

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 15/14 G01N 33/543



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01801518.2

[43] 公开日 2003 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 1439100A

[22] 申请日 2001.6.11 [21] 申请号 01801518.2

[30] 优先权

[32] 2000. 6. 12 [33] JP [31] 175914/2000

[32] 2000. 6. 14 [33] JP [31] 179058/2000

[32] 2000. 8. 3 [33] JP [31] 236199/2000

[86] 国际申请 PCT/JP01/04917 2001.6.11

[87] 国际公布 WO01/96868 英 2001.12.20

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.30

[71] 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 中嶋一博 鸟居经芳 土屋博

内田信也 小西绫 田中邦夫

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 6 页

[54] 发明名称 免疫测定方法和免疫测定装置

[57] 摘要

一种免疫测定方法，包括如下步骤：(a)混合全血样本和小于红细胞的敏化不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应；(b)将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中，该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子，以激光照射通过流动室的粒子，和检测由此产生的散射光；(c)根据散射光强度，设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值；和(d)根据步骤(c)中设定的临界值，从步骤(b)中检测到的散射光将未凝集粒子、凝集粒子和血细胞区分并计数。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种免疫测定方法，包括如下步骤：

(a) 混合全血样本和小于红细胞的敏化的不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应；

(b) 将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中，该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子，以激光照射通过流动室的粒子，并检测由此产生的散射光；

(c) 根据散射光强度，设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值；和

(d) 根据步骤(c)中设定的临界值，从步骤(b)中检测到的散射光将未凝集粒子、凝集粒子和血细胞区分并计数。

2. 根据权利要求1的免疫测定方法，进一步包括(e)从凝集粒子的数目和未凝集粒子的数目计算凝集程度，使用预先产生的标定线将凝集程度转换成全血样本中抗原或抗体的浓度。

3. 根据权利要求2的免疫测定方法，进一步包括(f)根据血细胞的数目校正抗原或抗体的浓度。

4. 根据权利要求3的免疫测定方法，其中通过使用如下公式进行校正：

$$C=C_0/(1-B/A),$$

其中 C 是校正值，C₀ 是全血样本中抗原或抗体的浓度，B 是血细胞的数目，A 是常数。

5. 根据权利要求1或2的免疫测定方法，进一步包括(g)获得全血样本中的平均细胞体积(MCV)，其中根据 MCV 测量值和血细胞的数目校正抗原或抗体的浓度。

6. 根据权利要求5的免疫测定方法，其中根据步骤(c)中设定的临界值，从步骤(b)中检测到的散射光获得平均细胞体积(MCV)。

7. 根据权利要求5的免疫测定方法，其中通过使用如下公式进行根据 MCV 测量值和血细胞的数目的校正：

$$C=CO/\{(1-B/A)\times(MCV/D)\},$$

其中 C, CO, A 和 B 和以上定义相同, MCV 是样本的 MCV 测量值, D 是常数。

8. 根据权利要求 1 的免疫测定方法, 其中散射光是向前散射光。

9. 根据权利要求 1 的免疫测定方法, 其中不溶性载体粒子的尺寸是 0.1 μm -1.0 μm 。

10. 根据权利要求 1 的免疫测定方法, 其中, 在步骤 (a) 中, 温度是 20-50 $^{\circ}\text{C}$ 和时间是 15 秒-20 分钟。

11. 根据权利要求 1 的免疫测定方法, 它是采用流式细胞仪的原理, 通过使用计数免疫测定的装置进行的。

12. 根据权利要求 1 的免疫测定方法, 其中要测定的样本是多个全血样本, 全血样本中包括血清样本。

13. 一种免疫测定装置, 包括:

反应部件, 用于混合全血样本和小于红细胞的敏化的不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应;

分配机构, 用于将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中, 该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子,

激光器, 用于以激光照射通过流动室的粒子, 和

光接收单元, 用于检测由此产生的散射光,

信号处理设施, 用于将光信号转换成电信号,

数据处理设施, 用于根据基于散射光强度的信号, 设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值; 和根据设定的临界值将未凝集粒子、凝集粒子和血细胞区分并计数。

14. 根据权利要求 13 的免疫测定装置, 进一步包括:

计算设施, 用于从凝集粒子的数目和未凝集粒子的数目计算凝集程度, 使用预先产生的标定线将凝集程度转换成全血样本中抗原或抗体的浓度; 和根据血细胞的数目校正抗原或抗体的浓度。

免疫测定方法和免疫测定装置

技术领域

本发明涉及免疫测定方法和免疫测定装置，更具体涉及通过使用流式细胞仪用于分析进行免疫凝集作用的样本的免疫测定方法和免疫测定装置。

背景技术

为了进行与感染疾病相关的测试项目的免疫测定，已经使用血清作为测试样本。然而，需要花费约 30 分钟以从全血中分离出血清，包括用于凝血的时间和用于随后离心的时间。

免疫测定的典型例子包括放射免疫测定 (RIA)、酶免疫测定 (EIA)、粒子凝集免疫测定和计数免疫测定。然而，在抗原-抗体反应之后，RIA 和 EIA 需要 B(结合形式)/F(游离形式)的分离，因此，在获得测定结果之前需要花费一定的时间和劳动。

粒子凝集免疫测定的优势在于它仅要求要测试的样本与不溶性载体粒子悬浮液(如胶乳)的混合，载体粒子由抗体或抗原敏化。因此它不要求 B/F 分离并可以通过简单操作进行。

此外，计数免疫测定使用血清或血浆，已知它是用于测量粒子凝集程度的测定方法，抗原结合的或抗体结合的胶乳粒子与样本中的抗体或抗原反应，使得它们根据抗原或抗体的数量而凝集。将凝集的胶乳粒子通过它们的尺寸区分和计数。未凝集胶乳粒子的计数由 M(单体)表示，至少两个凝集的胶乳粒子的计数由 P(聚合物)表示，M 和 P 的和由 T(总数)表示。将 P/T 计算为凝集程度。如果通过测量已知抗原或抗体浓度的凝集程度而预先确定了标定曲线，可以从样本的凝集程度找到样本中抗原或抗体的数量(Sinkai Etsuro 等: PAMIA 的测量原理, Sysmex J. 第 20 卷, No. 1, 77-78 页(1997))。由于将凝集粒子直接计数，和检测整个测试样本中的光学变化的比浊的免疫测定相比，此测定方法更准确。

然而，近年来，必须快速判断患者是否感染了病毒性肝炎、HIV 等，例如在急症手术的情况下。因此，需要缩短从采集血液到获得测试结果的测试时间。同样需要可以获得高度准确测试结果的简单免疫测定方法。

考虑到缩短测试时间的要求，更需要使用从患者采集的全血而不是使用血清，作为免疫测定样本。

例如，日本未审查专利公开 Hei 10(1998)-48214 提出了使用常规胶乳凝集方法进行的全血测定方法。根据此测定方法，将全血样本溶血，和通过胶乳比浊的免疫测定方法，根据它的免疫反应，测试获得的样本。此测定方法可简单而快速地提供测试结果。

然而，根据此测定方法，由于将全血溶血，溶血血细胞的血红蛋白或片段会干扰使用光学设施的比浊的免疫测定和限制此测定方法的准确度。因此，此测定方法不适于要求相对高的准确度，例如，与感染疾病相关的测试项目的情况。

根据血细胞比容值，全血通常包含约 40-50%的血细胞组分。如果全血使用量和使用血清时的量相同，它的测量值会低于采用血清而获得的数值，这反映了血细胞组分的数量(血细胞体积比含量)。为了使获得的测量值等于由血清测量获得的数值，需要以血细胞体积比含量校正测量值。

