



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105358977 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201480031129. 7

(22) 申请日 2014. 04. 25

(30) 优先权数据

61/816, 518 2013. 04. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/035512 2014. 04. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/176535 EN 2014. 10. 30

(71) 申请人 生物辐射实验室股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 R·考尔 郑伟明 R·沃克

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

代理人 余颖 陶家蓉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

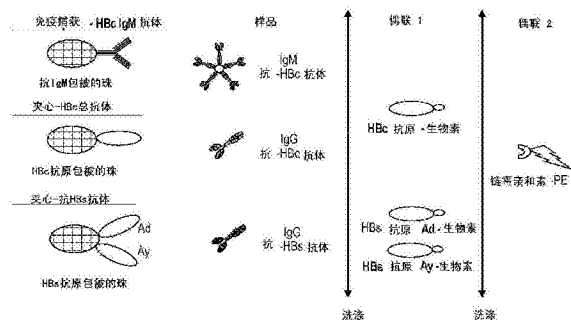
权利要求书3页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

多重乙肝试验

(57) 摘要

本文提供了用于检测个体是否感染乙肝病毒或是否曾感染乙肝病毒, 和感染的阶段或消退的多重试验。另外, 该多重系统可区分接种疫苗的对象和易感染乙肝的对象。



1. 一种试剂盒,所述试剂盒包含:
  - (a) 第一容器,其包含
    - (i) 与人乙肝表面抗原 (HBsAg) 和可检测标记物 (i) 偶联的珠,
    - (ii) 与人乙肝核心抗原 (HBcAg) 和可检测标记物 (ii) 偶联的珠,和
    - (iii) 与对人 IgM 有特异性的抗体 (抗-IgM) 和可检测标记物 (iii) 偶联的珠;
  - (b) 第二容器,其包含
    - (i) 生物素化 HBsAg,和
    - (ii) 生物素化 HBcAg ;和
  - (c) 第三容器,其包含与可检测标记物 (iv) 偶联的链霉亲和素。
2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包含清洗试剂。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒,所述试剂盒还包含含有校准对照物的容器。
4. 如前述权利要求中任一项所述的试剂盒,其特征在于,可检测标记物 (i)、(ii) 和 (iii) 是荧光团的不同组合。
5. 如前述权利要求中任一项所述的试剂盒,其特征在于,可检测标记物 (iv) 选自藻红蛋白和荧光素异硫氰酸酯。
6. 如前述权利要求中任一项所述的试剂盒,其特征在于,珠 (i)、(ii) 和 (iii) 是磁力响应性的。
7. 一种处理来自人对象的生物样品的多重试验,所述试验包括:
  - (a) 将所述生物样品在容器中与珠混合物接触,所述珠混合物包含:
    - (i) 与人乙肝表面抗原 (HBsAg) 和可检测标记物 (i) 偶联的珠,
    - (ii) 与人乙肝核心抗原 (HBcAg) 和可检测标记物 (ii) 偶联的珠,和
    - (iii) 与对人 IgM 有特异性的抗体 (抗-IgM) 和可检测标记物 (iii) 偶联的珠;
  - (b) 从所述容器中去除非珠结合的组分;
  - (c) 将所述珠混合物与偶联剂 1 接触,其中偶联剂 1 包含
    - (i) 生物素化 HBsAg,和
    - (ii) 生物素化 HBcAg ;
  - (d) 去除非珠结合的组分;
  - (e) 将所述珠混合物与偶联剂 2 接触,其中偶联剂 2 包含与可检测标记物 (iv) 偶联的链霉亲和素;
  - (f) 去除非珠结合的组分;并且
  - (g) 通过流式细胞术确定珠上的可检测标记物 (iv) 的阳性或阴性结果,所述珠也对各可检测标记物 (i)、(ii) 或 (iii) 是阳性的,从而处理来自人对象的生物样品。
8. 如权利要求 7 所述的试验,其特征在于,可检测标记物 (i)、(ii) 和 (iii) 是荧光团的不同组合。
9. 如权利要求 7 或 8 所述的试验,其特征在于,可检测标记物 (iv) 选自藻红蛋白和荧光素异硫氰酸酯。
10. 如权利要求 7-9 中任一项所述的试验,其特征在于,珠 (i)、(ii) 和 (iii) 是磁力响应性的。
11. 如权利要求 7-10 中任一项所述的试验,其特征在于,步骤 (b) 包括洗涤所述珠。

12. 如权利要求 7-11 中任一项所述的试验,其特征在于,步骤 (d) 包括洗涤所述珠。

13. 如权利要求 7-12 中任一项所述的试验,其特征在于,步骤 (f) 包括洗涤所述珠。

14. 如权利要求 7-13 中任一项所述的试验,其特征在于,通过与校准对照物做比较来确定阳性和阴性,阳性被定义为高于所述校准对照物,并且阴性被定义为低于所述校准对照物。

15. 如权利要求 7-14 中任一项所述的试验,其特征在于,所述试验还包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (iii) 上是阳性时确定所述对象具有急性乙肝感染。

16. 如权利要求 7-15 中任一项所述的试验,其特征在于,所述试验还包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (i) 上是阳性但不在珠 (ii) 或 (iii) 上是阳性时确定所述对象已针对乙肝感染免疫。

17. 如权利要求 7-16 中任一项所述的试验,其特征在于,所述试验还包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (ii) 上是阳性但不在珠 (i) 或 (iii) 上是阳性时确定所述对象曾接触乙肝。

18. 如权利要求 7-17 中任一项所述的试验,其特征在于,所述试验还包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (i) 和 (ii) 上是阳性但不在珠 (iii) 上是阳性时确定所述对象曾感染乙肝。

19. 如权利要求 7-18 中任一项所述的试验,其特征在于,所述生物样品是血液、血液组分或经处理的血液。

20. 一种确定对象的乙肝感染状态的多重试验,所述试验包括

(a) 将来自所述对象的生物样品在容器中与珠混合物接触,所述珠混合物包含:

(i) 与人乙肝表面抗原 (HBsAg) 和可检测标记物 (i) 偶联的珠,

(ii) 与人乙肝核心抗原 (HBcAg) 和可检测标记物 (ii) 偶联的珠,和

(iii) 与对人 IgM 有特异性的抗体 (抗-IgM) 和可检测标记物 (iii) 偶联的珠;

(b) 从所述容器中去除非珠结合的组分;

(c) 将所述珠混合物与偶联剂 1 接触,其中偶联剂 1 包含

(i) 生物素化 HBsAg,和

(ii) 生物素化 HBcAg;

(d) 去除非珠结合的组分;

(e) 将所述珠混合物与偶联剂 2 接触,其中偶联剂 2 包含与可检测标记物 (iv) 偶联的链霉亲和素;

(f) 去除非珠结合的组分;并且

(g) 通过流式细胞术确定珠上可检测标记物 (iv) 的阳性或阴性结果,所述珠也对各可检测标记物 (i)、(ii) 或 (iii) 是阳性的,从而确定对象的乙肝感染状态。

21. 如权利要求 20 所述的试验,其特征在于,通过与校准对照物做比较来确定阳性和阴性,阳性被定义为高于所述校准对照物,并且阴性被定义为低于所述校准对照物。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的试验,其特征在于,步骤 (g) 包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (iii) 上是阳性时确定所述对象具有急性乙肝感染。

23. 如权利要求 20-22 中任一项所述的试验,其特征在于,步骤 (g) 包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (i) 上是阳性但不在珠 (ii) 或 (iii) 上是阳性时确定所述对象已针对乙肝感染免疫。

