



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 33411—×××

代替 GB/T 33411-2016

## 酶联免疫分析试剂盒通则

Guidelines for enzyme immunoassays kit

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2024 年 8 月 15 日)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准代替GB/T 33411-2016《酶联免疫分析试剂盒通则》

本标准与GB/T 33411-2016相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了分类；
- 增加了定性试剂盒的技术要求；
- 增加了定量试剂盒特异性和稳定性技术要求；
- 增加了定量试剂盒特异性和稳定性的检验方法；
- 修改了灵敏度表示方法；
- 增加了四参数曲线拟合模型示例。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/T C387）提出并归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件及所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2016年首次发布为GB/T 33411-2016；
- 本次为第一次修订。

# 酶联免疫分析试剂盒通则

## 1 范围

本标准规定了酶联免疫分析试剂盒的技术要求、检验方法、使用说明书和标签。  
本标准适用于酶联免疫分析试剂盒。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 分类

### 4.1 按检验结果的判定方式，可分为定量分析试剂盒和定性分析试剂盒

定量是用抗原或抗体的校准品制备标准曲线，最终以浓度值进行报告。定性是参比阴性对照、阳性对照（或称阴性、阳性质控品）等的吸光度或荧光强度，以标本阴性对照比法（P/N）或标本阳性对照比法（S/CO）的比值等结果进行报告。

### 4.2 按方法原理和步骤的不同，可分为非竞争法和竞争法

其中非竞争法包括直接法、间接法和夹心法等，其特点是使用过量的试剂，被测抗原（抗体）同酶标抗体（抗原）及固相抗体或抗原的结合反应属非竞争性，酶标记物的结合量与被测物的浓度成正比。竞争法的特点是使用过量酶标抗原（抗体）和被测抗原（抗体）互相竞争性同固相抗体或抗原结合，固相抗体（抗原）结合酶标记物的量与被测物的浓度成反比。

## 5 技术要求

### 5.1 通用要求

#### 5.1.1 试剂盒主要组成及要求

试剂盒由一整套试剂和材料组成，应严格按照其说明书的规定使用，并满足下列要求：

- 包被微孔板：在微孔板上包被相应的抗体或抗原；
- 抗体：可使用多克隆抗体或单克隆抗体；
- 标准品：标准溶液；定性时，还应有阳性对照和阴性对照。
- 标记物：标记物可以是标记抗原、抗体或抗抗体；
- 标记酶为辣根过氧化物酶或其他适宜标记酶；
- 底物：过氧化氢溶液/四甲基联苯胺溶液或其他底物；

- g) 洗涤液：磷酸盐缓冲溶液或其他缓冲溶液；
- h) 终止液：硫酸溶液或其他溶液。

### 5.1.2 外观

试剂盒外观完整，内装试剂齐全；包被抗原或抗体的微孔板透明干燥且用真空包装；液体组分应澄清透明；冻干组分呈疏松体，经复溶后，其溶液应澄清，无异物。

## 5.2 定量分析试剂盒要求

### 5.2.1 标准曲线线性

以标准溶液考察线性和范围。标准曲线范围应在生产企业规定标准浓度范围内，其拟合线性相关系数的绝对值应大于0.99。

### 5.2.2 灵敏度

检测限值应符合相应规定的要求。定量限值应大于或等于标准曲线中最低浓度点值，满足一定的精密度和准确度的要求。

### 5.2.3 精密度

#### 5.2.3.1 批内变异系数

使用同一批次的试剂盒，至少选用2个浓度水平的样本，各重复检测10次，其变异系数应不大于20%。

#### 5.2.3.2 批间变异系数

使用3个批次的试剂盒，至少选用2个浓度水平的样本，各重复检测10次，其3个批次试剂盒之间的变异系数应不大于25%。

### 5.2.4 正确度

用有证标准物质进行验证。在标准曲线范围内，选取3个不同浓度水平检测，所添加浓度应涵盖方法测定低限浓度、方法测定最高浓度和关注浓度。对于已制定最高残留限量（MRL）的物质，关注浓度为MRL；对于未制定MRL的物质，关注浓度为常见限量指标；对于禁用物质，关注浓度为两倍方法测定低限。回收率应在60%~120%范围内。