为达到此目的，在日本未审查专利公开 Hei 10(1998)-48214 中，单独测量血细胞比容值，并以测量的血细胞比容值校正测量值。

然而，分别测量血细胞用于校正是复杂的。为避免这种情况，免疫测定装置可以具有血细胞计数部分和免疫测定部分，但这样的装置较复杂和昂贵。因此，需要一种仅通过免疫测定部分，预测或校正血细胞影响的方法。

目前使用的完全自动化的免疫测定装置主要设计成用于测定血清(或血浆)样本，因此不含有搅拌器，而搅拌器对于测定全血样本是必须的。如果这样的装置用于全血样本的免疫测定，血细胞组分会沉淀和仅能使用上清液。测量值受血细胞比容值的影响不很严重，并不会从较低的数值偏离。

在此情况下，如果以单独测量的血细胞比容值校正测量值，该血细胞比容值是由用于全血测量的血细胞计数器测量的，如在日本未审查专利公开 Hei 10(1998)-48214 中公开的那样，测量值偏离更高值。结果是，不能获得精确的测量结果。

或者，在既可以用于全血样本也可以用于血清样本的市售装置中，通常通过在装置的操作盘上指定“全血测量”，而改变测量顺序，分析程序等用于全血样本的测量。然而，当使用全血样本时，如果样本较多，每次指定“全血测量”是耗时费力的事情，和，如果全血样本和血清样本都使用，当样本类型改变时，每次重新指定也是耗时费力的事情。此外，如果样本类型指定错误，就不能获得准确的测量结果。

发明概述

本发明的目的是提供一种方法，该方法可以对全血样本进行高度准确的免疫测定，而不需要溶血全血样本或从中分离出血清，该方法允许以血细胞比容值进行简单的校正。

本发明提供一种免疫测定方法，包括如下步骤：

(a) 混合全血样本和小于红细胞的敏化不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应；

(b) 将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中，该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子，以激光照射通过流动室的粒子，和检测由此产生的散射光；

(c) 根据散射光强度，设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值；和

(d) 根据步骤(c)中设定的临界值，从步骤(b)中检测到的散射光区分未凝集粒子、凝集粒子和血细胞并计数。

本发明也提供一种用于实现本发明免疫测定方法的免疫测定装置，包括：

反应部件，用于混合全血样本和小于红细胞的敏化不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应；

分配机构，用于将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中，该混

合物包括凝集粒子和未凝集粒子，

激光器，用于以激光照射通过流动室的粒子，和

光接收单元，用于检测由此产生的散射光，

信号处理设施，用于将光信号转换成电信号，

数据处理设施，用于根据基于散射光强度的信号，设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值；和根据设定的临界值区分未凝集粒子、凝集粒子和血细胞并计数。

附图简述

图 1 说明根据本发明全血免疫测定的测量原理；

图 2 是在根据本发明的全血免疫测定中，当粒子穿过激光时，代表产生的散射光的电脉冲的简图；

图 3 表示根据本发明全血免疫测定中凝集粒子的粒径分布；

图 4 表示本发明实施例 2 中血清中浓度(对照)和全血中浓度(未校正的)的相互关系；和

图 5 表示本发明实施例 2 中血清中浓度(对照)和全血中浓度(校正的)的相互关系；

图 6 表示本发明实施例 4 中血清中浓度(对照)和全血中浓度(未校正的)的相互关系；

图 7 表示本发明实施例 4 中血清中浓度(对照)和全血中浓度(仅以血细胞数目校正的)的相互关系；

图 8 表示本发明实施例 4 中血清中浓度(对照)和全血中浓度(以血细胞比容值校正的)的相互关系；

图 9 表示本发明实施例中血清中浓度(对照)和全血中浓度(以 MCV 数值和血细胞数目校正的)的相互关系；和

图 10 是显示用于实现本发明免疫测定方法的装置的简要框图。

进行本发明的最好方式

在本发明的免疫测定方法中，首先，在步骤(a)中，将全血样本和不溶性载体粒子混合以发生免疫凝集反应。在本发明中，免疫测定一般表示抗原或抗体的凝集程度、抗原或抗体的浓度等的测量。全血样本通常

表示从人体或其它动物采集的血液，但该血液没有进行血清或血浆分离。然而，在进行本发明的免疫测定之前，可以采用反应缓冲液等抗凝和/或稀释全血样本。

作为用于抗凝样本的抗凝剂，可以使用通常用于验血的那些物质，如 EDTA 盐、柠檬酸盐等。作为反应缓冲液，例如，可以使用磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。反应缓冲液的 pH 可以合适地为约 pH6-8.5。反应缓冲液的渗透压可以合适地使红细胞不溶血和优选为 150 mOsm/kg 或更高。如果需要，可以向反应缓冲液中加入抑制非特异性反应的物质、敏化剂等。全血和反应缓冲液的混合物可以是用于随后的免疫凝集反应的制剂。当以反应缓冲液稀释全血时，稀释比可以合适地为约 5-100(按体积)，和可以优选为 10-50。全血和反应缓冲液的混合温度和时间可以合适地是约 20-50°C 和约 1-5 分钟。

不溶性载体粒子可以是免疫的粒子，即以抗原或抗体敏化的粒子。作为用于粒子的材料，例如，可以提及的是合成聚合物，典型地是聚苯乙烯胶乳等。粒子合适地具有一定的尺寸使得粒子可以从血细胞，特别是红细胞区分开来。由于红细胞尺寸是，在平视图中平均粒径为约 7-8 μm 和厚度为约 2.2 μm ，故不溶性载体粒子合适地具有约 0.1-1.0 μm 的直径。粒子优选是均匀的。

不溶性载体粒子可以通过本领域已知方法，例如，通过物理吸收、化学结合等方法敏化。并不特别限定用于敏化粒子的抗原或抗体，只要它们能通过采用抗原/抗体反应检测到。不溶性载体粒子通常以其在溶剂中的悬浮液来使用，溶剂可以合适地是水、上述缓冲液等。不溶性载体粒子对溶剂的混合比合适地是约 0.1-1w/v%。

关于免疫凝集反应，将包含敏化的不溶性载体粒子的上述悬浮液加入到全血样本中，全血样本非必要地以反应缓冲液稀释，以进行抗原/抗体反应。在此，过量使用上述悬浮液以使所需的凝集反应充分进行。温度合适地是 20-50°C，时间合适地是 15 秒-20 分钟。

在步骤(b)中，检测来自获得的凝集反应混合物的散射光。

为了检测散射光，合适地使用可以检测散射光的装置用于计数血细

胞。优选，装置也具有用于免疫测定的设施，其中血细胞组分不影响反应体系，同时进行血细胞的计数。例如，由 Sysmex Corporation 生产的 PAMIA 系列产品提供采用流式细胞仪的原理用于计数免疫测定的测量装置。此系列产品合适的原因是，根据如下程序，单个装置可以进行免疫测定(胶乳凝集)和血细胞计数。

更具体地，用于实现本发明免疫测定方法的装置包括粒子检测块 A、信号处理块 B 和数据处理块 C，如图 10 所示。

粒子检测块 A 主要由样本供应部分 a 和粒子检测光学设施 b 组成。

样本供应部分 a 含有反应部件，如反应板 1；分配机构 2, 3，如用于将血样本，不溶性载体粒子和非必要的稀释剂分配到反应板池中的移液管；和非必要的振荡机构 4，如用于振荡反应板的偏心电机。样本供应部分 a 进一步含有用于将反应混合物分配到腔室 19 中的分配机构 20 和样本进料设施 21，如用于将腔室 19 中的反应混合物加入到粒子检测光学设施 b 中的护套注射器。

