分析;

[0016] 2)将所生成的实验信号输入人工智能分析系统,人工智能分析系统的后台路径概况:

[0017] ①输入T1及T2两时点检测的实验信号值S1及S2;

[0018] ②计算出受检标本T1及T2时点S1与S2的比值,包括实验信号饱和度等;将实验信号饱和度转换成饱和度指数(Signal Saturation degree index,SSD1),转换方法为 $(S1/S2) \times 100 \times e$ ,e为转换系数;

[0019] ③在平面半对数坐标图像上,根据系列参比标准品测定所获取的实验信号S1及S2,分别绘制出S1及S2两条Heidelberger双向剂量反应曲线,并将饱和度指数按照各自对应靶物质浓度依次标绘到前述半对数函数图像中,绘制出相应的信号饱和度指数曲线SS1,此三条曲线构成复合HB双向剂量反应曲线图像分析体系,其中Y轴为实验信号强度或SSD1,X轴为靶物质浓度的对数数值;

[0020] ④采用拟合法确证HB双向曲线中函数x与y(以及SSD1)的关系。

[0021] 通过拟合实验证实,HB双向剂量反应曲线图像中各HB双向曲线上的实测点(y)与其所对应的函数值(x)之间的关系可采用以下公式表述:

[0022]  $f(x) = a \times \exp\left(-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2\right)$ , 拟合效果 $R^2 \geq 0.99$

[0023] 其中x:为靶物质浓度的自然对数;a:修正参数;b:对数均值;c:标准差;f(x)=实验信号(y);

[0024] HB双向剂量反应曲线图像中信号饱和度指数曲线(SS1)上各实测点(SSD1,限两HB双向曲线图像内侧点值)及其与所对应的函数值(x)之间的关系可以采用以下公式表述。

[0025]  $f(x) = a + b \times x$ , 拟合效果 $R^2 \geq 0.95$

[0026] 其中x:为靶物质浓度的自然对数;a:截距(当x=0时,Y的取值本底信号的大小);b:斜率(x变化一个单位时Y的增减量);

[0027]  $y = f(x) = SSD1 = (S1/S2) \times 100 \times e$ (e为转换系数);

[0028] 3、(拟合)函数图像分析界点的确定

[0029] 1)计算两HB双向曲线的顶点P1及P2,公式: $P(y) = f(x) = \mu$ ,其中, $\mu = b$ (见前曲线回归公式),即实验数据模拟出的模型参数的对数均值,为P1或P2在顶点对应的浓度对数值;

[0030] 2)确认两顶点在X轴读数差值的中点Pe(公式: $Pe(x) = (P1(x) + P2(x)) / 2$ ),经Pe点对X轴做垂线M,并与S1、S2及SS1三曲线分别相交于A1、A2及Q,分别算出三者的实验信号(y,或SSD1)值;

[0031] 3)编程以建立以复合HB双向剂量反应曲线为参比对象的血清学均相免疫检测定量分析系统;

[0032] 4、浓度参比标准品及设定

[0033] 设定当次常规参比标准品,以步骤2建立的HB双向剂量反应曲线为基础,其浓度以大致达成双向曲线的下述线性区位为目标,具体设定包括:①本底核对参比,0靶物质,阈值设定参照;②敏感性控制参比,低浓度端,曲线正态分布的三阶导数的围起点处;③线性状态控制,左右拐点附近,正态分布曲线的围二阶导数起点处;④Y值高点控制,正态分布曲线的围一阶导数起点(即围顶点)处;⑤类Hook效应控制点设定,其浓度设定以所产生实验信号在强度上与敏感性控制参比品所产生的实验信号相对应;

[0034] 5、实验结果分析

[0035] 1)通过浓度参比标准品检测、数据的输入、调出适宜当次结果分析,即调出经修正的前述步骤2、3建立的数据分析系统;通过A1界点可将S1双向曲线不对称地分为左右两部分,顶点P1位于界点A1的左侧,其中右侧高x值区段为实验结果判读区段;通过A2界点可将S2双向曲线不对称地分为左右两部分,顶点P2位于界点A2的右侧,其中左侧低x值区段为实验结果判读区段;通过实验标本序号的输入锁定待分析实验标本实测与计算数据;通过测定标本SSD1与Q值的比较确定待测标本参比分析的曲线及相应区段,即当测定标本的SSD1大于Q值时,根据其T2时点测值y在S2曲线的左侧区段查读实验结果;当测定标本SSD1小于Q值时,根据其T1时点测值y在S1曲线的右侧区段查读实验结果;

[0036] 2)采用输入参比标准品检测数据所调出的前述步骤2、3建立的数据分析系统中的阈值对上述5、1)项分析结果做进一步分析,其实验标本S2测值小于对应曲线阈值(阴性孔均值乘以2.1倍)者为阴性;

[0037] 3)采用输入参比标准品检测数据所调出的前述步骤2、3建立的数据分析系统中的类Hook效应控制点对上述步骤5、1)项分析结果做进一步分析,其实验标本S1测值小于对应曲线类Hook效应控制点参比信号者为存在类Hook效应影响的实验标本,该标本靶物质浓度高于类Hook效应控制点,其结果以定性方式报道为超高浓度阳性,定量分析结果由下述步骤5、4)提供,仅供参考;4)经上述选择分析后,根据被分析标本所测得的实验信号Y,在相应的曲线区段进行函数x的查读,将查读的对数结果转化为实际检测浓度并报道实验结果。复合HB双向剂量反应曲线图像分析系统的构成流程见图1。

[0038] 优选地,这种血清学定量检测方法是指均相免疫,类均相免疫,及其它抗原、抗体及其实验信号生成系统等三者存于同一实验体系中,能在一定时段内实施二次以上实验信号探测,且不妨碍体系中免疫反应进程,不影响所依托实验方法原有检测(即常规检测方法)结果品质的实验方法。

[0039] 优选地,这种血清学定量检测方法中所述的待测标本系指需要进行免疫检测的含或不含靶物质(抗原或抗体)的溶液,如血清、体液、培养物上清及其它包含抗原与抗体的实验材料。

[0040] 优选地,这种血清学定量检测方法中所采用的试剂包括免疫试剂、信号生成试剂、连接试剂、信号展示与强化试剂中的一种或一种以上。

[0041] 优选地,这种血清学定量检测方法的实验设置中,其反应时间设定取决于所依托实验免疫反应的进程,主要反应时点设定为:T0时点,即抗原与抗体在实验方法规定的免疫反应条件下混合并开始免疫反应过程的时点;T1时点,免疫反应过程中第一次进行实验信号检测的时点;T2时点,免疫反应过程中第二次进行实验信号检测的时点;免疫反应的时段规划为T1时段:T0至T1时点所间隔的时间段;T2时段:T0至T2时点所间隔的时间段;免疫反应的总时段长度因实验方法不同及其对实验结果的要求不同而有所区别,其范围限定在2-60min之间,T1与T2时段长度的比例为0.1到0.95。

[0042] 本技术方案在半对数坐标图像中,HB双向剂量反应曲线图像的信号消长轨迹呈序贯的双向变化,实验信号强度与靶物质浓度变化的函数曲线呈平滑的剂量相关。其半对数坐标上的轨迹表现为显著的正态分布图像。采用曲线回归处理,该HB双向剂量反应曲线图像上各实测点所对应的函数值可以采用公式  $f(x) = a \times \exp\left(-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2\right)$  拟合,并取得极好的拟合效果( $R^2 \geq 0.99$ )。在实际检测中,当获取待测标本实测信号(y)后,通过上述公式,可以准确地求出双向曲线上类Hook效应点内(除围顶点区段以外)任意信号强度实验标本的靶物质浓度。这一发现为将HB双向剂量反应曲线用于血清学检测定量分析提供了理论基础。