24. 如权利要求 20-23 中任一项所述的试验,其特征在于,步骤 (g) 包括在可检测标记

物 (iv) 在珠 (ii) 上是阳性但在珠 (i) 或 (iii) 上是阳性时确定所述对象曾接触乙肝。

25. 如权利要求 20-24 中任一项所述的试验,其特征在於,步骤 (g) 包括在可检测标记物 (iv) 在珠 (i) 和 (ii) 上是阳性但在珠 (iii) 上是阳性时确定所述对象曾感染乙肝。

26. 如权利要求 20-25 中任一项所述的试验,其特征在於,所述步骤 (g) 包括:

在可检测标记物 (iv) 在珠 (iii) 上是阳性时确定所述对象具有急性乙肝感染;

在可检测标记物 (iv) 在珠 (i) 上是阳性但在珠 (ii) 或 (iii) 上是阳性时确定所述对象已经针对乙肝感染免疫;

在可检测标记物 (iv) 在珠 (ii) 上是阳性但在珠 (i) 或 (iii) 上是阳性时确定所述对象曾经接触乙肝;并且

在可检测标记物 (iv) 在珠 (i) 和 (ii) 上是阳性但在珠 (iii) 上是阳性时确定所述对象曾感染乙肝。

27. 如权利要求 20-26 中任一项所述的试验,其特征在於,可检测标记物 (i)、(ii) 和 (iii) 是荧光团的不同组合。

28. 如权利要求 20-27 中任一项所述的试验,其特征在於,可检测标记物 (iv) 选自藻红蛋白和荧光素异硫氰酸酯。

29. 如权利要求 20-28 中任一项所述的试验,其特征在於,珠 (i)、(ii) 和 (iii) 是磁力响应性的。

30. 如权利要求 20-29 中任一项所述的试验,其特征在於,步骤 (b) 包括洗涤所述珠。

31. 如权利要求 20-30 中任一项所述的试验,其特征在於,步骤 (d) 包括洗涤所述珠。

32. 如权利要求 20-31 中任一项所述的试验,其特征在於,步骤 (f) 包括洗涤所述珠。

33. 如权利要求 20-32 中任一项所述的试验,其特征在於,所述生物样品是血液、血液组分或经处理的血液。

## 多重乙肝试验

### 背景技术

[0001] 乙肝病毒导致肝病。很大比例的感染患者发展成慢性肝炎,导致肝损伤和后续的肝癌。乙肝感染的特征在于数种独特血清学和免疫学应答。感染的时间概况可用作监测疾病过程的有用指导并也可提供与疾病进程的血清学关联(参见例如,Elgouhari (2008) Cleveland Clinic J. Med. 75 :881 和 Juszczuk (2010) Vaccine 18 :S23)。

[0002] 乙肝病毒含有两种主要病毒蛋白,表面抗原 (HBsAg) 和核心抗原 (HBcAg)。感染后,HBsAg 首先变得可检测到,之后是出现宿主生成的抗-HBcIgM。抗-HBs 抗体在 HBsAg 消失几个月后出现,并且在无限期内保持可检测到。在“窗口期”期间(当出现 HBsAg 和出现抗-HBs 之间存在 16-32 周的间隔时),抗-HBc 提供了目前或最近 HBV 感染的血清学证据。然而,抗-HBc IgM 和抗-HBc (IgM 和 IgG) 的存在并不表明感染的消退或保护性免疫。抗-HBs 的出现和 HBsAg 的消失指示感染的消退和保护性免疫。此外,在没有 HBsAg 和抗-HBc 存在时存在抗-HBs 指示成功接种疫苗的个体。

[0003] 乙肝血清学测试包括测量数种乙肝病毒特异性抗原和抗体。跟踪 HBV 感染和例如在感染、爆发和消退之间分化的能力对于临床控制而言是重要的。所有市售的乙肝抗体测试试剂盒在每个反应容器中于同一时间进行一个测试。任意给定的测试的结果不能预测乙肝感染或消退的过程或阶段,因此必须进行多重测试,其浪费时间、样品和试剂。此外,药品提供者可能不会命令立即测试所有的相关 HBV 标记物,使得对象可能会被召唤测试多次。重复抽血是繁重且昂贵的,并且可导致不依从和不理想治疗。参见例如 Stramer 等, (2012) Transfusion 52 :440。

### 发明内容

[0004] 本文提供了用于在对象中同时检测多重乙肝病毒 (HBV) 抗体,使得能够确定对象的 HBV 状态。本文所述的试剂盒提供了确定对象是否已经接触 HBV、患有 HBV 感染、曾经患有 HBV 感染、或已经针对 HBV 免疫的快速高效试验。这类试剂盒包含 (a) 包含或基本由固体支持物(例如珠)的混合物组成的容器,其中混合物包含与 HBsAg、HBcAg 和抗-IgM 之一偶联的固体支持物;和 (b) 包含偶联剂 1 的容器(如下所述)。在一些实施方式中,混合物中的三种类型的固体支持物(例如,珠)可互相区分,例如,不同的尺寸、密度、重量、吸光度或可检测标记物。在一些实施方式中,混合物中的三种类型的固体支持物各自与不同的可检测标记物偶联,例如,荧光标记物或荧光标记物的组合。在一些实施方式中,固体支持物是磁力响应性的。在一些实施方式中,偶联剂 1 包含或基本由标记的 HBsAg 和标记的 HBcAg 组成,其中 HBsAg 和 HBcAg 上的标记物是不同的或相同的,并且其中标记物用于间接检测(例如,生物素、链霉生物素、毛地黄皂苷等)或直接检测(例如,荧光团或发光剂)。

[0005] 在一些实施方式中,该试剂盒还包含偶联剂 2 的容器。在一些实施方式中,偶联剂 2 包含或基本由与某一试剂偶联的可检测标记物组成,该试剂特异性结合偶联剂 1 中标记的 HBsAg 和标记的 HBcAg。例如,在一些实施方式中,偶联剂 1 包含或基本由生物素化的 HBsAg 和生物素化的 HBcAg 组成,并且偶联剂 2 包含或基本由与可检测标记物,例如荧光团

如藻红蛋白 (PE) 或荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 偶联的链霉亲和素。本领域技术人员将认识到链霉亲和素和生物素可在之前的示例中切换或者被其它结合对代替。

[0006] 在一些实施方式中,该试剂盒还包含待加入样品的至少一种内部对照物,例如,在容器中或在不同的容器中。在一些实施方式中,内部对照物是固体支持物,例如,珠,其中固体支持物与某一试剂偶联,该试剂将结合样品中已知的分析物(样品验证对照物,例如针对凝集因子如 FXIII 的抗体,其中样品是血液)。对于其它支持物,内部对照固体支持物也将是可区分的,例如与不同的可检测标记物偶联,所述可检测标记物例如荧光标记物或荧光标记物的组合。在这类实施方式中,偶联剂 1 还将包含标记的试剂以检测内部对照固体支持物上的试剂-分析物结合,例如针对分析物的另一种抗体(例如,标记的抗-FXIII)。在一些实施方式中,内部对照物标记物是不同或相同的,并且可以是用于直接或间接检测的标记物。在一些实施方式中,内部对照物是固体支持物,例如,珠,其中固体支持物与可检测标记物偶联,使得其可与其它固体支持物区分,例如,不同的荧光标记物或荧光标记物的组合(内部标准对照物)。