粒子检测光学设施 b 主要含有流动室 6，半导体激光器 7，光束阻挡器 8，透镜和光学接收单元 10，如图 1 所示。

如需要，信号处理块 B 含有滤波器缓冲器 11，功能放大电路 12，发射体 13，放大器 14 和/或其它器件可以将功能放大电路构造成使得线性放大器 12a，对数放大器 12b 等可以通过开关的动作来切换。

数据处理块 C 由如下组成：鉴别电路 15，微型计算机(例如，包括用于计数代表通过尺寸鉴别的粒子信号数目的设施，用于从计数信号的数目计算凝集比的算术设施，用于样本的控制设施和用于控制粒子检测块驱动设施)16，显示器 17，印刷电路 18 和/或其它器件，如需要。

换句话说，用于实现本发明免疫测定方法的免疫测定装置包括：

反应部件，用于混合全血样本和小于红细胞的敏化的不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应；

分配机构，用于将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中，该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子，

激光器，用于以激光照射通过流动室的粒子，和

光接收单元，用于检测由此产生的散射光，
信号处理设施，用于将光信号转换成电信号，

数据处理设施，用于根据基于散射光强度的信号，设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值；和根据设定的临界值将未凝集粒子、凝集粒子和血细胞区分并计数。

用于实现本发明免疫测定方法的免疫测定装置进一步包括：数据处理设施，用于从凝集粒子的数目和未凝集粒子的数目计算凝集程度，使用预先产生的标定线将凝集程度转换成全血样本中抗原或抗体的浓度；和根据血细胞的数目校正抗原或抗体的浓度。

为了检测来自凝集反应混合物的散射光，该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子，首先稀释反应混合物以将粒子浓度调节到适于计数的浓度，随后将稀释的反应混合物渐渐挤出成为在流动室 6 中形成的鞘液体的层流，使得粒子一个接一个地通过流动室的中心。例如，通过激光二极管 7，它优选处于和流动室成正交的方向上，以激光束照射通过流动室的粒子。在穿过流动室之后，激光束由光束阻挡器 8 使之停止。散射光由光接收单元 10，例如，光电二极管接收(图 1)。作为激光，可以使用波长为 310-1285nm 的光，例如，488nm、680nm、780nm、860nm、980nm 等。检测到的散射光可以是向前散射光，侧向散射光或两者都有。

当粒子经过激光时，产生散射光脉冲，它的强度基于粒子的体积。脉冲由光接收单元接收。通常情况下，将接收到的散射光脉冲转换成电脉冲(图 2)。因此，可以获得关于粒子的粒径分布信息。即，电脉冲的强度基于进入到激光中粒子的体积，该粒子可以是单个未凝集的粒子，两个凝集的粒子，三个凝集的粒子等，血细胞自身或其它物质。代表粒子体积的电脉冲显示粒径分布，如图 3 所示。

在步骤(c)中，根据散射光的强度，设定用于区分未凝集粒子，凝集粒子和血细胞的临界值。在使用全血样本的情况下，由于血细胞信息包括在凝集粒子信息中，故仅通过区分未凝集粒子和凝集粒子不能获得准确的凝集程度。由于它们的不同粒径，未凝集粒子，凝集粒子和血细胞具有不同的向前散射光强度，因此，它们可以相互区分开来。通过散射

光的强度可分别在未凝集粒子和凝集粒子之间，及在凝集粒子和血细胞之间设定临界值(L1, L2)，用于区分未凝集粒子和凝集粒子，和区分凝集粒子和血细胞(见图3)。

在此临界值可以按如下方式设定：可以根据测量的散射光强度，一旦测量到要测试的全血样本自身的散射光就设定；可以在获得数据之后，根据测量的散射光数据设定；或可以从已知信息，过去积累的数据或其它信息预先设定成预测临界值。特别是，考虑到测量误差和再现性，优选根据测量的散射光数据，通过建立关于测量散射光强度的临界值而设定临界值。

在步骤(d)中，根据临界值将未凝集粒子，凝集粒子和血细胞相互区分开来并计数。

例如，可以从超过凝集粒子和血细胞之间临界值(L2)的数据获得血细胞的数目，和可以通过如下方式准确地获得凝集粒子的数目 P：以在未凝集粒子和凝集粒子之间临界值(L1)或在该值之上的粒子计数减去获得的血细胞数目。或凝集粒子的数目 P 是 L1 和 L2 之间的计数。可以通过计数小于 L1 的粒子数目而获得未凝集粒子数目 M。通过使用后述方法或其它方法，可以从获得的数目或计数判断全血样本中抗原或抗体的存在情况。

如果样本中存在不需要测量的粒子，如乳糜微粒，这些粒子也包括在要测量的不溶性载体粒子的粒径分布中。在此情况下，不需要测量的粒子的粒径分布可以通过内插法，使用样条函数和从包括要测量的粒子和不需要测量的粒子的粒径分布中减去预测出来。因此可以获得仅为要测量的粒子的近似校正数据并将此数据用于计算凝集粒子和未凝集粒子的准确计数(参见日本专利号 2912413)。

在本发明中，进一步在步骤(e)中计算凝集程度。从计算的凝集程度，可以获得抗原或抗体的浓度。

凝集程度可由 $P/(M+P)$ 表示，其中 P 是以上获得的凝集粒子数目和 M 是以上获得的未凝集粒子数目。凝集程度是凝集粒子相对于所有计数的粒子的比例，凝集粒子是参与抗原/抗体反应的粒子。

可以通过使用预先产生的标定曲线，通过获得要测量的抗原或抗体的凝集程度与已知的抗原或抗体浓度之间的关系，获得抗原或抗体的浓度（优选，通过改变浓度测定多个凝集程度）。

同样，在步骤(f)中，可以根据血细胞的计数校正全血样本中抗原或抗体的浓度。即，在步骤(e)中获得的抗原或抗体浓度反映了全血样本中的血细胞比容含量，因此小于使用血清获得的浓度。所以要校正血细胞比容含量。

为了进行校正，使用血细胞数目，它是以上减去的。例如，可以通过使用如下校正公式进行校正：

$$C=C_0/(1-B/A) \quad (I)$$

其中 C 是校正值，C₀ 是全血样本中抗原或抗体的浓度，B 是血细胞的数目（在凝集粒子和血细胞之间临界值以上的计数值）和 A 是常数。在此公式中，可以从血细胞比容值和凝集粒子和血细胞之间临界值以上的计数值之间的相互关系，经实验获得常数 A。常数 A 对应于假设当血细胞比容值达到 100%（这表示全血样本仅包含血细胞组分）时的计数值。通过计算 B/A 可以得到采集的全血样本中血细胞组分的比例。

如果全血样本的血细胞组分沉淀，完全自动化的免疫测定装置仅吸取上清液血浆组分，上述 C₀ 受血细胞比容的影响较小，因此，不需要进行校正。此时，由于吸取的血浆组分中的血细胞数目(B)较小，上述公式中的 B/A 接近于 0 并且不进行校正。因此，通过使用本发明方法，即使采用全血样本也可以计算准确的测量值。