[0043] 免疫反应过程中实验信号强度的依时性变化的主要特点:既定时段内实验信号随反应时间延长而增强;不同时点信号强度之间的比率与实验标本中靶物质浓度相关;两时点测值的相关关系可以多种比较方式加以表达,将其中实验信号饱和度指标转换成饱和度指数(Signal Saturation degree index,SSDI,在实施例1中的转换方法为 $(S1/S2) \times 100 \times 10000$ )。并将其绘制到半对数坐标图像中,发现,随着靶物质浓度的升高,其曲线(Curve of Signal Saturation degree Index,SSI,信号饱和度曲线)的图像呈左高右低的序贯性下降趋势。这一趋势在图像核心区段(即双向曲线两拐点之间图像区域)尤其明显。经公式  $f(x) = a + b \times x$  拟合,拟合效果  $R^2 \geq 0.95$ 。

[0044] 基于以上技术特征,本技术方案首次提出复合HB双向剂量反应曲线图像分析法。该法图像由两条根据不同时点测值获取数据(T1及T2时点,测得的S1及S2信号)绘制的HB双向剂量反应曲线(S1曲线及S2曲线)、一条SSI曲线,根据定量分析的需要加入的其它辅助线段与界点等,其构成与分析路径可以图1方式概括。该分析体系的建立为本专利的实施铺平了道路。

[0045] 本发明相对于现有技术具有如下创新之处:

[0046] 1、提出将HB双向剂量反应曲线作为血清学检测定量分析的参比对象;

[0047] 2、通过采用半对数法处理,使HB双向剂量反应曲线由原来的直线-弧线混合方式转变为单纯的曲线方式。在HB双向剂量反应曲线的参比分析上引入曲线回归,并以此取代传统的直线回归参比,在数学分析上为这一分析方式的建立提供了理论基础;

- [0048] 3、将实验信号的时间依赖性特征引入复合HB双向剂量反应曲线分析体系,解决了以单时点双向曲线作参比时,“假性对映值”对实验结果(真值)的干扰;
- [0049] 4、利用参比图像中两条HB双向剂量反应曲线的顶点出现依时性摆动的现象避开围顶点效应对实验结果的干扰,从而在整体上提升定量分析结果的实验精度;
- [0050] 5、依据正态分布三阶导数的结构特征设定参照品靶物质浓度,为采用HB双向曲线参比法定量分析时参比标准品的制备提供了理论依托;
- [0051] 6、类Hook效应界点的设置,既从理论上界定了实验方法的分析上限,又为发现因含极高浓度靶物质而出现定量精度降低的标本提供可能。
- [0052] 7、对不同时间点采集的两条HB双向剂量反应曲线实施分别拟合,分段拟合及其分别应用,为提升定量分析结果的精度提供了重要的保障。
- [0053] 因此,本发明在不增加实质性操作,不影响所依托方法基本品质的前提下,能够达到纠正Hook效应,并显著拓展所依托实验方法的定量检测范围的目标。

### 附图说明

- [0054] 图1为复合HB双向剂量反应曲线图像分析系统核心构成框图;
- [0055] 图2为先BA结合型多时点LiCA血清HBsAg检测复合HB双向剂量反应曲线;
- [0056] 图3多个不同时间点进行信号采集获得的复合HB双向剂量反应曲线图像;
- [0057] 图4为后BA结合LiCA血清抗HBc检测复合HB双向剂量反应曲线;
- [0058] 图5为常规免疫沉淀实验标准曲线示意图;
- [0059] 图6为血清人IgG时间依赖性多时点絮状免疫沉淀检测复合HB双向曲线;

### 具体实施方式

[0060] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0061] 一、本文所用各术语解释如下:

[0062] 1、抗原、抗体剂量-反应曲线(又称为Heidelberger双向剂量反应曲线,简称HB双向曲线):

[0063] 由Heidelberger于上世纪初发现,即在既定抗体浓度下做免疫沉淀实验,沉淀物的量随着靶抗原浓度增加而成比例增加,当抗原浓度的增加到一定程度后,所产生沉淀物的数量不再增加,继而降低,最后回到阈值状态,所产生信号的函数图像在常数坐标上呈偏锋状态序贯升降的双向曲线状态,在半对数坐标上则构成与正态分布类似的序贯升降的双向曲线状态,不同实验状态下的曲线表达存在一定差别。该曲线状态的形成原因在低浓度段取决于实验标本中被测定物质的浓度,而中、高浓度段则取决于实验体系中抗原与抗体两者的分子比例,及由此造成的免疫复合物分子信号生成能力的序贯性降低。采用敏感性更高的试验方法(如LiCA)可以使这一变化体现得更为显著。由于这一研究对免疫反应动力学的阐述至关重要,后来者便将根据该结果绘制的函数图像以发现者名字命名为Heidelberger双向剂量反应曲线(HB双向剂量反应曲线)。

[0064] 2、Hooks效应:

[0065] Hooks效应(Hook effect,钩状现象)与既往血清学检测中的“带效应”相关,是一

种存在于多种血清学检测中的量(靶物质浓度)效(检测信号)分离现象。其表现为当反应体系中靶物质,包括抗原或抗体的浓度升高到一定程度后,所产生的检测信号在其函数坐标图象上不能按照其既往比例关系进一步延长,而是脱离原有曲线的线性关系趋势而表现出定向弯曲的实验现象。采用既往定量方法分析,这一现象在二步法免疫检测中的表现为中、高或超高浓度标本在定量检测中的失定量(不能报道明确的定量结果,即溢值现象)状态;在一步法免疫检测中,其检测结果因标准曲线在较高浓度状态表现为明显的弯曲而出现检测结果的量效分离,当其浓度进一步升高时,则表现出检测结果的失定量及定量错误(低信号高值状态),甚至出现假阴性结果。

[0066] 3、均相免疫技术:

[0067] 是一种在同一实验体系中同步或序贯进行免疫反应、实验信号形成反应、及实验信号检测等多项实验过程的免疫学实验技术。

[0068] 4、固相免疫技术:

[0069] 参与反应的免疫物质(包括其它试剂)至少有一项吸附在固相载体上,其免疫结合反应发生在液相与固相之间,反应产物附着在固相载体的表面,实验反应的中间及完成阶段需要进行反应产物与未反应物质的分离。操作相对繁琐是该类方法的主要缺点。

[0070] 5、类均相免疫技术:

[0071] 微球载体的应用赋予部分固相免疫实验以新的技术特征。免疫凝集实验即为这类特殊固相免疫实验的代表。该实验参与反应的免疫物质(如游离抗原)分别分布在液相及固相载体(乳胶颗粒,血球,或其它颗粒性物质)表面,其免疫反应经液相转运而在固相载体的表面进行,此过程符合固相免疫反应的技术特征。但实验反应的中间或完成阶段不需要进行反应产物与非反应物质的分离。此外,由于实验信号的检测能在上述全部反应物质同时存在的状态下进行,不仅使实验操作显著简化,还为在同一时段内的不同时点进行多次重复信号探测提供了可能。这些特征与前述均相免疫实验的部分特征相同。

[0072] 由于同时具备均相免疫与固相免疫实验的双重特征,该类方法在分类上显然介于固相免疫及均相免疫之间。但因其部分均相免疫特征能为该类实验的技术拓展提供更大空间,不少学者将其直接归类到“均相免疫实验”。申请者则认同部分学者“类均相免疫试验”的表述,并认为该表述能更加客观地凸显该类方法的技术特征。

[0073] 6、围顶点效应:

[0074] 在HB双向曲线上围绕顶点及其附近的曲线区段,由于该区段各点所构成的弧线与横轴几近平行,且越接近顶点的部位(点)该现象越明显,采用此区段曲线进行实验结果的参比定量分析,其定量精度将显著低于HB双向曲线的其它区段,由此造成的影响称之为围顶点效应。

[0075] 7、围顶点区段:

[0076] 采用HB双向曲线参比分析时的围顶点效应如前所述。在参比分析时出现显著围顶点效应的曲线区段称为围顶点区段。此区段曲线用于对实验结果的参比分析,其定量精度显著低于HB双向曲线的其它区段。

[0077] 8、T<sub>0</sub>:

[0078] T<sub>0</sub>指实验体系中加入全部免疫反应试剂与标本,经混合并开始发生免疫反应的时点,此时点获取的实验信号为该实验的本底信号。

[0079] 9、T1时点及T1时段：

[0080] T1指用于定量分析的第一次实验信号采集的时点。其免疫反应的时间为自T0到T1两时点之间的时间长度，该长度称为T1时段。

[0081] 10、T2时点及T2时段：

[0082] T2指用于定量分析的第二次实验信号采集的时点。其免疫反应的时间为自T0到T2两时点之间的时间长度，该长度称为T2时段；

[0083] 11、S1信号与S1双向曲线：

[0084] S1为各实验标本在T1时点测定所得到的实验信号值。S1双向曲线为根据在T1时点所获取的系列浓度标准参比品实验信号强度值在复合HB双向曲线图像上所绘制的HB双向剂量反应曲线。

[0085] 12、S2信号与S2双向曲线：

[0086] S2为各实验标本在T2时点测定所得到的实验信号值。S2双向曲线为根据在T2时点所获取的系列浓度标准参比品实验信号强度值在复合HB双向曲线图像上所绘制的HB双向剂量反应曲线。

[0087] 13、信号饱和度指数(SSD1)与饱和度指数曲线(SS1)：

[0088] 将某一实验标本或既定浓度参比品系列在不同时点进行检测，以高信号测值S2为分母进行比较将所获得的S1/S2比值转化为百分数(即为信号饱和度)，再分别乘以适当的转化系数(e, 实施例1中e为10000)，所得到的数值即为信号饱和度指数(Signal Saturation degree index, SSD1)。根据此指数与横轴对应函数x所绘制的曲线称为信号饱和度指数曲线(SS1)。

[0089] 14、复合HB双向曲线分析系统：

[0090] 为适应本专利方式而建立的一种HB双向曲线分析图像方式。它包括以实验信号实际值为纵坐标，靶物质浓度的对数为横坐标的一组函数坐标体系；两条根据不同检测时点T1、T2检测所获取的实验信号值而绘制的HB双向剂量反应曲线，即S1、S2双向曲线；一条根据信号饱和度指数SSD1与各自对应的靶物质浓度绘制的信号饱和度指数曲线(SS1)，在曲线的低靶物质浓度段，SSD1指数较高，随着靶物质浓度的逐渐升高，其信号饱和度指数曲线逐步降低，这一变化趋势就整体而言呈平滑且略带S状图像，在双向曲线图像内侧的中段(约为双向曲线的两拐点之间)曲线的线性趋势符合 $Y=a+b \times x$ 规律。具体见图2。

[0091] 15、顶点：

[0092] HB双向曲线上实验信号强度的最高点，称为顶点。复合HB双向曲线图像中，S1与S2两双向曲线的顶点分别为P1、P2。

[0093] 16、顶点摆动现象：

[0094] 在复合HB双向曲线图像中，根据不同时点采集信号所绘制的S1与S2两条HB双向曲线的顶点不在同一条针对横轴的垂线上，所对应的函数x(横轴上的靶物质浓度)亦不同，由此导致曲线顶点随着反应时间的延长或缩短而呈现左右(即横轴靶物质的低浓度端与高浓度端)摆动的现象称为顶点摆动现象。在同一实验体系既定的反应时段内，其顶点摆动的幅度取决于两曲线信号采集时间的间隔长度。具体见图2及3。

[0095] 17、辅助线M：

[0096] 确定HB双向曲线的顶点(P1及P2)及其两者在横轴上的投影值，确认两投影点的X

轴读数差值的中点 $P_e$ ，经 $P_e$ 点对X轴所做垂线为辅助线M，辅助线M因其与横轴及S1、S2、SS1等相交并产生 $P_e$ 、A1、A2及Q等重要分析界点，又称为界点承载线。具体见图2。

[0097] 18、A1：

[0098] 在复合双向曲线图像中，辅助线M与S1双向曲线的交点称之为A1，该点将S1双向曲线分为左右两部分，曲线右侧部分不含顶点及其围顶点区段，作为S1曲线的有效判断区段分析实验结果可避免围顶点效应的干扰，具体见图2。

[0099] 19、A2：

[0100] 在复合双向曲线图像中，辅助线M与S2双向曲线的交点称之为A2，该点将S2双向曲线分为左右两部分，曲线左侧部分不含拐点及其围顶点区段，作为S2曲线的有效判读区段分析实验结果可避免围顶点效应的干扰，具体见图2。

[0101] 20、Q：

[0102] 在复合双向曲线图像中，辅助线M与SS1曲线的交点称之为Q(又称为界点Q)点，该点是区分被测定标本实验结果判读曲线及曲线部位的界点。根据被测定标本SSD1值与Q值的比较将其分为两组，SSD1值大于Q者根据S2测值在S2双向曲线左侧查读实验结果，SSD1值小于Q者根据S1测值在S1双向曲线右侧查读实验结果，具体见图2。(相关界点间横轴函数值关系： $P_e(x) = (P_1 - P_2) / 2 = Q = A_1 = A_2$ )

[0103] 21、先BALiCA与后BALiCA：

[0104] 当前市售LiCA在实验试剂体系中引入了生物素抗生物素系统(BAS)，其目的在于增强免疫物质结合的速率与实验信号生成的稳定性。BAS的介入使LiCA的实验过程包含了抗原抗体结合及生物素抗生物素结合等两项主要的生物学反应。理论上讲，两者的反应可在同一体系中同步发生，也可因加入顺序的不同而序贯发生。在实际应用中，我们将分别含生物素与抗生物素的试剂在免疫反应前预先混合，让其发生BA受体结合反应，然后加入被检测物质进行免疫反应的实验方式称之为先BALiCA，而将先加入免疫试剂(含生物素标记的免疫反应物)与被检测物质做免疫反应，然后再加入抗生物素标记微球并进行BA结合反应的LiCA实验称之为后BA免疫反应。多时点检测LiCA同时适用于上述两种实验反应方式，能取得大致相同的实施效果，但因多时段反应及多次信号探测费时较常规LiCA为多，而先BALiCA的实施在反应时段的安排上较后BALiCA能为本申请方法提供更大的空间。上述分类同时适宜其它受体反应与抗原抗体反应同时存在的实验方法。

[0105] 22、真值与假性对映值

[0106] 在采用双向曲线进行参比时，每一标本在某时点所取得的单一实验信号在对应曲线图像上均存在两个呈镜像状态，且高低迥异的靶物质浓度数值。申请者将能代表靶物质浓度的数值称为靶物质浓度真值，而将另一数值称为“假性对映值”。

[0107] 【实施例1】时间依赖性多时点分析方法在光激发化学发光(LiCA)(以下简称多时点LiCA)检测血清中HBsAg的应用(先BA结合型LiCA实验)