[0007] 在一些实施方式中,该试剂盒还包含含有清洗试剂的容器(例如,即用、浓缩母液或粉末)。在一些实施方式中,该试剂盒还包含含有用于流式细胞术的材料或试剂,例如,缓冲剂、缓冲剂母液或粉末、合适的管等。在一些实施方式中,该试剂盒还包含含有至少一种校准对照物的至少一个容器,例如用于设定被认为阳性的信号水平。在一些实施方式中,该试剂盒包括对超过一种可检测标记物的校准对照物,例如珠上和偶联剂溶液中的可检测标记物。在这种情况下,校准对照物可在一个容器或超过一个容器中。在一些实施方式中,该试剂盒包括至少一种可检测标记物的多于一个水平的校准对照物,所述可检测标记物例如珠上和偶联剂溶液中的可检测标记物。在一些实施方式中,该试剂盒还包含含有阴性对照物,例如带有未标记的珠或未标记的偶联剂溶液的至少一个容器。

[0008] 该提供了确定抗-HBs、抗-HBc(总)和抗-HBc(IgM)的量,并且从而确定对象的 HBV 感染状态的多重试验。因此,提供了处理来自对象(例如,哺乳动物,人)的生物样品的试验或方法,包括(a)将生物样品在容器中与固体支持物的混合物接触,其中固体支持物的混合物包含(i)与 HBsAg 偶联的固体支持物、(ii)与 HBcAg 偶联的固体支持物,和(iii)与抗-IgM(例如,抗-人 IgM)偶联的固体支持物;(b)从容器中去除非珠结合的组分;(c)将固体支持物的混合物与偶联剂 1 接触;(d)去除非珠结合的组分;(e)任选地将珠的混合物与偶联剂 2 接触;(f)任选地去除非珠结合的组分;和(g)通过流式细胞术检测固体支持物上和偶联剂 1(或 2,如果存在)中的可检测标记物。使用步骤(g)的流式细胞术,可确定来自对象的生物样品中抗-HBs、抗-HBc(总)和抗-HBc(IgM)和存在(阳性结果)或缺失(阴性结果)和相对量。

[0009] 在一些实施方式中,混合物中的三种类型的固体支持物(例如,珠)可互相区分,例如,不同的尺寸、密度、重量、吸光度或可检测标记物。在一些实施方式中,混合物中的三种类型的固体支持物各自与不同的可检测标记物偶联,例如,荧光标记物或荧光标记物的组合。在一些实施方式中,固体支持物是磁力响应性的。在一些实施方式中,偶联剂 1 包含或基本由标记的 HBsAg 和标记的 HBcAg 组成,其中 HBsAg 和 HBcAg 上的标记物是不同的或相同的,并且其中标记物用于间接检测(例如,生物素、链霉生物素、毛地黄皂苷等)或直接检测(例如,荧光团或发光剂)。在一些实施方式中,偶联剂 2 包含或基本由与试剂偶联的

可检测标记物组成,该试剂特异性结合偶联剂 1 中标记的 HBsAg 和标记的 HBcAg。

[0010] 在一些实施方式中,步骤 (b)、(d) 和 (f) 中的 1 个、2 个或全部包括洗涤固体支持物以去除非珠结合的组分。在一些实施方式中,生物样品选自血液、血液成分(例如,血清或血浆)或经处理的血液。

[0011] 在一些实施方式中,该试验还包括通过流式细胞术检测至少一种校准对照物,其中通过与至少一种校准对照物比较来确定对一个或多个可检测标记物是阳性和阴性的。在一些实施方式中,阳性定义为高于校准对照物,并且阴性定义为低于校准对照物。在一些实施方式中,该试验包括检测超过一种可检测标记物的校准对照物,例如珠上和偶联剂溶液中的可检测标记物。在一些实施方式中,该试验包括检测超过一个水平的至少一种可检测标记物的校准对照物,例如珠上和偶联剂溶液中的可检测标记物。在一些实施方式中,该试验还包括通过流式细胞术检测至少一种阴性对照物,例如采用未标记的珠或未标记的偶联剂溶液。

[0012] 在一些实施方式中,该试验还包括当与 IgM 偶联的固体支持物上偶联剂 1(或 2,如果存在)中可检测标记物是阳性时确定对象具有急性乙肝感染。在一些实施方式中,该试验还包括当与 HBsAg 偶联的固体支持物上偶联剂 1(或 2,如果存在)中可检测标记物是阳性,但是在与 HBcAg 或 IgM 偶联的固体支持物上不是阳性时确定对象已经针对 HBV 免疫。在一些实施方式中,该试验还包括当与 HBcAg 偶联的固体支持物上偶联剂 1(或 2,如果存在)中可检测标记物是阳性,但是在与 HBsAg 偶联的固体支持物上不是阳性时确定对象曾接触 HBV(但还没有保护性免疫)。在一些实施方式中,该试验还包括当与 HbsAg 和 HBcAg 偶联的固体支持物上偶联剂 1(或 2,如果存在)中可检测标记物是阳性,但是在与 IgM 偶联的珠上不是阳性时确定对象曾感染 HBV。

[0013] 还提供了确定对象的乙肝感染状态的多重试验,包括:(a) 将来自对象的生物样品在容器中与珠混合物接触,其中珠混合物包含(i)与人乙肝表面抗原(HBsAg)和可检测标记物(i)偶联的珠,(ii)与人乙肝核心抗原(HBcAg)和可检测标记物(ii)偶联的珠,和(iii)与对人 IgM 的特异性抗体(抗-IgM)和可检测标记物(iii)偶联的珠;(b)从容器中去除非珠结合组分;(c)将珠混合物与偶联剂 1 接触,其中偶联剂 1 包含:(i)生物素化的 HBsAg,和(ii)生物素化的 HBcAg;(d)去除非珠结合的组分;(e)将珠混合物与偶联剂 2 接触,其中偶联剂 2 包含与可检测标记物(iv)偶联的链霉亲和素;(f)去除非珠结合的组分;并且(g)通过流式细胞术确定对各可检测标记物(i)、(ii)或(iii)是阳性的珠上可检测标记物(iv)的阳性或阴性结果,从而确定对象的乙肝感染状态。

[0014] 在一些实施方式中,该试验还包括通过流式细胞术检测至少一个校准对照物,其中通过与至少一个校准对照物比较来确定对一个或多个可检测标记物是阳性和阴性的。在一些实施方式中,阳性定义为高于校准对照物,并且阴性定义为低于校准对照物。在一些实施方式中,该试验包括通过流式细胞术检测可检测标记物(iv)的校准对照物。在一些实施方式中,该试验包括通过流式细胞术检测可检测标记物(i)、(ii)、(iii)和(iv)各自的校准对照物。

[0015] 在一些实施方式中,步骤(g)包括当可检测标记物(iv)在珠(iii)和任选地在珠(ii)上是阳性时确定对象具有急性乙肝感染。在一些实施方式中,步骤(g)包括当可检测标记物(iv)在珠(i)上是阳性但不在珠(ii)或(iii)上是阳性时确定对象已经对乙肝

感染免疫。在一些实施方式中,步骤(g)包括当可检测标记物(iv)在珠(ii)和任选的珠(iii)上是阳性但不在珠(i)上是阳性时确定对象曾接触乙肝。在一些实施方式中,步骤(g)包括当可检测标记物(iv)在珠(i)和(ii)上是阳性但不在珠(iii)上是阳性时确定对象曾感染乙肝。

[0016] 在一些实施方式中,可检测标记物(i)、(ii)和(iii)是荧光团的不同组合。在一些实施方式中,可检测标记物(iv)选自PE和FITC。

[0017] 在一些实施方式中,珠(i)、(ii)和(iii)是磁力响应性的。在一些实施方式中,步骤(b)、(d)和(f)中的1个、2个或全部包括洗涤固体支持物以去除非珠结合的组分。在一些实施方式中,生物样品选自血液、血液成分(例如,血清或血浆)或经处理的血液。