上述校正公式不仅适用于免疫测定部分单独进行免疫测定和计数血细胞的情况，也适用于使用免疫测定部分和血细胞计数都有的装置的情况。

或者，在步骤(g)中，可以根据红细胞的 MCV（平均细胞体积）和血细胞数目校正全血样本中抗原或抗体的浓度。例如，可以根据步骤(c)中设定的临界值，从步骤(b)中检测到的散射光获得 MCV 值。可以使用如下校正公式进行校正：

$$C=C_0/\{(1-B/A)\times(MCV/D)\} \quad (II)$$

其中 C，C₀，A 和 B 与以上定义相同，MCV 是样本的 MCV 测量值，D

是常数。

D 是 MCV 测量值的标准值并且一般为约 90f1，但可以是正常样本 MCV 测量值的平均值。

由于 MCV 通常在 89-99f1 的范围，故通常并不要求使用 MCV 进行校正。然而，例外样本的 MCV 值不在此范围内。对于这样的样本，仅根据血细胞的数目进行校正(公式(I))会产生一些误差。对于具有异常 MCV 的样本，根据 MCV，通过上述校正公式(公式(II))进行的另外校正可提供准确的测量值。

在本发明中，不仅可以采用全血样本，也可以采用其它类型的血样本。血样本在此包括血清样本，血浆样本等。优选，要测定的样本是多个全血样本，其中包括血清样本。

即，血清样本可以进行相应于用于测量凝集程度的上述步骤(a)到(d)的步骤、步骤(a)到(e)、步骤(a)到(f)或步骤(a)到(e)和(g)。

在血清样本进行相应于上述步骤的步骤的情况下，血清通常不包含血细胞，和因此，如果计数血细胞时，计数少数血细胞或仅获得非常小的数目。在此情况下，可以使用血清分析程序进行血清分析。在此，血清分析程序表示用于计算 P/T 作为凝集程度的程序，其中 P 是已经参与过免疫反应的凝集粒子的计数，T 是 P 和 M 的和，M 是未凝集粒子计数，或也是这样的程序，该程序用于使用标定线，从样本的凝集程度，进一步计算样本中抗原或抗体的量，该标定线是通过测量已知浓度的抗原或抗体的凝集程度而预先获得的。

血清分析程序或全血分析程序的选择优选在免疫凝集反应的早期阶段进行。通常，可以在免疫凝集反应充分进行之后，毫无问题地进行选择。然而，如果样本中抗原或抗体的浓度相当高，凝集粒子可与血细胞混合。在免疫凝集反应的早期阶段，由于反应还未充分进行，还未将凝集粒子当成血细胞，可以快速进行判断。在此，免疫凝集反应的早期阶段表示从反应开始到反应进行和达到平衡的期间。

在使用血清分析程序的情况下，优选设定边界血细胞数目用于识别血清或全血，并且如果血细胞数目不大于或小于设定的边界数目，用于识

别血清。

另一方面，在使用全血样本的情况下，计数大量的血细胞。因此，在此情况下，可以使用全血分析程序，根据步骤(a)到(d)、(a)到(e)、(a)到(f)或(a)到(e)和(g)，进行全血分析。在此，全血分析程序表示这样的程序，如果简单地从凝集程度计算出的抗原或抗体量反映全血样本中的血细胞组分，并显示较低的数值，该程序用于根据血细胞组分校正计算出的抗原或抗体量，并将该量转换成等于通过血清分析获得的抗原或抗体量。

更具体地，通过上述步骤(a)到(d)、步骤(a)到(e)或步骤(a)到(f)或(a)到(e)和(g)，获得凝集程度，非必要地测量抗原或抗体浓度和进一步根据血细胞的数目进行校正。

在本发明中，考虑到准确测量，优选在反应达到平衡之后获得凝集程度等。

通过实施例进一步详细描述本发明的免疫测定方法。

实施例 1

使用 PAMIA-50(由 Sysmex Corporation 生产)作为测量装置，RANREAM(注册的)HBsAg(由 Sysmex Corporation 生产)，HBsAg-阴性全血样本和 HBsAg-阴性血清样本，进行测量。RANREAM HBsAg 是用于测量 HBs 抗原的试剂盒并包括胶乳试剂，缓冲液，样本稀释剂和标定剂，其中胶乳试剂和缓冲液用于本实施例。胶乳试剂是以抗-HBs 抗体敏化的 0.8 μ m 聚苯乙烯胶乳的 0.5%(w/v)悬浮液。

将每个样本，10 μ L 和 80 μ L 的缓冲液(pH6)混合，在 45 $^{\circ}$ C 下保温片刻。将以抗-HBs 抗体敏化的聚苯乙烯胶乳，10 μ L 加入到其中以在 45 $^{\circ}$ C 下开始反应。在使用全血样本的情况下，样本量是 13 μ L 用于考虑到血细胞比容含量。

在反应开始约 20 秒之后，将 19 μ L 的反应混合物加入到 950 μ L 的鞘液体中变成 51 倍的稀释液。将稀释的反应混合物引入到 PAMIA-50 的光学检测器中以测量凝集程度 P/T(%) (T1)。

在反应开始约 15 分钟之后，以与凝集程度 P/T(%) (T1)相同的方式测

量凝集程度 P/T(%) (T2)。

T1 是在反应早期阶段的凝集程度并用于判断样本是否在测量范围内。通常，T2 用作样本的凝集程度(凝集比)。

测量显示未凝集粒子的峰值向前散射光强度约为 30 波道(ch)。向前散射光强度由波道数(ch)表示。从向前散射光强度分布，设定 62ch 的向前散射光强度作为区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值。

在全血测量的情况下，在 255ch 或更高的向前散射光强度下，有较强的信号。然而，在血清测量的情况下，在 255ch 或更高的向前散射光强度下，几乎没有信号。因此，当根据全血样本的所有信号数据判断凝集程度时，得到阳性判断。但是，当通过排除掉关于 255ch 或更高的数据而判断凝集程度时，正确地获得阴性判断，如表 1 所示。

表 1

	全血	血清(对照)
未凝集粒子数目(0-62ch)	108590	107943
凝集粒子数目①(62-254ch)	456	550
凝集粒子数目②(255ch 或更高)	23084	24
P/T%(使用数据①)	0.4%(-)	0.5%(-)
P/T%(使用数据①&②)	21.7%(+)	0.5%(-)

从这些结果出发，将凝集粒子和血细胞之间的临界值设定在 255ch，将 255ch 或更高的数据判断为血细胞的数据并将它从凝集粒子数目(在未凝集粒子和凝集粒子之间临界值或在该值之上的粒子数目)中排除掉。根据全血样本和血清样本(对照)确定凝集程度用于比较。结果见表 2。此外，将中断值设定为 1.5%。

表 2

	全血	判断	血清(对照)	判断
样本 1	27.22%	+	34.98%	+
样本 2	13.99%	+	15.17%	+
样本 3	8.93%	+	9.89%	+
样本 4	0.61%	-	0.62%	-
样本 5	0.64%	-	0.57%	-
样本 6	0.57%	-	0.58%	-

从上表可以看出，以在全血样本和血清样本之间的判断一致性可获得

良好的结果。

实施例 2

使用 PAMIA-50(由 Sysmex Corporation 生产)作为测量装置和 RANREAM FRN(由 Sysmex Corporation 生产)作为测量试剂测量全血样本。RANREAM FRN 是用于测量铁蛋白(FRN)抗原的试剂盒并包括胶乳试剂,缓冲液,样本稀释剂和标定剂。胶乳试剂是以抗-FRN 抗体敏化的 0.8 μ m 聚苯乙烯胶乳的 0.5%(w/v)悬浮液。

将样本, 10 μ L 和 80 μ L 的缓冲液(pH6)混合, 在 45 $^{\circ}$ C 下保温片刻。将以抗-FRN 抗体敏化的聚苯乙烯胶乳, 10 μ L 加入到其中以在 45 $^{\circ}$ C 下开始反应。