[0108] (一)实验材料

[0109] 1. 仪器与耗材

[0110] 1) 实验仪器：LiCAHT光激化学发光检测仪，中国博阳生物(上海)科技有限公司制造。

[0111] 2) 人工智能数据处理系统：自制软件处理系统。

- [0112] 3)实验耗材:同上由中国博阳生物(上海)科技有限公司提供。
- [0113] 2.实验试剂和标本
- [0114] 1)LiCAHBsAg检测试剂由中国博阳生物(上海)科技有限公司生产,市售获得。包括:
- [0115] 试剂1:R1.Anti-HBs包被发光微球;
- [0116] 试剂2:R2.生物素化的anti-HBs;
- [0117] 试剂3:R3.包被链亲和素(SA)的感光微球;
- [0118] 试剂4:实验稀释系统,市售试剂系统携带;
- [0119] 2)参比标准品
- [0120] ①自制参比品储存液:自感染者血清中纯化(密度梯度离心法,BSA参比光谱吸收法定量),浓度7.62mg/ml,置-30℃冻存。
- [0121] ②自制参比品:该提取物采用实验稀释系统调整浓度(2400.0μg/ml),经浓度标定后稀释,适量分装,-30℃冻存,供室内标准参比,及回收实验标本使用。参比品浓度与数量的设定规则与HB双向曲线结构及其拟合方式关联并参照临床检测的方便程度(表1),具体使用浓度见表2。回收实验标本的设定参照表3。
- [0122] ③市售参比品:市售LiCA试剂盒随带,共6份。HBsAg浓度分别为:0.0ng/ml,0.6g/ml,4.6ng/ml,18.3ng/ml,200.0ng/ml,500.0ng/ml(定量上限500ng/ml)。
- [0123] 3)对照血清
- [0124] 阴性对照与阳性对照血清:市售试剂盒携带,用于域值确认,及试剂反应性评价。
- [0125] 4)检测标本:血清、血浆、体液、或体外培养物。
- [0126] 3.人工智能分析系统
- [0127] “复合HB双向剂量反应曲线图像法分析体系”,其宏观逻辑框架见发明内容。用于血清HBsAg检测的专项智能分析系统构建亦在上述分析系统的框架内完成(见后分析系统构建)。
- [0128] (二)实验步骤
- [0129] 1.实验准备:
- [0130] 取出所有试剂与标本,恢复至室温,按需调整至工作浓度。
- [0131] 2.实验操作
- [0132] 1)取试剂R2、R3等体积,混合,室温放置15min;
- [0133] 2)加至LiCA实验反应板各孔中,每孔(管)200μl;
- [0134] 3)加入R1(100μl/孔(管)),混合;
- [0135] 4)取待测标本,阴、阳性对照,及HBsAg定量标准血清系列各25μl,分别加至LiCA反应板各孔中,每份标本加一孔;
- [0136] 5)混合实验体系,置LiCA发光检测仪上,育温15min(此时间点即为T1)。(注意消除各孔间免疫反应时间差,下同);
- [0137] 6)在680nm激发,610nm波长检测条件下检测各孔实验信号(S1),并将各信号值输送至人工智能数据处理系统;
- [0138] 7)继续放置15min(达T2时点,即标本与实验体系混合后30min);
- [0139] 8)置LiCA发光检测仪上,680nm激发,610nm波长检测各孔实验信号(S2),并将信号

输送至人工智能数据处理系统；

[0140] 9)由人工智能系统根据实验者指令对上述实验信号进行综合分析,并报道检测结果。

[0141] (三)实验分析系统构建与应用

[0142] 1、专项靶物质(即HBsAg)检测分析系统的构建过程

[0143] 1)采用超过100个浓度点的系列HBsAg稀释标准参比品,浓度范围设定涵盖整个HB双向曲线有效图像,样本的浓度区间设定为质点间间隔0.025—0.05个横轴读数(X轴),进行10次或以上重复LICA检测,取每个浓度点各次LICA检测的实验信号平均值作为该点对应的实验信号；

[0144] 2)于整个反应体系混合后的不同时点(免疫反应经历的时点,T1及T2)检测实验信号(S1及S2)；

[0145] 3)将实验数据纳入人工智能分析系统,启动系统中曲线模拟程序,进行普通及高密度质点函数实验参比曲线图像模拟(一次或多次,整体模拟、分隔模拟与分段模拟相结合)。并据此形成用于血清HBsAg检测的实验结果分析体系；

[0146] 4)采用高溯源质控物以同上方式对上述曲线进行模拟核对(可用低密度拟合)；

[0147] 5)有选择性地将该程序用于不同地区检测单位,通过具体的田间实验验证并修正分析系统。

[0148] 2、复合HB双向剂量反应曲线图像法人工智能分析系统软件数据处理路径：

[0149] 1)获取并计算实验结果,得到S1、S2、SSD1三组数据；

[0150] 2)应用实验参比品检测数据输入,调出并修正机内储存实验体系,构建出适合当次实验使用的复合HB双向剂量分析曲线图像分析系统；

[0151] 3)通过对HB双向剂量反应曲线及其曲线回归分析方法的应用,为Hook效应的消弭及其定量范围的显著拓展提供有效的定量分析空间；

[0152] 4)综合应用S1双向曲线、S2双向曲线,及SS1曲线,三者间关系的分析结果,确认检测标本靶物质浓度(真值)查读所采用的曲线区段,以此解决双向曲线参比分析中的对映值现象对实验结果分析的干扰。

[0153] 5)应用顶点偏移(或称顶点漂移)的实验现象解决围顶点效应造成的局部区段(围顶点区段)定量分析精度下降的问题。(具体方法如示意图2所述)；

[0154] 6)利用类Hook效应判点,标识出曲线右侧低信号区段内定量分析精度下降的标本(该现象仅出现在极其罕见的超高靶物质浓度的实验标本中)；

[0155] 3、人工智能系统软件路径的图像法显示

[0156] 该系统运作的基本路径可以由复合HB双向剂量反应曲线图像加以显示。其具体绘制方法可简括为：①输入并处理全部数据,绘制出三条曲线(S1、S2、SS1)；②通过计算确认S1及S2曲线的顶点；③在人工智能软件引导下绘制N及M辅助线；④根据辅助线M与三条曲线的交点定位A1、A2及Q三点,并确认其函数点值(y与x)；⑤以此三点点值为参照确定结果查读区段,并查读被检测标本的靶物质浓度。上述界点均系通过解析函数法计算求得。

[0157] 4、实验结果分析技术路径

[0158] 1)输入实验标本序号,人工智能系统自动查读被检测标本当次实验中的信号检测强度S1、S2,计算其SSD1,并将其与当次分析系统选定的Q界点值进行比较,以确定实验结果

在图像分析系统上的查读区段；

[0159] 2):结果查读(计算)区段采信标准:

[0160] SSD1值大于Q值:根据T2时点信号强度在S2双向曲线A2界点的左侧查读检测结果;

[0161] SSD1值小于Q值:根据T1时点信号强度在S1双向曲线A1界点的右侧查读检测结果;

[0162] 3)阴阳性结果的判断

[0163] 以阈值(即空白孔实验信号 $\times 2.1$ )为界点判断,低于此值者为阴性;高于此值者为阳性,阳性者须做靶物质浓度的定量分析。

[0164] 4)阳性结果的定量分析

[0165] 依据各自测定数据(实验信号,即 $y$ ),采用公式法计算(由分析系统执行)被测定标本在S1及S2两条双向曲线上指定查读区内的靶物质浓度对数(即实验信号 $Y$ 的对应函数 $x$ ,

计算公式:  $f(x) = a \times \exp\left(-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2\right)$ ,计算方法参照分析系统建立,并反向进行。

[0166] 5)将所获取并采信的 $x$ 函数(浓度的对数数值)转换为靶物质浓度值( $\text{ng/ml}$ ),并根据实验者指令输出实验结果。

[0167] (四)实验结果

[0168] 1、血清HBsAg检测时间依赖性多时点光激发化学发光实验(以下简称多时点LiCA)的实验结果定量分析系统见图2。

[0169] 2、几项主要的分析数据

[0170] 实施HBsAg多时点LiCA检测所需要的有关中间数据由分析系统运算后取得,本次实验部分关键的界点数据见表1。

[0171] 表1 HBsAg检测先BA结合型多时点LiCA实验结果分析中间数据

[0172]

参数名称	位置与意义	确认方式	$y/x$ ( $\text{ng/ml}$ )
阈值(Y)	阴性结果判断标准	T1 阴性测值 $\times 2.1^*$	1843.8/设定阴性上限
P1(S1 曲线顶点)	S1 曲线中轴与该曲线交点	人工智能软件确认	1320735/872.26
P2(S2 曲线顶点)	S2 曲线中轴与该曲线交点	人工智能软件确认	2069357.1/1096.73
A1 点	辅助线M与S1曲线交点	人工智能软件判读	1288115.6/957.35
A2 点	辅助线M与S2曲线交点	人工智能软件判读	2023870.1/957.35
Q点(#)	辅助线M与SI曲线交点	人工智能软件判读	636680.0/957.35
类Hook效应界点	参比设定浓度最高值	人为设定,软件判读	11202/1200000

[0173] \*:表中阈值的计算方法系根据既往文献习惯沿用,亦可根据其它方式确认;#:辅助线M即为界点承载线,此线上各个界点值的 $x$ 值相同( $Pe(x) = (P1(x) - P2(x)) / 2 = Q = A1 = A2$ ), $y$ 值取自M与各曲线的交点。