### 5.2.5 特异性

试剂盒与目标分析物、相关或相似干扰物（目标分析物结构类似物、代谢物等）存在交叉反应的，交叉反应率应符合相应规定的要求。

### 5.2.6 稳定性

试剂盒在有效期内，在规定的保存条件下，稳定性试验的各项性能指标应符合产品质量标准要求。每一批试剂盒应留样，并定期作2℃~8℃稳定性考核；试剂盒成品出厂前应做加速稳定性试验，在规定的加热条件（如37℃）下放置规定时间，检测的各项性能指标应符合产品质量标准要求。

## 5.3 定性分析试剂盒要求

### 5.3.1 阴性对照品符合率

对阴性对照品（菌株）进行检测，其阴性对照品（菌株）符合率应符合相应规定的要求。

5.3.2 阳性对照品符合率

对阳性对照品（菌株）进行检测，其阳性对照品（菌株）符合率应符合相应规定的要求。

5.3.3 检测限

对检测限的对照品（菌株）进行检测，结果应符合相应规定的要求。

5.3.4 精密度

5.3.4.1 批内变异系数

用重复性对照品（菌株）重复检测10次，其变异系数应符合相应规定的要求。

5.3.4.2 批间变异系数

使用3批次的试剂盒，用临界限或关注浓度水平的对照品（菌株），各重复检测10次，则3批次试剂盒之间的变异系数应符合相应规定的要求。

5.3.5 稳定性

试剂盒在有效期内，在规定的保存条件下，稳定性试验的各项性能指标应符合产品质量标准要求。每一批试剂盒应留样，并定期作2℃~8℃稳定性考核；试剂盒成品出厂前应做加速稳定性试验，在规定的加热条件（如37℃）下放置规定时间，检测的各项性能指标应符合产品质量标准要求。

6 检验方法

6.1 定量分析试剂盒的检验方法

6.1.1 标准曲线

标准曲线至少由5个浓度组成，每个浓度至少重复测定2次，其均值作为该标准曲线的测定值。按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值或其他测定值。通过标准液浓度和测定值拟合标准曲线，并计算相关系数。

示例1：

Y-Ln(X)标准曲线拟合，按式（1）计算百分吸光度比值，按式（2）建立方程。

$$Y = \frac{B}{B_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

$$Y = a + b \ln X \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- Y ——百分吸光度比值；
- B<sub>0</sub> ——零浓度标准溶液的吸光度值；
- B ——标准溶液吸光度值；
- X ——标准品浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- a ——截距；
- b ——斜率。

示例2：

四参数曲线拟合，按式（3）建立方程。

$$Y = D + \frac{A-D}{1+[X/C]^B} \quad (3)$$

式中：

Y —— 吸光度值；

A —— 最大吸光度值；

B —— 吸光度增加速率参数，即曲线在 $EC_{50}$ 处的斜率；

C —— 吸光度增长速度开始发生变化的浓度值，即半效反应浓度（ $EC_{50}$ ）；

D —— 最小吸光度值；

X —— 标准品浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

### 6.1.2 灵敏度

按产品使用说明书的程序操作，测定标准溶液的吸光度值，绘制标准曲线。重复测定空白样品或阴性样品不少于10次，通过标准曲线计算得到对应浓度的平均值（ $\bar{x}_0$ ）和标准偏差（s），得出 $\bar{x}_0+3s$ ，即为检出限。按检测方法标准要求处理样本，以大于或等于标准曲线中最低浓度点值，计算样本的浓度，即为定量限。

### 6.1.3 精密性

使用同一批次的试剂盒，至少选用2个浓度水平的样本，各重复检测10次，按产品使用说明书的程序操作测定。统计10次测量浓度结果的平均值和标准差，计算批内变异系数。

使用3批次的试剂盒，至少选用2个浓度水平的样本，各重复检测10次，按产品使用说明书的程序操作测定。统计30次测量浓度结果的平均值和标准差，计算批间变异系数。按（4）式计算变异系数。

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

CV —— 变异系数；

s —— 标准差；

$\bar{x}$  —— 平均测定值。

### 6.1.4 正确度

将已知高、中、低浓度标准溶液添加至样本中，按产品使用说明书的程序操作，测定吸光度值或其他测定值，通过拟合标准曲线计算测定浓度值，按（5）式计算回收率。

$$R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\% \quad (5)$$

式中：

R —— 回收率；

$C_1$  —— 加标之后测定的浓度；

$C_2$  —— 加标之前测定浓度；

$C_3$  —— 加入目标分析物的理论浓度。

### 6.1.5 特异性

根据试剂盒类型选择交叉反应率的验证方法,按照酶联免疫试剂盒说明书的程序操作,测定与目标分析物、相关或相似干扰物(目标分析物结构类似物、代谢物等)交叉反应。

方法一,将目标分析物的干扰物加入样本中,其浓度可以是定量限10倍、100倍或更高,采用试剂盒测定其含量,按公式(6)计算交叉反应率。

$$CR = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

式中:

式中:

CR——交叉反应率;

C<sub>1</sub>——添加样本的测量均值;

C<sub>2</sub>——对照样本的测量均值;

C<sub>3</sub>——干扰物浓度。

方法二,适用于竞争法试剂盒。分别将目标分析物及干扰物分别配制成标准系列浓度,依法检测,并分别拟合标准曲线,得目标分析物和干扰物半数抑制浓度,按公式(7)计算交叉反应率。

$$CR = \frac{B_{IC50}}{A_{IC50}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

式中:

CR——交叉反应率;

A<sub>IC50</sub>——干扰物的50%抑制浓度;

B<sub>IC50</sub>——目标分析物的50%抑制浓度。

## 6.1.6 稳定性

### 6.1.6.1 稳定性实验

取至少三批次试剂盒试验,至规定的储存条件下保存至有效期末,常规保存温度为2℃~8℃,可根据保存期,间隔一定的时间测定一次。依5.2.1条款~5.2.4条款(适用时增加5.2.5条款)检测各项指标。

### 6.1.6.2 加速稳定性试验

取至少三批次试剂盒试验,根据生产企业所声称的热稳定性条件(如37℃放置至少2天~6天),可根据保存期,间隔一定的时间,依5.2.1条款~5.2.4条款(适用时增加5.2.5条款)检测各项指标。

## 6.2 定性分析试剂盒的检验方法

### 6.2.1 阴性对照品符合率

对阴性对照品(菌株)进行检测。按照试剂盒的说明书进行检测和判定,计算阴性对照品符合率。计算公式:阴性对照品符合率=结果为阴性的对照品数量/总对照品数量×100%。

### 6.2.2 阳性对照品符合率

对阳性对照品(菌株)进行检测,按照试剂盒的说明书进行检测和判定,计算阳性对照品符合率。计算公式:阳性对照品符合率=结果为阳性的对照品数量/总对照品数量×100%。

### 6.2.3 检出限

用阳性对照品（菌株）进行系列稀释，按产品使用说明书的程序操作进行检测和判定，满足阈值的最低检出量，即为检出限。

#### 6.2.4 精密度

用接近临界值的阴性或阳性对照品（菌株），重复检测10次，按产品使用说明书的程序检测和判定，统计10次测定吸光度或COI或S/CO比值等结果的平均值和标准差，计算批内变异系数。

使用3批次的试剂盒，用临界限或关注浓度水平的参考品（菌株）各重复检测10次，按产品使用说明书的程序操作判定，统计30次测定吸光度或COI或S/CO比值等结果的平均值和标准差，计算批间变异系数。按式（4）计算变异系数。

#### 6.2.5 稳定性

##### 6.2.5.1 稳定性试验

取至少三批次试剂盒试验，至规定的储存条件下保存至有效期末，常规保存温度为2℃~8℃，可根据保存期，间隔一定的时间测定一次。依5.3.1条款~5.3.4条款检测各项指标。

##### 6.2.5.2 加速稳定性试验

取至少三批次试剂盒试验，根据生产企业所声称的热稳定性条件（如至37℃放置至少2天~6天），可根据保存期，间隔一定的时间，依5.3.1条款~5.3.4条款检测各项指标。

### 7 使用说明书要求

- a) 试剂盒应附产品使用说明书，或等价的指导性文件。文件内容应至少包括以下部分：
- b) 产品名称；
- c) 测定原理；
- d) 适用范围，提及检测的目标物和适用的基质范围；
- e) 使用单位需自备的设备和试剂；
- f) 主要组成成分；
- g) 操作指南，包括样品前处理的方法、检测方法、结果判定等；
- h) 分析质量参数：标准曲线、灵敏度、正确度、精密度和交叉反应等；
- i) 保存条件和有效期。

### 8 标签

试剂盒外包装应标示如下内容：产品名称、生产批号或生产日期、规格和数量、运输和保存温度、有效期、生产企业名称和地址。

---