在反应开始约 20 秒之后, 将 19 μ L 的反应混合物加入到 950 μ L 的鞘液体中变成 51 倍的稀释液。将稀释的反应混合物引入到 PAMIA-50 的光学检测器中以测量凝集程度 P/T(%) (T1)。

在反应开始约 15 分钟之后, 以与凝集程度 P/T(%) (T1)相同的方式测量凝集程度 P/T(%) (T2)。

测量显示未凝集粒子的峰值向前散射光强度约为 30ch。从向前散射光强度分布, 设定 62ch 的向前散射光强度作为区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值。

在全血测量的情况下, 在 255ch 或更高的向前散射光强度下, 有较强的信号。然而, 在血清测量的情况下, 在 255ch 或更高的向前散射光强度下, 几乎没有信号。因此, 将凝集粒子和血细胞之间的临界值设定在 255ch, 将 255ch 或更高的数据判断为血细胞的数据。获得未凝集粒子, 凝集粒子和血细胞的数目, 和从未凝集粒子的数目和凝集粒子的数目确定 P/T(%)。

另外, 使用样本稀释剂(作为浓度为 0 的标定剂)和包含已知浓度 FRN 的标定剂, 通过进行相同的测量, 预先产生标定曲线。

使用产生的标定线, 将上述获得的 P/T(%) 转换成全血样本中的 FRN 浓度。

随后, 使用如下公式进行校正:

$$C=CO/(1-B/A)$$

在此，从血细胞比容值和预先获得的血细胞数目之间的相互关系，将 A 设定为 45,000。表 3 显示关于 20 个样本的测量结果。

表 3

样本号	血清中浓度 (对照) (ng/ml)	全血中浓度 (ng/ml)	血细胞数目	校正值 (ng/ml)
1	145.91	71.02	21683	137.06
2	106.94	54.38	19492	95.93
3	31.21	15.99	21457	30.56
4	45.08	22.07	21455	42.18
5	80.11	40.36	20495	74.12
6	19.93	15.89	1525	16.45
7	43.76	23.99	20347	43.79
8	178.49	85.86	22794	173.99
9	124.49	68.50	18541	116.50
10	24.20	15.54	17115	25.08
11	129.37	62.68	23975	134.15
12	75.68	39.21	20147	71.00
13	132.65	65.87	21130	124.18
14	19.93	4.67	18934	8.06
15	66.40	30.33	22641	61.04
16	38.42	20.88	19805	37.29
17	53.00	27.02	21414	51.55
18	16.07	7.98	16039	12.40
19	7.12	3.74	19436	6.58
20	81.87	41.06	20231	74.60

在样本 6 中，血细胞组分沉淀和吸取上清液。然而，通过校正，它显示良好的结果，没有显示更高的数值。

图 4 表示在血清中浓度(对照)和全血中浓度之间的相互关系。此相互关系较为良好，但全血样本中浓度低于血清中浓度。

图 5 表示在血清中浓度和校正值之间的相互关系。此相互关系较为良好，获得和在血清中获得数值相同的数值。

实施例 3

使用 RANREAM HBsAg(由 Sysmex Corporation 生产)和 PAMIA-50(由 Sysmex Corporation 生产)测量全血样本和血清样本。RANREAM HBsAg 和

胶乳试剂和实施例 1 中使用的相同。

标定剂是包含已知浓度 HBsAg 的溶液并能作为血清样本处理。

将每个样本，10 μ L 和 80 μ L 的缓冲液 (pH6) 混合，在 45 $^{\circ}$ C 下保温片刻。将以抗-HBs 抗体敏化的胶乳试剂，10 μ L 加入到其中以在 45 $^{\circ}$ C 下开始反应。

在反应开始约 20 秒之后，将 19 μ L 的反应混合物加入到 950 μ L 的鞘液体中变成 51 倍的稀释液。将稀释的反应混合物引入到 PAMIA-50 的光学检测器中以测量凝集程度 P/T(%) (T1)。

在反应开始约 15 分钟之后，以与凝集程度 P/T(%) (T1) 相同的方式测量凝集程度 P/T(%) (T2)。

预先测量标定剂和全血样本，和从向前散射光强度分布，将用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值设定为向前散射光强度 62ch。同样，将凝集粒子和血细胞之间的临界值设定为 255ch。

将用于选择血清分析程序或全血分析程序的边界血细胞数目设定为 200(对于 255ch 或更高值的计数值)。

用于选择血清分析程序或全血分析程序的血清/全血判断可以在凝集反应充分进行之后进行，但在此实施例中，当测量 T1 时进行判断。当测量 T1 时，特别是当样本中抗原或抗体浓度相当高时，免疫凝集反应并未充分进行和由凝集反应产生的凝集粒子的数据和关于 255ch 或更高值的数据不可能混在一起。因此，在反应的早期阶段进行判断是有益的。

其次，随机测量五个全血样本和五个血清样本并进行判断。结果见表 4。在表 4 的“判断”栏中，当将样本判断为血清样本并使用血清分析程序时，输入“血清”，当将样本判断为全血样本并使用全血分析程序时，输入“全血”。

表 4

样本号	关于 255ch 的计数	判断
No. 1(血清)	49	血清
No. 2(全血)	16366	全血
No. 3(全血)	15633	全血
No. 4(血清)	18	血清
No. 5(血清)	27	血清
No. 6(血清)	25	血清
No. 7(全血)	18196	全血
No. 8(全血)	17754	全血
No. 9(全血)	13864	全血
No. 10(血清)	45	血清

从上表可以看出，对于所有的样本，“血清”或“全血”的判断是正确的。根据此判断，选择血清分析程序或全血分析程序，并根据选择的分析程序计算凝集程度。

实施例 4

按照实施例 2 中相同的方式进行 21 个全血样本的测量，这些样本中包括具有异常 MCV 的样本。使用全自动血细胞分析仪 XE-2100(由 Sysmex Corporation 生产)，预先获得 MCV 和 Hct(血细胞比容)值。

获得的测量值标记如下：

- 未校正的(FRN 浓度)，
- 仅以血细胞数目校正的($C=CO/(1-B/A)$) (由血数目校正的)，
- 使用血细胞比容值校正的($C=CO/(1-Hct)$) (由 HCT 校正的)，
- 以 MCV 和血细胞数目校正的($C=CO/\{(1-B/A) \times (MCV/D)\}$) (由 MCV&血数目校正的)。

在此实施例中，从血细胞比容值和血细胞数目之间的相互关系，将 A 计算为 46000。将 D 设定为 90。

测量结果见表 5。

表 5

	血清 中FRN 浓度	全血中						
		HCT	MCV	FRN 浓度	255ch 或更高	用于校正的数据		
						血数目	HCT	MCV & 血数目
1	104.72	44.3%	97.4	51.69	18541	86.59	92.80	91.68
2	48.09	42.4%	88.1	27.35	20808	49.94	47.48	49.08
3	132.69	41.5%	93.7	70.40	17759	114.67	120.34	117.71
4	189.19	47.1%	87.5	103.73	22083	199.51	196.09	194.52
5	28.71	52.5%	91.0	13.88	23506	28.39	29.22	28.72
6	72.84	40.2%	91.8	67.28	1227	69.12	112.51	69.16
7	195.49	44.6%	95.9	102.52	19440	177.55	185.05	186.50
8	44.53	42.4%	93.8	42.16	1208	43.29	73.19	43.34
9	67.48	43.0%	89.2	36.97	20408	66.46	64.87	65.99
10	71.74	33.1%	66.7	49.63	20154	88.34	74.17	73.50
11	85.71	53.6%	89.6	40.78	24520	87.33	87.89	86.89
12	73.70	46.0%	89.5	38.00	21835	72.33	70.36	71.97
13	311.42	44.9%	110.2	179.96	17051	285.96	326.85	329.53
14	237.78	42.6%	95.7	135.21	18380	225.18	235.55	235.09
15	42.37	40.4%	95.3	24.25	17723	39.44	40.68	40.96
16	33.41	47.7%	86.3	17.71	23220	35.76	33.86	34.32
17	207.99	48.4%	95.5	108.61	21223	201.65	210.49	212.79
18	91.70	43.6%	95.4	88.14	1799	91.73	156.28	91.95
19	248.52	48.6%	91.4	132.09	22654	260.27	256.99	264.26
20	5.88	34.4%	86.6	6.58	1674	6.83	10.03	6.82
21	19.81	48.2%	99.4	10.49	20343	18.81	20.26	20.51