[0018] 附图的简要说明

[0019] 图1显示了本发明所述的多重HBV试验的实施方式。

[0020] 发明详述

[0021] A. 引言

[0022] 本文提供了同时检测微生物感染和/或针对相同感染的免疫接种的应答的试剂盒、组合物和方法。该方法包括检测针对人乙肝表面抗原(抗-HBsAg抗体)的免疫球蛋白G(IgG)抗体和针对人乙肝核心抗原的总免疫球蛋白(总HBc抗体)和免疫球蛋白M(抗-HBc IgM抗体)。在珠存在下,在相同单一容器(管、孔、样品池等)中测量各抗体的存在和量。各珠携带特异性可检测物理参数(例如,染料特征)和(1)抗-IgM、(2)HBcAg、或(3)HBsAg。因此,在单一容器中包含三种类型的可明确检测的珠以进行试验,如图1所示。图1显示了用HbsAg的2种优势亚型,Ad和Ay包被的HBsAg珠。存在其它亚型,例如,Aw和Ar(参见,例如, Valet等.(1975)CMA J. 112:1179)。本领域技术人员会理解在本文所述的试验中可以任意组合使用任意1种、2种、3种、4种等的HBsAg亚型。

[0023] 本文所述的试验提供了至少2个维度的检测,例如,固定珠的特性(例如,HBsAg、HBcAg或抗-IgM),和结合的抗体的存在和量(抗-HBs或抗-HBc)。多维度方面允许多重模式,使得能够在单一测试中检测超过一种分析物。此外,如下文所述,发明人已经显示本文所述的多重试验成功地与已知患者样品的感染状态相关联。

[0024] 发明人已经设计了用于检测患者样品中多重抗体的单一试验,本文简单描述了这些试验,这些抗体指示患者中是否存在HBV感染、HBV感染状态和HBV疫苗接种状态。在第一步骤中,患者样品,一般是血液或血液组分,与三种类型的固体支持物接触:

[0025] ss1),其与可检测标记物(例如,荧光团)1和抗-IgM偶联;

[0026] ss2),其与可检测标记物2和HBcAg偶联;和

[0027] ss3),其与可检测标记物3和HBsAg偶联。

[0028] ss1将结合患者样品中的所有IgM抗体,无关特异性。ss2将结合患者样品中对HBcAg有特异性的抗体,包括IgM和IgG。ss3将结合患者样品中对HBsAg有特异性的抗体,主要是IgG。

[0029] 在去除未结合的材料之后,加入标记的HBcAg和HBsAg。在图1所示的实施例中,标记物是生物素,但是本领域技术人员会理解可在HBcAg和HBsAg上使用直接可检测的标记物以产生阳性或阴性信号。

[0030] 在本发明的实施例中,在去除未结合的材料之后,加入可检测标记的链霉亲和素,

与生物素化的 HBcAg 和 HBsAg 结合并导致阳性或阴性,以及可定量的信号。通过流式细胞术检测固体支持物 1、2 和 3(与可检测标记物 1、2 和 3 相关联)、以及各固体支持物上的信号的存在、缺失和定量水平。下表显示可如何使用结果来诊断患者的 HBV 状态。

[0031]

	可检测标记物 1 + (IgM +)	可检测标记物 2 + (抗-HBc +)	可检测标记物 3 + (抗-HBs +)
未接触	-	-	-
接触	-	+	-
急性感染	+	+	-
曾感染	-	+	+
免疫	-	-	+

[0032] B. 定义

[0033] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。参见例如 Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (《细胞分子生物学词典》), 埃尔斯威尔出版社 (Elsevier) (第 4 版 2007); Sambrook 等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (《分子克隆, 实验室手册》), 冷泉港实验室出版社 (冷泉港, 纽约 1989)。本发明按照数字或字母指代物项, 如标记物、固体支持物、珠、分析物等 (例如, 可检测标记物 1, 珠 (ii) 等)。这些数字和字母旨在区分该物项与相同类型的其它项 (例如, 珠 (i) 与珠 (ii)), 并不旨在将特定性质与数字或字母关联。本发明的实践中可以使用与本文所述类似或等价的任何方法、装置和材料。本文提供的定义是用来帮助理解本文经常用到的某些术语, 不对本发明的范围构成限制。

[0034] 多重试验是在单个样品中同时检测超过一种分析物的分析方法。多重试验方法和试剂描述于, 例如美国专利号 6, 773, 578 和 W02008148883。

[0035] 本文所用术语“固体支持物”指固体惰性表面或物体, 其上可固定试剂, 如抗体或抗原。本文所用术语“固定”指分子基础的偶联, 其在本文所述试验的任意步骤期间所施加的条件下都不会明显去偶联。这类固定可通过共价键、离子键、亲和型键或任何其他化学键实现。

[0036] 本文所用术语“颗粒”指任何形状或表面结构的固体或半固体主体, 通常线性尺寸为微米级 (即小于 100 微米)。除非另有说明, 该术语与“微粒”可互换使用, 其是指微米级颗粒, 并且与“珠”可互换使用, 其是指形状是球形或近似球形的颗粒, 通常在组成上是聚合的。

[0037] 术语“容器”、“器皿”、“管”、“孔”等是指可容纳试剂或任何试验的容器。如果容器在试剂盒中并容纳试剂, 其一般可以是封闭或密封的。如果容器正用于试验, 其在试验步骤期间一般会打开或可及的。

[0038] 术语“生物样品”包括从生物体中得到的多种样品类型。该术语包括体液, 如血液、血液组分、唾液、血清、血浆、尿液和其它生物来源的液体样品、固体组织活检、组织培养

物或取自培养的患者细胞的上清。在本发明的内容中,生物样品一般是含可检测量抗体的体液,例如,血液或血液组分。可在试验之前对生物样品进行加工以例如去除细胞或细胞碎片。该术语包含获得后经处理的样品,如试剂处理、溶解、沉降或对某些组分的富集。

[0039] 本文所用术语“抗体”指由一个或多个免疫球蛋白基因编码的多肽,或其特异性结合并识别分析物(抗原)的片段。识别的免疫球蛋白轻链被归类为  $\kappa$  或  $\lambda$ 。免疫球蛋白重链分为  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$ ,它们进而分别定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0040] 免疫球蛋白 G(IgG 抗体)的结构单元的一个示例是四聚体。各这类四聚体由相同的两对多肽链组成,每对包含一条“轻”链(约 25kD)和一条“重”链(约 50-70kD)。每条链的 N 末端确定约 100 至 110 个或更多个氨基酸构成的可变区,所述可变区主要负责抗原识别。术语“轻链可变区”(VL)和“重链可变区”(VH)分别指这些轻链和重链。

[0041] 例如,抗体作为完整免疫球蛋白或由不同肽酶消化完整免疫球蛋白所产生的成熟表征的片段而存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键连接附近消化抗体,产生  $F(ab')_2$ , Fab 的二聚体,其本身是由二硫键连接于  $V_H-C_{H1}$  的轻链。可在温和条件下还原  $F(ab')_2$  二聚体以打断铰链区中的二硫连接,从而将  $F(ab')_2$  二聚体转化为两个 Fab' 单体。Fab' 单体实质上是具有部分铰链区的 Fab(参见 Paul 编, *Fundamental Immunology*(《基础免疫学》),第三版,雷文出版社(Raven Press),纽约,1993)。虽然根据对完整抗体的消化定义了多种抗体片段,但是本领域技术人员应理解,这类片段也可用化学方法或重组 DNA 方法从头合成。因此,本文中术语“抗体”也包括通过全抗体修饰或用重组 DNA 方法从头合成所产生的抗体片段,如单链 Fv。

[0042] 抗体通常按照其靶标来表示。虽然命名有变化,但本领域技术人员会熟悉并理解可对相同抗体应用数个名称。例如,对 IgM 有特异性的抗体可被称为“抗-IgM”、“IgM 抗体”、“抗-IgM 抗体”等。