[0174] 3、采用多时点LiCA检测标准参比品浓度及其定量分析实验结果见表2

[0175] 表2血清HBsAg专利法LiCA检测标准参比品浓度设定及实验结果

设定浓度	S1 信号	S2 信号	SI (饱和度指数)	设定理由 (示意设定)
0	868	1024	847700	空白(试剂本底),阈值计算

[0176]

	0.6	8323	8714	955000	低浓度, 敏感性评价 左侧围拐点监控 围顶点, 监测顶点 右侧围拐点监控 类Hook 效应提示
	36.6	366761	423778	865500	
[0177]	1171.9	1276232	2055648	620800	
	37500.0	217028	463101	468600	
	1 200 000	11202	22119	506442	

## [0178] 4、回收实验结果

[0179] 采用多时点LiCA对一组系列稀释的自制参比血清进行检测,并以前述建立(试验阶段)的人工智能系统对检测结果进行分析。实验结果见表3。

[0180] 表3血清HBsAg先BA结合型多时点LiCA检测回收实验结果

编号	设定浓度	S1 信号	S2 信号	SSDI*	回收浓度	回收率
1	0	768	1042	737044	N	N
2	0.6	8323	8714	955000	0.45	75.0
3	1.1	19684	20245	972200	0.96	87.3
4	2.3	31999	31731	1008400	1.95	84.8
5	4.6	59582	61842	963500	5.23	113.7
6	9.2	104549	117730	972900	8.79	95.5
7	18.3	213995	224137	954700	17.29	94.5
8	36.6	366761	423778	865500	38.12	104.2
9	73.3	549551	760484	722600	73.44	100.2
10	146.6	855505	1231242	694800	142.2	97.0
[0181]	293.2	1145062	1713942	668100	297.5	101.5
	586.5	1315844	1992092	660500	597.2	103.6
	1171.9	1276232	2055648	620800	1213.6	103.6
	2343.8	1130609	1941596	558300	2512.7	107.2
	4687.5	891561	1662912	536100	4496.3	95.9
	9375	631267	1240671	508800	9537.2	101.7
	18750	365278	813322	449100	19532	104.2
	37500	217028	463101	468600	36342	96.9
	75000	121825	243760	499700	73425	97.9
	150000	64775	130477	496400	142600	95.1
	300000	36549	72406	504700	265683	88.6
	600000	19618	37831	518600	523610	87.3
	1200000	11202	22119	506442	1137500	94.8

[0182] \*:饱和度指数:计算方法为 $SSDI = (S1/S2) \times 100 \times 10000$ ,不同实验方法所采用的系数不同;

## [0183] 5、临床检测结果

[0184] 1)采用多时点LiCA对一组临床标本进行检测,并与常规LiCA进行比较,结果见表4。72例未经筛选的临床患者,两法HBsAg阳性检出率均为16.7%。常规LiCA检测因Hooks效应导致的定量检测结果总体偏离率达50.0%。其中定量失报率(即因溢值状态而不能给出确切定量数据标本)为16.67%;定量错报率(结果偏离真值5倍以上)33.3%;

[0185] 表4先BA结合型多时点LiCA临床检测及其与常规LiCA的比较

编号*	检测结果 (ng/ml)		
	先 BA 结合型 LiCA	常规 LiCA	先 BALiCA/常规法 (%)
6	147.65	147.65	100.0
9	4236.43	243.81	1737.69
15	927.6	>500#	未比较
28	259.92	259.92	100.0
33	11246.89	115.42	9744.32
35	104.06	104.06	100.0
37	41.62	41.62	100.0
38	8426.42	144.73	5822.1
46	2143.72	>500#	未比较
59	0.75	0.75	100.0
62	9753.26	127.43	7653.82
71	132.46	132.46	100.0
有效统计数	12	10	16.67% (定量失报率) #
平均值	3118.43	111.83	2789

[0187] \*:血清采集当日检测单位的实验编号。#:常规LiCA检测未能报道确切浓度的标本。

[0188] 2)采用多时点LiCA对一组雅培化学发光定量检测溢值(二步免疫法,>250IU/mL,67份)的血清标本进行检测,并与常规LiCA进行比较。全部血清两法HBsAg检测均阳性,其浓度均值分别为6729.32±1396.26及217.85±69.73,前者均值为后者31.03倍。未发现浓度依赖性假阴性现象。其检测结果的浓度区间分布见表5。

[0189] 表5采用两种LiCA对一组雅培试剂HBsAg溢值血清检测结果

[0190]

实验方法	先BA结合多时点LiCA*	常规LiCA*
低浓度真值(200-500ng/mL)区	9/13.43	9/13.43
高浓度真值区(专利法)	58/86.57	无
高信号溢值(常规LiCA)区	无	6/8.96
低信号高浓度(常规LiCA)区	无	52/77.61
合计	67/100%	67/100%

[0191] \*:例数/百分率(以全体实验对象为100%)

[0192] (五)多时点LiCA检测的实验信号衍变特征

[0193] 采用同上实验方法进行检测,于免疫反应的不同时点(T1、T2、T3、T4、T5)进行实验信号(S1—S5)采集,并以同上方式将其绘制到复合HB双向剂量反应曲线图像(图3)中,结果显示,在既定的时段内,因反应时点改变而导致的实验信号强度变化并非局限于前述专利法中的某特定时点,而顶点摆动现象亦出现在所观察时段免疫反应的全过程。

[0194] (六)结论:

[0195] 1、方法敏感性:两法(多时点LiCA与常规LiCA)相同,<1.0ng/mL;

[0196] 2、定量范围:

[0197] 常规LiCA:1.0---500(1000)ng/mL;

- [0198] 多时点LiCA:1.0---100000~1000000ng/ml。
- [0199] 两者比较:专利法LiCA较常规LiCA拓展100~1000倍。
- [0200] 3、实施效果:
- [0201] 1)通过对HB双向剂量反应曲线及其曲线回归分析方法的应用,显著拓展常规LiCA的定量分析空间;
- [0202] 2)综合应用S1双向曲线、S2双向曲线及其SSI曲线三者关系的分析结果,确认检测标本靶物质浓度(真值)计算与查读所采用的曲线区段,以此解决双向曲线参比分析中的假性对映值对定量分析的干扰;
- [0203] 3)应用顶点偏移(或称顶点漂移)的实验现象,解决围顶点效应造成的局部区段参比定量分析精度下降的问题;
- [0204] 4)利用类Hook效应判点,标识出曲线右侧低信号区段内实验精度下降的标本(该现象仅出现在极其罕见的超高靶物质浓度的实验标本中)。
- [0205] 5)对不同时间点采集的两条HB双向剂量反应曲线实施分别拟合,分段拟合及其分别应用,为提升定量分析结果的精度提供了重要的保障。
- [0206] 【实施例2】时间依赖性多时点分析方法在光激发化学发光(LiCA)检测血清中抗HBc的应用(后BA结合型LiCA实验)
- [0207] 本实施例与实施例1不同之处在于检测对象为抗HBc抗体,实验方式为后BA反应LiCA。
- [0208] (一)实验材料
- [0209] 1、仪器与耗材
- [0210] 1)实验仪器:LiCAHT光激化学发光检测仪;
- [0211] 2)人工智能数据处理系统:自制软件处理系统,后台数据处理路径见专利说明及实施例1;
- [0212] 3)实验耗材:同上由中国博阳生物(上海)科技有限公司提供。
- [0213] 2、实验试剂和标本
- [0214] 1)采用市售试剂(中国博阳生物科技有限公司制造)。包括:
- [0215] 试剂1:R1.生物素化的HBcAg;
- [0216] 试剂2:R2.包被链亲和素(SA)的感光微球
- [0217] 试剂3:R3.HBcAg包被发光微球;
- [0218] 试剂4:实验稀释系统;同上市售试剂系统携带;
- [0219] 2)参比标准品:可同时采用市售及自制标准参比品。
- [0220] ①市售标准品:市售试剂盒随带,共6份。抗HBc浓度分别为:0.0IU/ml,0.3IU/ml,2.4IU/ml,13.2IU/ml,80.0IU/ml,200.0IU/ml
- [0221] ②自制参比标准品类:采用抗HBc强阳性既往HBV感染者血清,经抗HBc 活性标定后制备。制备物包括拟合实验用品、回收实验用品、参比实验用品,以及常规参比标准品等。制备原则与方法同实施例1;
- [0222] 3)对照血清
- [0223] 阴性对照与阳性对照血清为同上市售试剂盒携带,用于域值确认及试剂反应性评价。