图 6 到 9 表示与作为对照的血清中浓度的相互关系。

由于血细胞组分的影响，在校正之前（图 6）的相互关系具有较小的斜率。血细胞组分沉淀的样本具有很高的数值。

在以血细胞数目校正之后的相互关系（图 7）中，校正了血细胞比容值的影响并且斜率接近于 1。尽管此相互关系事实上没有什么问题，MCV 值较低的样本具有稍微高的数值和 MCV 较高的样本具有稍微低的数值。

在以血细胞比容值校正之后的相互关系（图 8）中，校正了血细胞比容值的影响并且斜率接近于 1。将血细胞组分沉淀的样本错误地校正到具有很高的数值。

在以 MCV 值和血细胞数目校正之后的相互关系中，校正了血细胞比容值的影响并且斜率接近于 1。这种情况表示了最好的相互关系，和甚至可以合适地校正具有异常 MCV 的样本和血细胞组分沉淀的样本。

根据本发明，在没有预处理的情况下全血自身可以用作样本，并可以实现准确而简单的免疫测定。

同样，根据本发明，在全血免疫测定中，可以容易地将全血中抗原或抗体的浓度校正到和血清中浓度相同的数值，而不需要单独测量血细胞比容值。

此外，当样本中血细胞组分沉淀时，可以进行校正而不受到此沉淀的影响。

同样，通过同时测量全血中抗原或抗体的浓度，和计数全血中血细胞，和通过使用血细胞计数的校正公式，校正抗原或抗体的浓度，可以消除血浆组分减少的影响，血浆组分的减少是由于样本中的血细胞体积，该影响使得将抗原或抗体的浓度计算成较低的数值。因此，可以获得准确的测量值。

此外，根据本发明，可以测量样本而不需要注意样本的类型，即全血类型或血清类型。同样，由于不需要输入每个样本的类型，可以避免输入错误，并同样可以合适地选择适于每个样本的分析程序。因此，可以改进测量结果的可靠性和准确度。