[0043] 本文所用术语“抗原”、“免疫原”、“抗体靶标”、“靶标分析物”和类似术语是指由抗体识别,即可被抗体特异性结合的分子、化合物或复合物。该术语可以指可被抗体特异性识别的任意分子,例如,多肽、多核苷酸、糖、脂质、化学部分或其组合(例如,磷酸化或糖基化的多肽等)。本领域技术人员会理解该术语并不表示该分子在各种情况中是免疫原性的,但仅仅表示其可被抗体靶向。

[0044] 抗体结合抗原上的“表位”。表位是抗原上被抗体识别并结合的局部位点。表位可包括几个氨基酸或几个氨基酸的部分,例如,5 或 6 个,或更多,例如 20 个或更多氨基酸,或这些氨基酸的部分。在一些情况中,表位包括非蛋白质组分,例如,来自糖、核酸或脂质。在一些情况中,表位是三维部分。因此,例如,在靶标是蛋白质的情况中,该表位可由连续氨基酸、或来自蛋白质的不同部分的氨基酸组成,这些部分通过蛋白质折叠靠近(例如,不连续表位)。这对于形成三维结构的其它类型的目标分子也是一样的。表位通常包含在独特空间构象中的至少 3 个或更常见的至少 5 个或 8-10 个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括,例如 X-射线晶体法和二维核磁共振。参见,例如 *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*(《分子生物学方法中的表位作图方案》),卷 66, Glenn E. Morris 编(1996)。

[0045] 术语“对……有特异性”、“特异性结合”和类似术语指分子(例如,抗体或抗体片段)与其靶标的结合亲和力比非靶标化合物高至少 2 倍,例如至少 4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8

倍、9 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍或 100 倍中的任意情况。例如，特异性结合给定抗体靶标的抗体通常以与非抗体靶标相比高至少 2 倍的亲和性结合抗体靶标。可使用标准方法来确定特异性，例如固相 ELISA 免疫试验（参见，例如，Harlow 和 Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*（《抗体使用实验室手册》）（1998），描述可用于确定特异性免疫反应性的免疫试验模式和条件）。

[0046] 相对于抗体靶标（例如，抗原、分析物）的术语“结合”一般表示抗体与纯群体中的大多数抗体靶标结合（假定合适的摩尔比）。例如，结合给定抗体靶标的抗体一般结合溶液中至少 2/3 的抗体靶标（例如，至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 中的任意情况）。本领域技术人员应理解，取决于测定结合的方法和 / 或阈值，可出现一些变化。

[0047] 术语“标记物”、“可检测标记物”、“可检测部分”和类似术语指可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。例如，可用的标签包括荧光染料（荧光团）、发光剂、高电子密度试剂、酶（例如，ELISA 中常用）、生物素、地高辛、<sup>32</sup>P 和其它同位素、半抗原、以及可被检测的蛋白质（例如通过将放射性标签整合至肽中或或用于检测与肽特异性反应的抗体）。该术语包括单一标记试剂的组合，例如，提供独特可检测特征（例如，特定波长或波长组合下）的荧光团的组合。可以采用本领域已知的用于将标签偶联到需要的试剂的任何方法，例如，使用如下文献中所述的方法：Hermanson, 《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques) 1996, 圣迭戈的学术出版社有限公司 (Academic Press, Inc.)。

[0048] 当指代结果或信号时，术语“阳性”表示在样品中检测到分析物或物项的存在。当指代结果或信号时，术语“阴性”表示在样品中检测到分析物或物项不存在。一般通过与至少一种对照物比较来确定阳性和阴性，所述对照物例如，样品确定为阳性或阴性对照物（例如，已知空白）所需要的阈值水平。

[0049] “对照”样品或值是指用作参比，通常是已知参比的样品，其用于与测试样品比较。例如，测试样品可取自测试条件，例如，在测试化合物存在下，并且与来自已知条件的样品比较，例如，在没有测试化合物的条件下（阴性对照物），或存在已知化合物的条件下（阳性对照物）。对照物也可代表从多个测试或结果中收集的平均值。本领域技术人员会认识到可设计对照物来评价任意数量的参数，并且会理解那些对照物在给定情况下是有价值的并且能够基于与对照值的比较来分析数据。也可评估对照物来确定数据的显著性。例如，如果给定的参数在对照物中是变化的，则不认为测试样品中的变化是显著的。

[0050] “校准对照物”与阳性对照物类似，在于其包含已知量的已知分析物。在多重试验的情况下，可设计校准对照物以包含已知量的多种已知分析物。可在最小截止量处设定校准对照物中分析物的量，例如，使得较高的量会被认为对于分析物是“阳性”的，而较低的量会被认为对于分析物是“阴性”的。在一些情况中，可使用多水平校准对照物，使得可更精确地确定分析物量的范围。例如，试验可包括已知低和高的量，或已知最小、中间和最大量的校准对照物。

[0051] 术语“诊断”是指对象患有感染、病症或疾病的相对概率。类似地，术语“预后”是指对象中可能出现特定未来结果的相对概率。例如，在本发明的内容中，预后可以指个体在未来会受到感染的可能性（例如，如果免疫则不太可能）。术语并不是绝对的，如医学诊断

领域的任意技术人员所理解。

[0052] “对象”、“患者”、“个体”和类似术语可互换使用并指代,除非另外说明,哺乳动物如人和非人灵长类,以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪和其它哺乳动物物种。该术语并不必然表示对象已经诊断患有特定疾病,但一般指代处于医务监督下的个体。患者可以是寻求治疗、监测、调节或改进现有治疗方案等的个体。

### [0053] C. 多重试验

[0054] 本发明所述的试验包括单一试验中检测超过一种分析物,并因此描述为多重试验。本文所述的试验包括用于在可区分的固体支持物上固定多种分析物,使得多种分析物各自可被流式细胞术鉴定和定量的组分。试验组分和考量包括固体支持物 and 如何互相区分不同类型的固体支持物(例如,标记物和其它分化参数)、特异性固定所需分析物并去除其它样品材料的组分、和用于检测和定量所需分析物的标记物。

[0055] 本文所述的多重试验包括使用固体支持物,一般是颗粒(也称为微粒或珠)。为了通过流式细胞术进行检测,应该避免发出自发荧光的颗粒,因为这会增加背景信号,因而它们合适。通过标准乳液聚合从多种起始单体产生的颗粒一般显示出低自发荧光,而已经修饰以增加孔隙率(“大孔”颗粒)的那些颗粒显示高自发荧光。这类颗粒中的自发荧光随着尺寸和二乙烯基苯单体百分比的增加而增加。

[0056] 在这些限制内,微粒的尺寸范围可变化而粒径范围不重要。在大多数情况中,在粒径上,微粒的聚集尺寸范围在约 0.3 微米至约 100 微米的范围内,例如,在约 0.5 微米至约 40 微米的范围内。

[0057] 本领域中通常使用磁性颗粒,并且可对于本文所述的试验更方便地进行分离和洗涤步骤。“磁性颗粒”、“磁力响应性材料”、“磁珠”等术语表示响应磁场的材料。磁力响应性材料包括顺磁性材料(例如铁、镍和钴,以及金属氧化物,如 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 、 $\text{CoO}$ 、 $\text{NiO}$ 、 $\text{Mn}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Cr}_2\text{O}_3$ 和 $\text{CoMnP}$ )、铁磁性材料、亚铁磁性材料和变磁性材料。磁力响应性材料并非组成完整微粒,而是一般组成微粒的一个组分,而其余由聚合材料组成,其可以经化学衍生化以允许试验试剂(例如,抗原或抗体)连接。