[0224] 4)检测标本:血清、血浆、体液、或体外培养物

[0225] 3.人工智能分析系统

[0226] 抗HBc检测专项“复合HB双向剂量反应曲线图像法分析体系”,其宏观逻辑框架参见发明内容。其构建亦在上述分析系统的框架内介绍。

[0227] (二)实验步骤

[0228] 1.实验准备:取出所有试剂与标本,恢复至室温,按需调整至工作浓度与状态;2.实验操作

[0229] 1)取试剂R1及R3试剂适量,等体积混合,加至LiCA反应板各孔中,每孔(管)100 $\mu$ I;

[0230] 2)取待测标本,阴、阳性对照,及抗HBc定量标准血清系列各25 $\mu$ I,分别加至上述各反应各孔中,每份标本加一孔(或根据需要的任意孔),混合,育温10min;

[0231] 3)加入试剂R3,每孔175 $\mu$ I,混合,在机反应15min(达T1);

[0232] 4)在680nm激发,610nm波长检测条件下检测各孔实验信号(S1),并将各信号值输送至人工智能数据处理系统;

[0233] 5)继续放置15min,达T2时点;

[0234] 6)置LiCA发光检测仪上,680nm激发,610nm波长检测各孔实验信号(S2),并将信号输送至人工智能数据处理系统;

[0235] 7)由人工智能系统根据实验者指令对上述实验信号进行综合分析,储存及报道检测结果。抗HBc的浓度以IU/mI表示(本实施例以下同)。

[0236] (三)实验结果分析路径

[0237] 1、根据参比血清实验数据调取并修正储备的专项实验分析系统,形成供当次使用的血清抗HBc多时点LiCA检测复合HB双向计量分析系统;

[0238] 2、向专项人工智能数据处理系统内输入T1及T2两时点检测数据S1及S2,计算出受检标本的SSDI值;

[0239] 3、按照实施例1的方法确认实验体系中的相关界点数据(阈值,A1,A2及Q界点等);

[0240] 4、按照实施例1的方法对实验结果进行靶物质浓度的分析,并按指令输出实验结果;

[0241] 5、血清抗HBc检测LiCA实验复合HB双向剂量反应曲线图像分析法分析系统模拟见图4所示。

[0242] (四)实验结果

[0243] 1、时间依赖性多时点分析方法建立的光激发化学发光(以下简称多时点LiCA)检测血清中抗HBc的复合HB双向剂量反应曲线分析体系的图像法显示见图4。

[0244] 2、几项主要的分析数据

[0245] 表6血清抗HBc检测先BA结合型多时点LiCA实验结果分析中间数据

[0246]

参数名称	位置与意义	确认方式	Y (光子数) / x (ng/ml)
阈值(Y)	阴性结果判断标准	阴性测值 $\times 2.1^*$	1843.8/设定阴性上限
P1 (S1 曲线顶点)	S1 曲线中轴与该曲线交点	人工智能软件确认	1120735/207.9
P2 (S2 曲线顶点)	S2 曲线中轴与该曲线交点	人工智能软件确认	1259357/239.3
A1 点	辅助线 M 与 S1 曲线交点	人工智能软件判读	1096931/223.2
A2 点	辅助线 M 与 S2 曲线交点	人工智能软件判读	1233389/223.2
Q 点#	辅助线 M 与 S1 曲线交点	人工智能软件判读	889364/223.2
类 Hook 效应界点	S1 曲线, 最高参比点值	人工智能软件判读	10937/240 000

[0247] \*:表中阈值的计算方法系根据既往文献习惯沿用(空白孔信号均值 $\times 2.1$ ),亦可采用其它方式。

[0248] 3、当次实验参比实验数据(多时点LiCA参照品设定实验举例)

[0249] 表7简易后BA结合LiCA血清抗HBc检测标准曲线依托数据

	设定浓度	S1	S2	SSI	设定理由
	0	878	1028	854200	空白本底, 阈值计算
	0.12	8631	8714	990000	低浓度, 敏感性评价
[0250]	7.4	245261.0	254266.8	964581	左侧拐点控制
	234.5	1096931.0	1233388.9	889364	围顶点监控
	75000.0	229890	277861	827356	右侧拐点控制
	24000.0	10937	13271.4	824113	提示类 Hook 效应

[0251] 4、回收实验结果

[0252] 表8血清抗HBc专利法(简易后BA结合)LiCA回收实验结果

N	设定浓度*	S1	S2	SSI	回收浓度	回收率 (%)
1	0.0	878	1028	854085	N	N
2	0.1	5178.0	5228.0	990551	0.08	80.0
3	0.2	11934.0	12147.0	982465	0.19	95.0
4	0.5	19085.0	19038.0	1002458	0.39	78.0
5	0.9	36844.0	37105.2	992949	0.81	90.0
6	1.8	69120.0	70638.0	978510	1.74	96.7
7	3.7	132931.0	134482.2	988462	3.87	104.6
8	7.4	245261.0	254266.8	964581	7.91	106.9
9	14.7	430694.0	456290.4	943904	16.2	110.2
10	29.4	684486.0	738745.2	926552	31.2	106.1
[0253]	58.7	939566.0	1028365.2	913650	55.8	95.1
	117.3	1085608.0	1195255.2	908264	119.3	101.7
	234.5	1096931.0	1233388.9	889364	216.7	92.4
	469.0	1022083.0	1164957.6	877357	459.2	97.9
	938	853764	997747.2	855692	953.4	101.6
	1875	633601	744402.6	851584	1825.1	97.3
	3750	399131	487993.2	817903	3675.5	98.0
	7500	229890	277860.6	827356	7223.4	96.3
	15000	122973	146256	840807	14792	98.2
	30000	65713	78286.2	839399	27932	93.1
	60000	36618	43443.6	842878	55693	92.8
	120000	19262	22698.6	848575	107326	89.4
	240000	10937	13271.4	824113	226049	94.2

[0254] \*:抗HBc浓度, IU/ml

[0255] (五)结论:

[0256] 1、方法敏感性:常规LiCA与多时点LiCA两法相同, <0.10IU/ml;

[0257] 2、特异性、稳定性与操作便捷性:两法相同;

[0258] 3、定量范围:

[0259] 常规LiCA:0.1~200IU/ml;

[0260] 专利方法:0.1~100000IU/ml或以上;

[0261] 4、Hooks效应拮抗效果(专利法与常规LiCA比较):

[0262] 能十分显著地拓展定量分析范围,能基本上消弭Hook效应影响,并具备发现极为少见的类Hook效应现象能力。具体介绍与实施例1同。

[0263] 【实施例3】血清IgG检测时间依赖性多时点絮状免疫凝集实验

[0264] 血清IgG检测时间依赖性多时点探测絮状免疫沉淀实验(下称多时点检测絮状免疫沉淀实验)。与实施例1、2相比,实施例3存在如下主要区别,即该实施例所依托的实验技术(免疫沉淀实验)敏感性显著偏低,定量检测的相对范围亦明显偏窄;免疫复合物结构状态对实验结果的影响通常较大,其实验信号强度的依时性变化特征亦较前两者显著。但这些并不影响对实验结果的定量分析;人IgG在血清中表达基数高,浓度变动范围相对较窄,采用专利方法进行检测,对实验结果的分析无须采用整个的HB双向剂量反应曲线;因此,该

实施例所达成的目标仅在于采用此种经济简便的实验指标论证本专利方法在絮状免疫沉淀实验,免疫凝集实验及其协同免疫凝集实验等方法中应用的可行性,同时为血清免疫沉淀等实验技术的发展(如采用同一稀释度标本同步检测血清IgG、IgA及IgM,以及采用同一试验方法对浓度差别悬殊的血清与多种体液标本做同步检测等)提供新的技术方向。