图 1

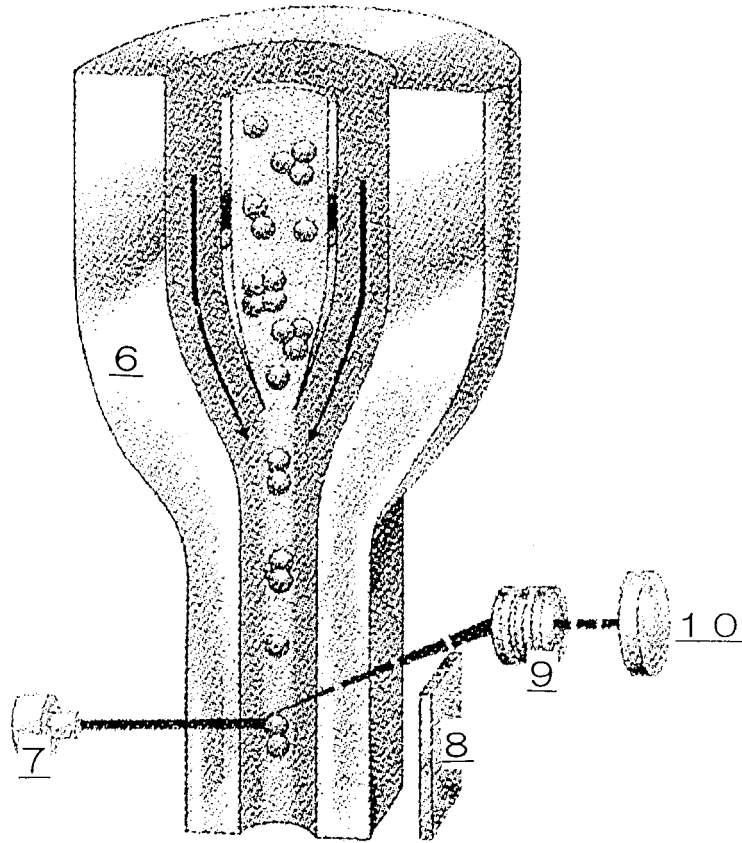


图 2

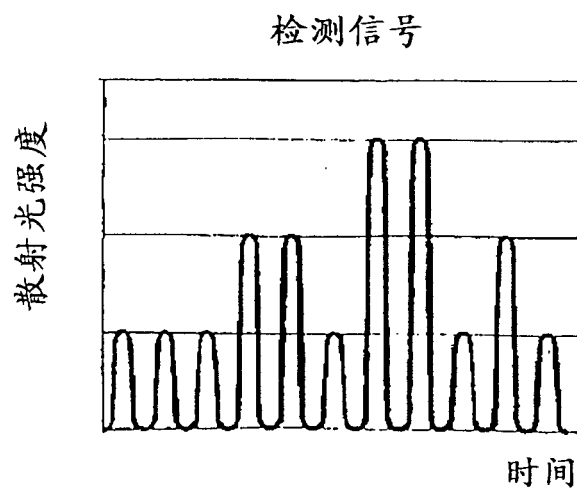


图 3

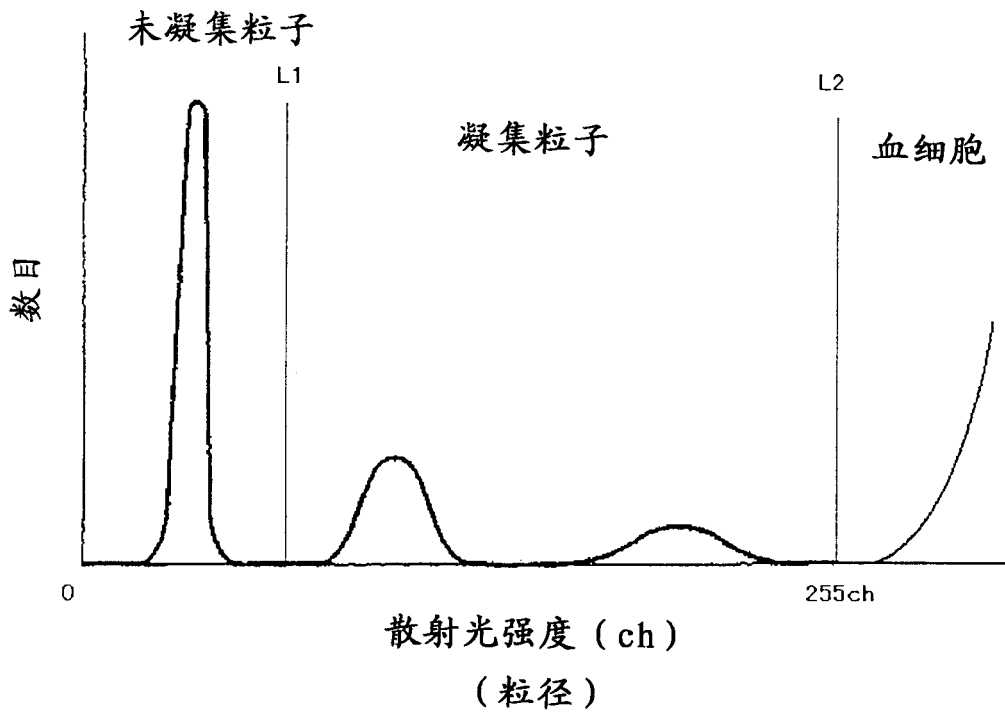


图 4

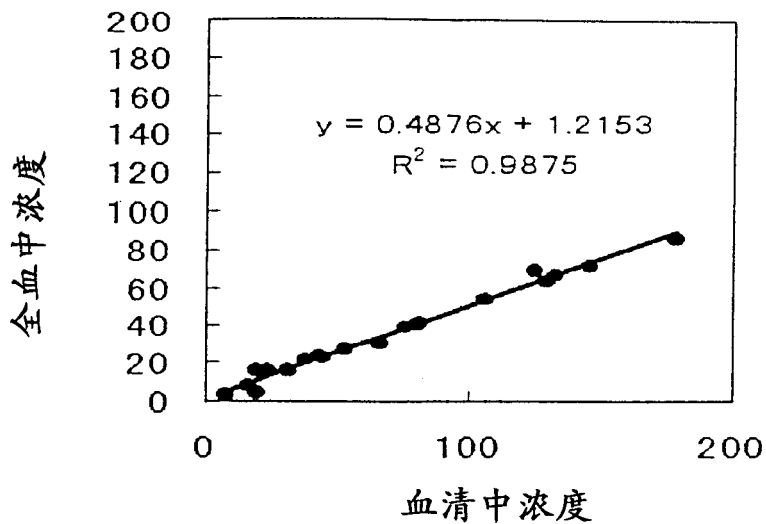


图 5

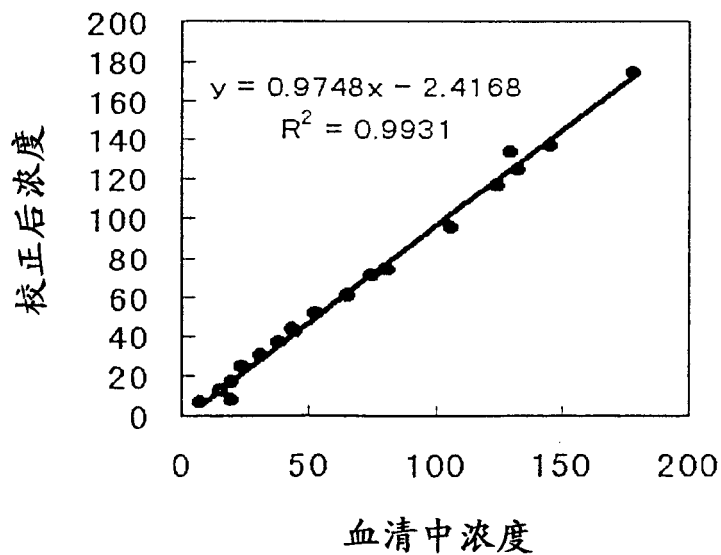


图 6

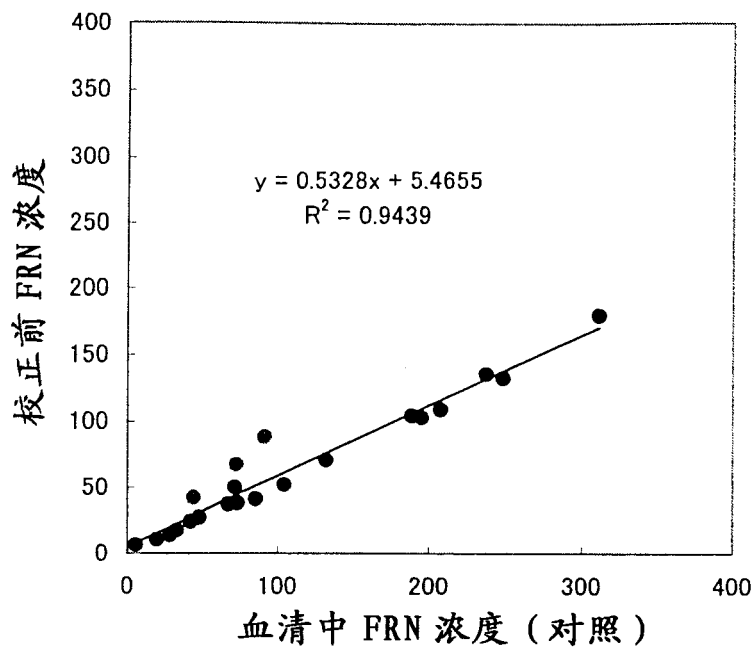


图 7

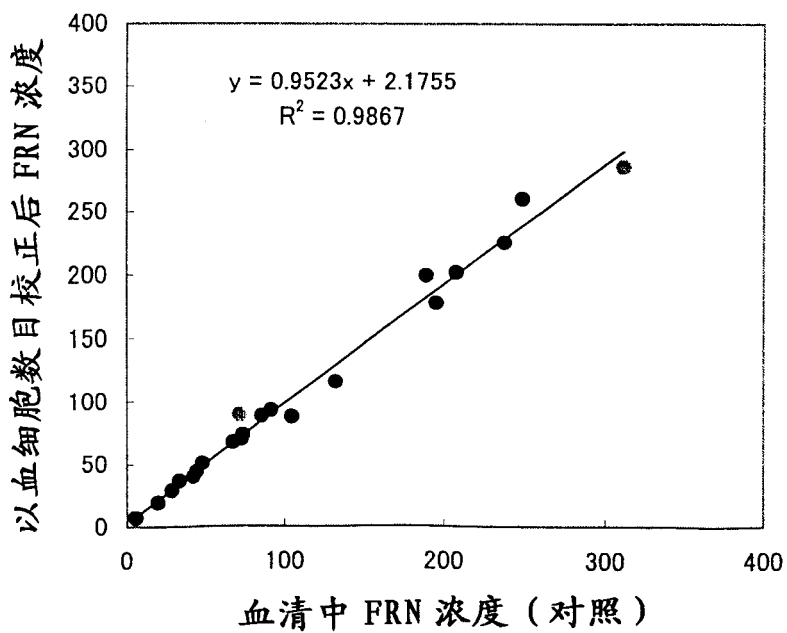


图 8

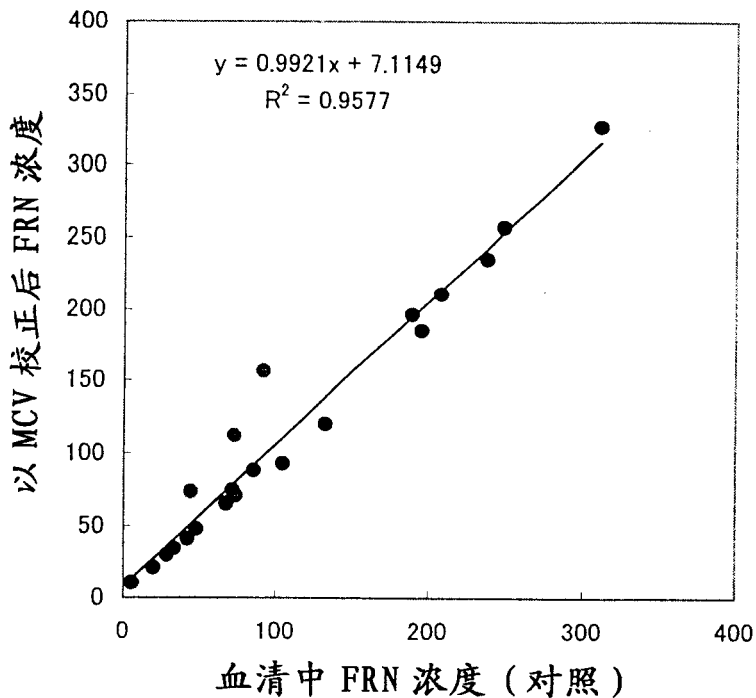


图 9

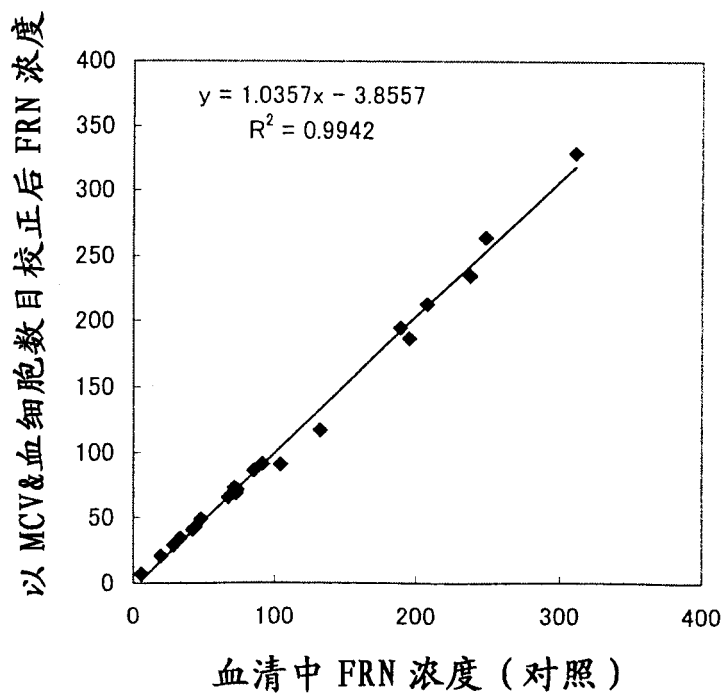
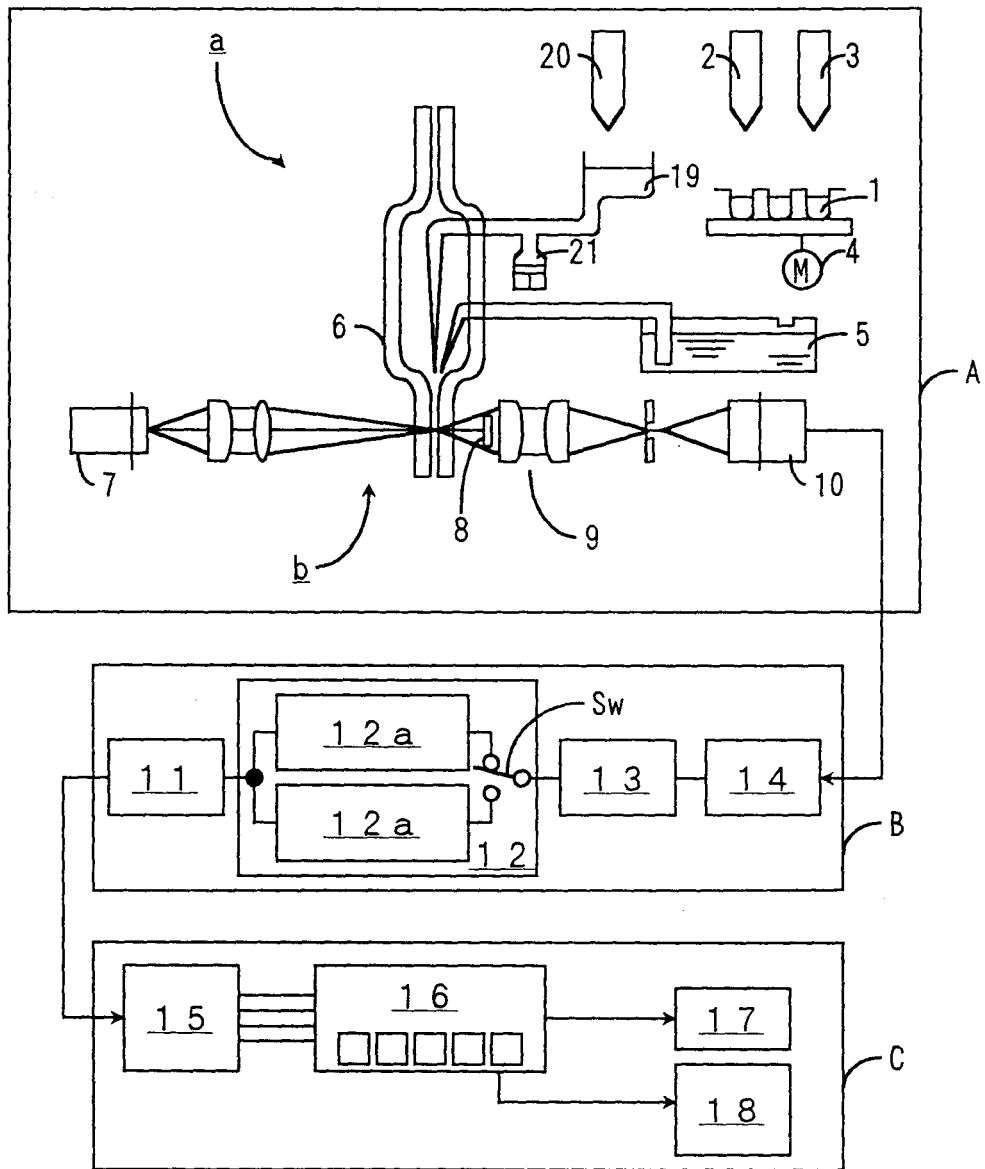


图 10



专利名称(译)	免疫测定方法和免疫测定装置		
公开(公告)号	CN1439100A	公开(公告)日	2003-08-27
申请号	CN01801518.2	申请日	2001-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	中嶋一博 鸟居经芳 土屋博 内田信也 小西绫 田中邦夫		
发明人	中嶋一博 鸟居经芳 土屋博 内田信也 小西绫 田中邦夫		
IPC分类号	G01N15/00 G01N15/14 G01N33/49 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2015/0092 Y10T436/101666 G01N2015/1486 G01N2015/0065 Y10S435/962 G01N33/54313 G01N15/1459 G01N33/54366 Y10T436/25125 Y10T436/106664		
代理人(译)	李华英		
优先权	2000175914 2000-06-12 JP 2000179058 2000-06-14 JP 2000236199 2000-08-03 JP		
其他公开文献	CN1317394C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种免疫测定方法，包括如下步骤：(a)混合全血样本和小于红细胞的敏化不溶性载体粒子以引起免疫凝集反应；(b)将获得的免疫凝集反应混合物引入到流动室中，该混合物包括凝集粒子和未凝集粒子，以激光照射通过流动室的粒子，和检测由此产生的散射光；(c)根据散射光强度，设定用于区分未凝集粒子和凝集粒子的临界值和用于区分凝集粒子和血细胞的临界值；和(d)根据步骤(c)中设定的临界值，从步骤(b)中检测到的散射光将未凝集粒子、凝集粒子和血细胞区分并计数。