[0058] 作为试验的一部分,施加并移去磁场的方法和仪器是本领域技术人员已知的并且在文献中报道。文献报道的示例是Forrest等,US 4,141,687;Ithakissios, US 4,115,534;Vlieger等,Analytical Biochemistry 205:1-7(1992);Dudley, Journal of Clinical Immunoassay 14:77-82(1991);和Smart, Journal of Clinical Immunoassay 15:246-251(1992)。

[0059] 形成微粒的聚合基质可以是与本文所述的试验相容的任意材料。该基质应该对于生物样品的组分和试验试剂是惰性的,具有最小的自发荧光,在试验中使用的样品和任何其它试剂或洗涤中是固态且不溶,并且能够将试验试剂固定于微球。合适的聚合物的示例是聚酯、聚醚、聚烯烃、聚环氧烷、聚酰胺、聚氨酯、多糖、纤维素和聚异戊二烯。许多聚合物中可使用交联来赋予微粒结构完整性和刚性。

[0060] 用于连接试验试剂(例如,抗原或抗体)的官能团可通过常规手段整合到聚合物结构中。合适的官能团的示例是胺基团、铵基团、羟基、羧酸基团和异氰酸酯基团。试验试剂一般通过例如连接基团与固相表面直接或间接共价结合。连接基团可用作增加固相表面上反应性基团的密度并降低空间位阻以增加试验的范围和灵敏度的手段,或者用作增加向

固相表面增加特定类型的反应性基团以拓宽可与固相固定的试验试剂类型范围的手段。合适的可用连接基团的示例是聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚谷氨酸和聚精氨酸。

[0061] 多重试验中不同类型的微粒可通过例如尺寸、重量、光散射或吸收、或标记物（例如，荧光标记物）互相区分。

[0062] 在使用微粒尺寸作为分化因子（区分特性）的情况中，选择尺寸子范围的宽度和相邻子范围的平均直径之间的间隔以允许通过流式细胞术区分不同类型的微粒，这在流式细胞术的应用和说明之下对于本领域技术人员而言是明显的。一般而言，给定平均直径的子范围是平均直径的约  $\pm 5\%$  CV 或更小，其中 CV 是变异系数并定义为颗粒直径的标准偏差除以平均颗粒直径再乘以 100%。不同类型颗粒的子范围的平均直径一般由子范围之一的平均直径的至少约 6% 隔开，例如，子范围之一的平均直径的至少约 8% 或 10%。

[0063] 光散射也可用于区分不同类型的微粒。侧角光散射随着颗粒尺寸、粒度、吸光度和表面粗糙度变化，而前向角光散射主要受到尺寸和折射率的影响。改变任意这些性质可能导致光散射差异，其可用作区分各组的手段。

[0064] 分化参数的另一个示例是吸光度。当向颗粒施加光时，颗粒对光的吸光度主要表示为侧向（侧角）散射光的强度变化，而前向散射光的强度相对不受影响。由此，通过观察横向散射光强度的差异来确定各种与颗粒相关的有色染料之间的吸光度差异。

[0065] 可将广泛的参数或特征用作区分参数以区分一组的颗粒和另一组的颗粒。区分参数可来自颗粒尺寸、来自颗粒组成、来自影响光散射的颗粒物理特征、来自将不同发射光谱和 / 或散射特征赋予颗粒的可激发荧光染料或有色染料，或者来自不同浓度的一种或多种荧光染料。

[0066] 当可区分特征是荧光染料或颜色时，可将其包被于微粒表面上，包埋在微粒内或者连接至微粒材料的分子。因此，可通过将聚合物材料与荧光染料混合，或通过使用染料浸渍微粒来制造荧光微粒。已整合有染料并因此适用于本发明的微粒是市售可得的，可购自供应商，如斯菲罗公司 (Spherotech, Inc.) (美国伊利诺伊州利伯蒂维尔) 和分子探针有限公司 (Molecular Probes, Inc.) (美国俄勒冈州尤金)。可在例如网站 [molbio.princeton.edu/facs/FCMsites.html](http://molbio.princeton.edu/facs/FCMsites.html) 上找到流式细胞术产品的供应商。

[0067] 标记物可以是直接或间接发射或生成可检测信号的任意物质或组分。在一些实施方式中，标记物是荧光团，其中许多在文献中报道并因此为本领域技术人员已知，并且其中许多易于购得。荧光团的文献来源包括 Cardullo 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 8790-8794(1988) ;Dexter, J. of Chemical Physics 21 :836-850(1953) ;Hochstrasser 等, Biophysical Chemistry 45 :133-141(1992) ;Selvin, Methods in Enzymology 246 : 300-334(1995) ;Steinberg, Ann. Rev. Biochem. ,40 :83-114(1971) ;Stryer, Ann. Rev. Biochem. ,47 :819-846(1978) ;Wang 等, Tetrahedron Letters 31 :6493-6496(1990) ;以及 Wang 等, Anal. Chem. 67 :1197-1203(1995)。

[0068] 以下是可用作标签的荧光团示例：

[0069] 4- 乙酰胺基 -4' - 异硫氰酸根合芪 -2,2' 二磺酸

[0070] 吖啶

[0071] 吖啶异硫氰酸酯

[0072] 5-(2' - 氨基乙基) 氨基萘 -1- 磺酸 (EDANS)

- [0073] 4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基)苯基]萘酰亚胺-3,5二磺酸酯
- [0074] N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺
- [0075] 邻氨基苯甲酰胺 (anthranilamide)
- [0076] BODIPY
- [0077] 亮黄 (Brilliant Yellow)
- [0078] 香豆素
- [0079] 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC, 香豆素 120)
- [0080] 7-氨基-4-三氟甲基香豆素 (香豆素 151)
- [0081] 花青染料
- [0082] 荧光桃红 (cyanosine)
- [0083] 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)
- [0084] 5',5"-二溴连苯三酚-磺酞 (溴邻苯三酚红)
- [0085] 7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸根合苯基)-4-甲基香豆素
- [0086] 二亚乙基三胺五乙酸
- [0087] 4,4'-二异硫氰根合二氢-芪-2,2'-二磺酸
- [0088] 4,4'-二异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸
- [0089] 5-[二甲基氨基]萘-1-磺酰氯 (DNS, 丹酰氯)
- [0090] 4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸 (DABCYL)
- [0091] 4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯 (DABITC)
- [0092] 曙红
- [0093] 曙红异硫氰酸酯
- [0094] 赤藓红 B
- [0095] 赤藓红异硫氰酸酯
- [0096] 溴乙非啶 (ethidium)
- [0097] 5-羧基荧光素 (FAM)
- [0098] 5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素 (DTAF)
- [0099] 2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE)
- [0100] 荧光素
- [0101] 荧光素异硫氰酸酯
- [0102] 苒胺
- [0103] IR144
- [0104] IR1446
- [0105] 孔雀石绿异硫氰酸酯
- [0106] 4-甲基伞形酮
- [0107] 邻甲酚酞
- [0108] 硝基酪氨酸
- [0109] 副品红
- [0110] 酚红
- [0111] 藻红蛋白 (包括但不限于 B 型和 R 型)

- [0112] 邻苯二甲醛
- [0113] 茈
- [0114] 丁酸茈
- [0115] 琥珀酰亚胺基 1- 丁酸茈
- [0116] 量子点
- [0117] 活性红 4(Cibacron™亮红 3B-A)
- [0118] 6- 羧基 -X- 若丹明 (ROX)
- [0119] 6- 羧基若丹明 (R6G)
- [0120] 丽丝胺若丹明 B 磺酰氯
- [0121] 若丹明 B
- [0122] 若丹明 123
- [0123] 若丹明 X 异硫氰酸酯
- [0124] 磺基若丹明 B
- [0125] 磺基若丹明 101
- [0126] 磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物 (德州红)
- [0127] N, N, N', N' - 四甲基 -6- 羧基若丹明 (TAMRA)
- [0128] 四甲基若丹明
- [0129] 四甲基若丹明异硫氰酸酯 (TRITC)
- [0130] 核黄素
- [0131] 玫红酸
- [0132] 镧系螯合衍生物