[0265] (一)实验材料

[0266] 1、仪器与耗材

[0267] 1)实验仪器:HITACHI 7170A自动生化分析仪,日本Hitachi公司制造;

[0268] 2)人工智能数据处理系统:自制软件处理系统,后台处理路径参见实施1;

[0269] 2、试剂

[0270] 1)血清IgG检测免疫比浊法测定试剂盒:上海玉兰生化试剂研究所生产;

[0271] 试剂1:R1.抗人IgG溶液;

[0272] 试剂2:R2.稀释剂;

[0273] 2)参比标准品

[0274] 标准参比品:常规标准血清。同上试剂盒随带,共6份;Ig浓度分别为:0.00g/L、0.20g/L、2.60g/L、4.00g/L、16.00g/L、64.0g/L;

[0275] 3)自制参比品

[0276] 参比品原料(人IgG):自健康人血清中纯化,BSA参比光谱吸收法定量,经标定并调整其浓度为128.00mg/ml(128g/L)。取此纯化物以同上市试剂随带的稀释液稀释,适量分装,-20℃冻存。所构建参比系列的浓度范围为:

[0277] 参比实验品:0.00g/L、2.00g/L、4.00g/L、16.00g/L、64.0g/L、256g/L

[0278] 回收实验样品:具体浓度见表9;

[0279] 4)检测标本:血清(及血浆等)。

[0280] (二)实验步骤

[0281] 1、实验准备:取出所有试剂与标本,恢复至室温,按需调整至对应浓度;

[0282] 2、实验操作

[0283] 1)将实验试剂(R1及R2)与实验标本按操作说明放置在仪器的相应部位,启动仪器,依标本类别及管序(单管法)设定并逐次执行实验操作;

[0284] 2)于仪器设定的第20(T1,6min)及第33(T2,10min)测点进行实验信号检测(450nm波长比色),并将所采集的实验信号输入为该法编制的复合HB双向剂量反应曲线分析系统;

[0285] 3)根据检测序号依次处理实验标本,并按指令报道实验结果;

[0286] 4)常规絮状免疫沉淀实验血清IgG检测严格按试剂说明进行(图5)。

[0287] (三)实验结果分析路径

[0288] 1、根据参比血清实验数据调取并修正分析系统储存信息,形成当次使用的复合HB双向计量分析图像系统;

[0289] 2、向人工智能数据处理系统内输入T1(第20测点)及T2(第33测点)两时点检测数据S1及S2,计算出受检标本的SSDI值;

[0290] 3、按照实施例1的方法修正实验分析体系,并确认实验体系中的相关界点数据(阈值,A1,A2及Q点等);

[0291] 4、参照实施例1的分析方式对实验结果进行靶物质浓度的定量分析,并按指令输

出实验结果；

[0292] 5、血清IgG检测絮状免疫沉淀实验复合HB双向剂量反应曲线图像分析法分析系统显示见图6。

[0293] (四)实验结果

[0294] 1、标准曲线及标准参比品的靶物质浓度

[0295] 采用专利与常规试验方法对同一套系列稀释的标准参比品进行检测,将其输入专项分析系统,并形成当次使用的复合HB双向剂量反应曲线定量分析系统。结果见表9、表11、图5及图6。

[0296] 表9血清人IgG时间依赖性多时点絮状免疫沉淀实验参比标准品检测结果

设定浓度(g/L)	S1	S2	SSDI
0	370	397	9320
2.0	828	900	9698
[0297] 4.0	1478	1524	9698
16.0	4424	4624	9530
64.0	11000	12300	8943*
256.0	11740	14860	7900

[0298] \*:常规法定量限定值的SSDI,大于此值者为可定量测值标本。

[0299] 2、几项重要的中间数据

[0300] 本实施例检测所获取的用于定量分析的几项重要的中间数据,见表10。

[0301] 表10血清人IgG时间依赖性多时点絮状免疫沉淀检测的几项中间实验数据\*

界点名称	实验信号(y)	靶物质浓度(g/L)	用途
阈值	777	0.0	界定阴阳性
[0302] Q	8495	156.3	界定分析区段
A1	13270	156.3	界定具体查读区段
A2	15620	156.3	界定具体查读区段

[0303] \*:供当次实验结果的判定及查读实验结果

[0304] 3、专利法检测回收实验结果

[0305] 采用多时点检测絮状免疫凝集实验对一组已知浓度的系列稀释参比品进行检测,并以人工智能系统对检测结果进行分析。实验结果(三孔均值)见表11。在实验性小样本检测条件下,其回收率介于90.9%—105%之间。

[0306] 表11血清人IgG检测时间依赖性多时点絮状免疫沉淀实验检测结果

[0307]

浓度 (g/L)	S1	S2	SSI	回收浓度	回收率 (%)
0.0	370	395	9320	0.0	N
2.0	828	900	9200	2.1	105
4.0	1478	1524	9698	3.9	97.5
8.0	2746	2813	9762	7.9	98.8
16.0	4424	4642	9530	16.5	103.1
32.0	7231	7800	9270	33.2	103.8
64.0	11000	12300	8943	63.1	98.6
128.0#	13265	15410	8608	116.4	90.9
256.0#	11740	14860	7900	241.2	94.2
512.0#	7824	10600	7381	503.1	98.3

[0308] 注:SSDI计算公式为 $(S1/S2)*100*100$ ;回收率=(回收浓度/设定浓度) $\times 100$ ;

[0309] 结果计算公式: $y=f(x) = a \times \exp(-(\frac{x-b}{c})^2)$ ,计算方法同前2项实施例。

[0310] 4、采用专利法及其常规絮状免疫实验(以64g/L浓度为设定浓度分析上限)对一组临床标本进行对比检测。实验结果见表12。两法检测结果之间未表现出显著的差异 $P>0.05$ 。由于本项对比检测采用临床检测样品偏少,仅1例标本测值稍高出常规定量分析限值范围。

[0311] 表12人血清IgG多时点絮状凝集实验测检及其与常规检测的比较

实验方法	检测例数	均值标准差	两者比较 (P)
[0312] 常规免疫凝集	33*	37.9	$>0.05$
专利法免疫凝集	34	39.3	

[0313] \*:Hook效应1例,未计入统计。

[0314] (五)结论:

[0315] 1)方法敏感性:两法相同, $<100.0\text{mg/L}$ ;

[0316] 2)定量范围:

[0317] 常规絮状凝集:1.0—64g/L;

[0318] 专利法LiCA:1.0—300g/L或以上。

[0319] 两者比较:专利法较常规法拓展10~100倍(受标本中靶物质浓度限值影响)。

[0320] 3)Hooks效应拮抗效果(专利法与常规LiCA比较):

[0321] ①能显著拓展定量检测范围;

[0322] ②发现常规实验检测中的Hook效应影响标本;

[0323] ③能消弭Hook效应。

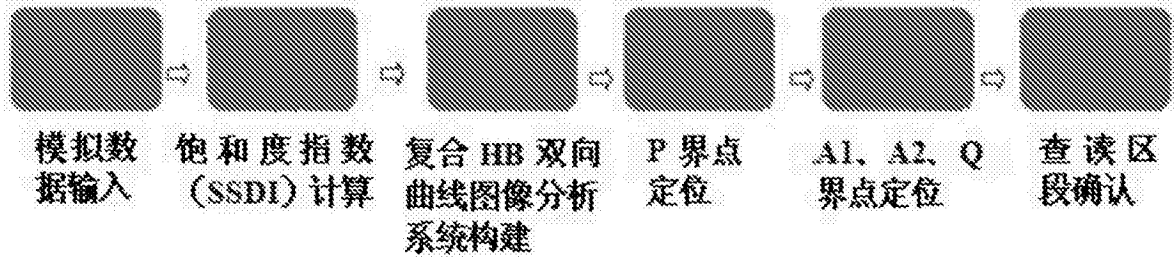


图1

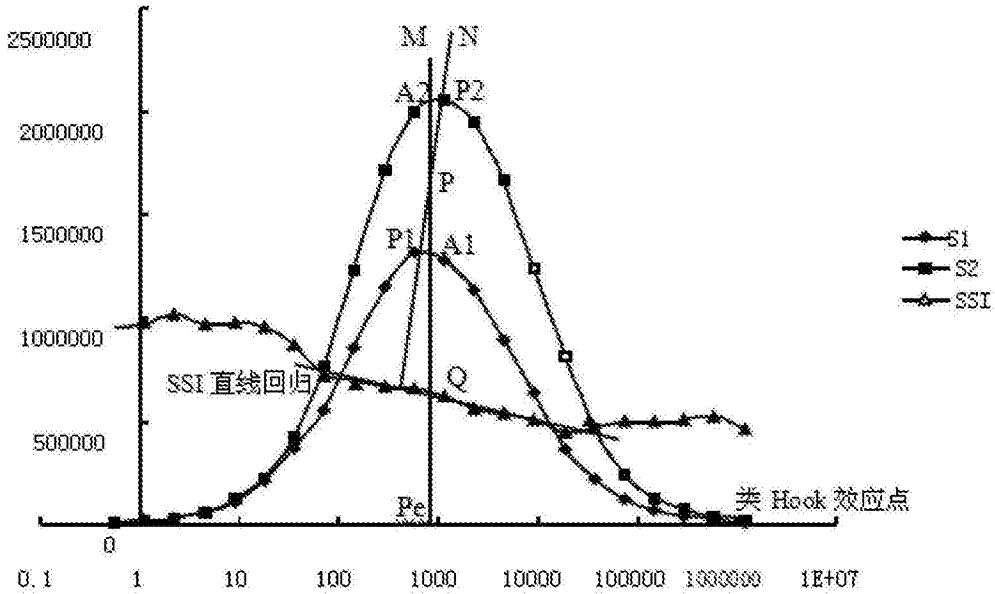


图2

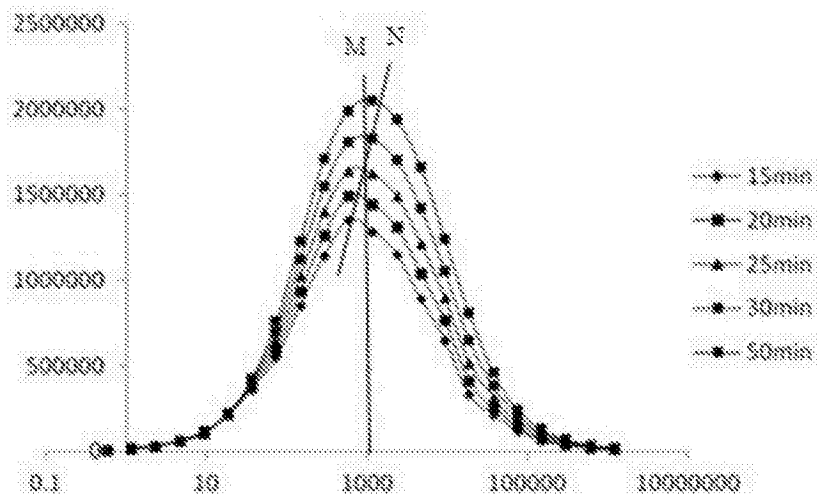


图3

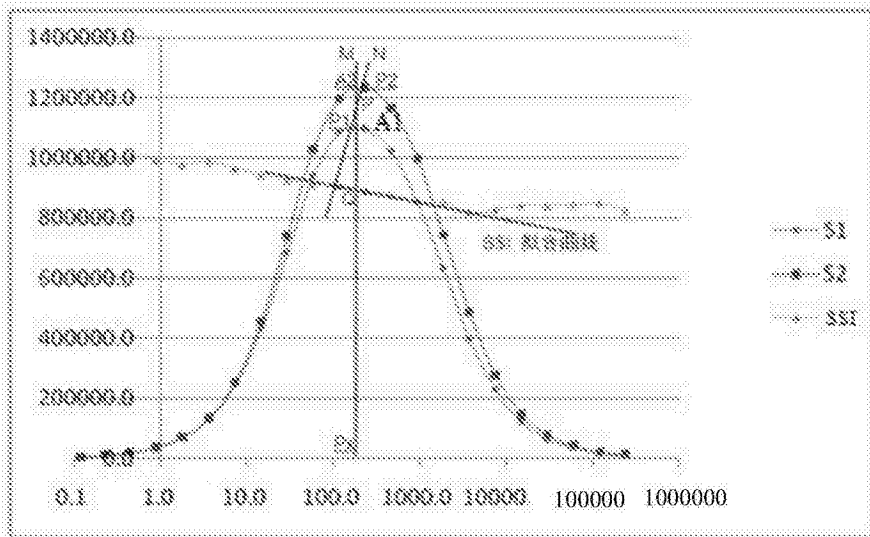


图4

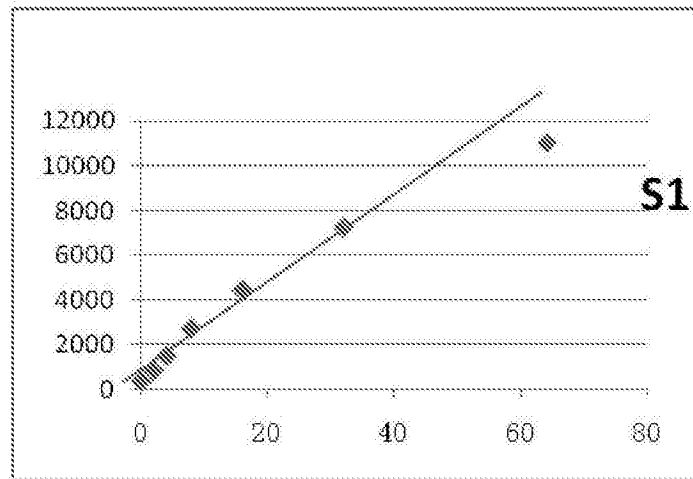


图5

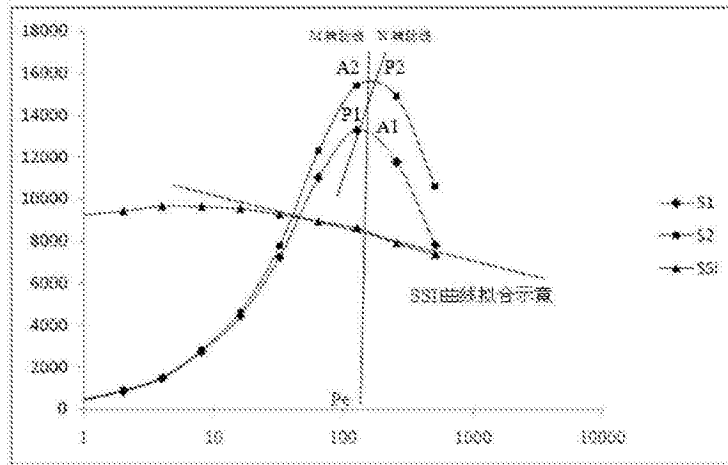


图6

专利名称(译)	一种血清学检测与定量分析的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104991056B</a>	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201510473549.7	申请日	2015-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	武汉林勉生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉林勉生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉林勉生物技术有限公司		
[标]发明人	李方和 李时君 刘汉华		
发明人	李方和 李时君 刘汉华		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
审查员(译)	李进进		
其他公开文献	CN104991056A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种血清学检测定量分析方法。在半对数坐标图像上，以X轴为靶物质浓度的对数值，Y轴为信号强度及信号饱和度指数，根据T1、T2时点测得系列参比标准品实验信号S1、S2及SSDI绘制S1、S2 HB双向剂量反应曲线及SSI曲线；采用拟合法确证HB双向曲线中函数x与y以及SSDI的关系；确定函数图像分析的界点A1、A2及Q，构成复合HB双向剂量反应曲线图像分析体系；根据被分析标本所测得的实验信号Y，及SSDI值与Q值比较的结果，在相应的曲线区段进行函数x的查读，将查读的对数结果转化为实际检测浓度并报道实验结果。所建立的实验方法能拮抗浓度依赖性Hook效应干扰，并能极大拓宽靶物质定量检测范围。