[0133] 用于免疫试验的优选的一组荧光团是荧光素、荧光素异硫氰酸酯、藻红蛋白、若丹明 B 和德州红 (磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物)。本段落前列表中的任意荧光团可用于本发明所述的试验中,用于标记微粒或标记结合剂 (例如,抗体或链霉亲和素)。荧光染料通过常规共价结合,使用荧光染料上和微粒或结合剂上的合适官能团来连接。对此类基团的识别以及形成所述连接的反应对于本领域技术人员是显而易见的。

[0134] 可用于代替荧光团的其他标签是放射性标签和酶标签。这些方法也为本领域熟知。

[0135] 流式细胞术方法和已知是本领域已知的。可在例如 Introduction to Flow Cytometry :A Learning Guide(《流式细胞术介绍:学习指南》)(2000) 美国 BD 公司 (Becton, Dickinson, and Company);McHugh, " Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes(用于多重可溶分析物的定量和同时检测的流式微球免疫试验)" Methods in Cell Biology 42(《细胞生物学方法 42》), B 部分, (学术出版社 (Academic Press), 1994) 中发现仪器和方法的说明。

#### [0136] D. 实施例

[0137] 该实施例显示了在来自人对象的 46 个血浆样品组上进行本文所述的 HBV 多重试验的实施方式。9 个样品来自 HBV- 接种疫苗的患者,并且 37 个样品来自显示 HBV 感染症状的患者。使用 BioPlex 2200 试验测试样品是否存在抗 -HBs、抗 -HBc (总) 和抗 -HBc (IgM)。

通过流式细胞术得到读数,其能够按照其荧光染料特征以及结合各珠的抗体存在来检测各珠。HBsAg 珠结合所有结合 HBsAg 的抗体(主要是 IgG)。HBcAg 珠结合所有结合 HBcAg 的抗体(主要是 IgG 和 IgM)。抗 -IgM 珠结合所有 IgM 抗体,包括对 HBcAg 有特异性的那些。所有的珠都是有磁性的。制备以下各 8uL 的珠试剂:BioSpacific Ad/Ay (HBsAg)-包被珠(10mg/ml 母液);Steenvoorde HBc 309-包被珠(10mg/ml 母液);和 Medix 抗 - $\mu$  包被珠(10mg/ml 母液)+2ml 颗粒稀释剂。另外,各试验包括 2 种对照珠:内部标准珠 (ISB) (10mg/ml 母液)和血清检验珠 (SVB) (10mg/ml 母液)。ISB 设计为鉴定检测器波动,并且包被独特的荧光染料,在这种情况下称为四甲基若丹明尸胺 (TMRC)。SVB 设计为确认样品中血清或血浆的存在并包被抗 -FXIII (凝集因子 XIII)。

[0138] 用珠试剂孵育各样品,去除未结合的样品组分,并且洗涤现在偶联的珠。加入包含生物素化报告抗原和生物素化报告抗体的偶联剂 1。报告抗原包括识别并结合珠结合抗体的结构域,和可检测部分,用于直接或间接检测。在这种情况下,报告抗原和抗体是生物素化的 HBs Ad(0.6mg/ml 母液)、生物素化的 HBs Ay(0.58mg/ml 母液)、生物素化的 HBc307(0.55mg/ml 母液)、和生物素化的抗 -FXIII(1.17mg/ml 母液)。偶联剂 1 中的浓度分别为 1.25ug/ml、1.25ug/ml、和 0.2ug/ml、和 0.1ug/ml。同时,去除未结合的试剂,洗涤偶联的珠并且加入偶联剂 2。偶联剂 2 包括浓度为 6.0ug/ml 的链霉亲和素 -PE(1.0mg/ml 母液)。在该情况中,偶联剂包括用作缓冲和背景对照试剂的 1%海藻糖和 0.5% CHAPS,但是本领域技术人员会理解不同的试剂可用于这些目的。在洗涤之后,重悬样品并通过流式细胞术检测信号。

[0139] 如表 1 所示建立对照和校准值。

[0140] 表 1. 多重 HBV 试验的对照物和截止校准物读数

[0141]

	抗-HBs	抗-HBc (总)	抗-HBc (IgM)
<b>HBs_NC</b> 抗-HBs 试验的阴性对照物	<b>102</b>	59	67
<b>HBs_Cal</b> 抗-HBs 试验的截止校准物	<b>381</b>	59	60
<b>HBc_NC</b> 抗-HBc (总) 和抗-HBc (IgM) 试验的阴性对照物	76	<b>50</b>	<b>83</b>
<b>HBc_Cal</b> 抗-HBc (总) 试验的截止校准物	77	<b>221</b>	99
<b>HBcIgM_Cal</b> 抗-HBc (IgM) 试验的截止校准物	81	6840	<b>2148</b>

[0142] 一旦设定了对照值和校准值, 测试患者样品。在测试之前, 患者被分类为 (i) 急性感染, (ii) 接触 HBV, (iii) 易受感染, (iv) 曾感染和 (v) 免疫的。

[0143] 表 2. 多重 HBV 试验的原始患者数据

[0144]

样品编号	抗-HBs		抗-HBc (总)		抗-HBc (IgM)		状态
	信号	S/CO	信号	S/CO	信号	S/CO	
65255	48	0.1	1031	4.7	12460	5.8	急性感染
66311B	59	0.2	564	2.6	982	0.5	接触 HBV
65973	61	0.2	1063	4.8	27401	12.8	急性感染
66673	61	0.2	4405	20.0	25543	11.9	急性感染
66760	65	0.2	4365	19.8	26763	12.5	急性感染
KB72168	65	0.2	4224	19.2	28809	13.4	急性感染
U66398	66	0.2	2235	10.1	15284	7.1	急性感染
63906	67	0.2	1590	7.2	15204	7.1	急性感染
66761	67	0.2	3451	15.7	25968	12.1	急性感染
U66545	67	0.2	2068	9.4	15457	7.2	急性感染
66073	69	0.2	1592	7.2	27098	12.6	急性感染
66311	70	0.2	1387	6.3	15042	7.0	急性感染
66392	70	0.2	2042	9.3	19036	8.9	急性感染
U66546	71	0.2	2053	9.3	13631	6.3	急性感染
U66541	73	0.2	2640	12.0	15758	7.3	急性感染
66544	75	0.2	2247	10.2	16657	7.8	急性感染
65936	76	0.2	1816	8.2	28248	13.2	急性感染
U66075	76	0.2	2337	10.6	23647	11.0	急性感染
U66458	77	0.2	2477	11.2	23036	10.7	急性感染
67492	79	0.2	5843	26.5	28121	13.1	急性感染
U66525	80	0.2	8141	36.9	27705	12.9	急性感染
66672	81	0.2	5706	25.9	28489	13.3	急性感染
1365146-24	83	0.2	84	0.4	1287	0.6	易感染
1365146-21	96	0.3	8121	36.8	189	0.1	接触 HBV
1257146-9	125	0.3	13377	60.7	449	0.2	接触 HBV
67403	126	0.3	3183	14.4	27296	12.7	急性感染
1257146-5	130	0.3	21928	99.4	178	0.1	接触 HBV

[0145]

1257146-3	141	0.4	19368	87.8	165	0.1	接触 HBV
1257146-8	142	0.4	23585	107.0	166	0.1	接触 HBV
65579	171	0.4	12411	56.3	2763	1.3	急性感染
1365146-48	175	0.5	786	3.6	163	0.1	接触 HBV
U65370	200	0.5	1774	8.0	27122	12.6	急性感染
1365146-51	227	0.6	3495	15.9	151	0.1	接触 HBV
65471	279	0.7	1641	7.4	16979	7.9	急性感染
65480	685	1.8	60	0.3	89	0.0	免疫的
U65501	739	1.9	48	0.2	436	0.2	免疫的
67421	823	2.2	55	0.2	52	0.0	免疫的
U65499	1834	4.8	131	0.6	175	0.1	免疫的
1365146-46	4325	11.4	10223	46.4	261	0.1	曾感染
U65498	5234	13.8	50	0.2	113	0.1	免疫的
65487	18886	49.6	54	0.2	177	0.1	免疫的
67433	23311	61.3	58	0.3	189	0.1	免疫的
67439	23811	62.6	54	0.2	257	0.1	免疫的
1365146-52	28505	74.9	1435	6.5	203	0.1	曾感染
65477	29027	76.3	50	0.2	68	0.0	免疫的
1365146-45	30485	80.1	3757	17.0	667	0.3	曾感染

[0146] 数据解读，“反应性”（阳性）设定为 $\geq 1.0$ 的样品信号 / 截止 (S/CO) 校准物信号，而“非反应性”（阴性）设定为 $\leq 1.0$ 的样品 S/CO 校准物信号。表 3 显示了使用上述 S/CO 分数的原始结果的说明。

[0147] 表 3. 多重 HBV 试验的处理结果

[0148]

样品编号	抗-HBs	抗-HBc 总	抗-HBc IgM	说明
65255	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66311B	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
65973	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66673	非反应性	反应性	反应性	急性感染

[0149]

66760	非反应性	反应性	反应性	急性感染
KB72168	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66398	非反应性	反应性	反应性	急性感染
63906	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66761	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66545	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66073	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66311	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66392	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66546	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66541	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66544	非反应性	反应性	反应性	急性感染
65936	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66075	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66458	非反应性	反应性	反应性	急性感染
67492	非反应性	反应性	反应性	急性感染
U66525	非反应性	反应性	反应性	急性感染
66672	非反应性	反应性	反应性	急性感染
1365146-24	非反应性	非反应性	非反应性	易感染
1365146-21	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
1257146-9	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
67403	非反应性	反应性	反应性	急性感染
1257146-5	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
1257146-3	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
1257146-8	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
65579	非反应性	反应性	反应性	急性感染
1365146-48	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV
U65370	非反应性	反应性	反应性	急性感染
1365146-51	非反应性	反应性	非反应性	接触 HBV

[0150]

65471	非反应性	反应性	反应性	急性感染
65480	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
U65501	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
67421	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
U65499	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
1365146-46	反应性	反应性	非反应性	曾感染
U65498	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
65487	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
67433	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
67439	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
1365146-52	反应性	反应性	非反应性	曾感染
65477	反应性	非反应性	非反应性	免疫的
1365146-45	反应性	反应性	非反应性	曾感染

[0151] 提供上述实施例用于说明而非限制本发明的范围。本发明的其它变体对于本领域普通技术人员将是显而易见的并包括在所附权利要求中。通过引用将本文引用的所有发表物、数据库、网络资源、专利、专利申请和登录号全部纳入本文用于所有目的。

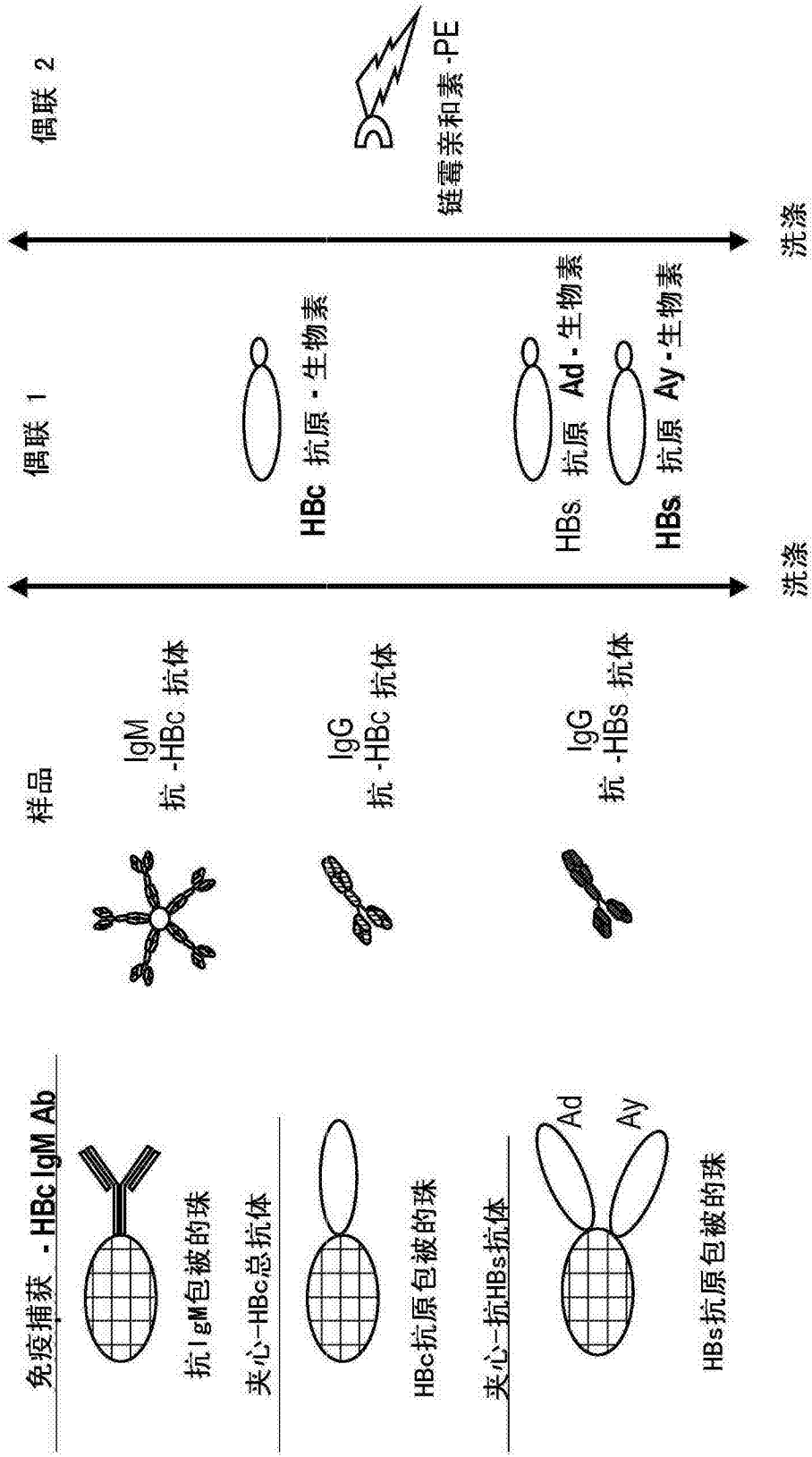


图 1

专利名称(译)	多重乙肝试验		
公开(公告)号	<a href="#">CN105358977A</a>	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201480031129.7	申请日	2014-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	R考尔 郑伟明 R沃克		
发明人	R·考尔 郑伟明 R·沃克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5761 G01N33/54326		
代理人(译)	余颖		
优先权	61/816518 2013-04-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文提供了用于检测个体是否感染乙肝病毒或是否曾感染乙肝病毒，和感染的阶段或消退的多重试验。另外，该多重系统可区分接种疫苗的对象和易感染乙肝的对象。

