



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

酶联免疫试剂盒检测通则

Guidelines for enzyme immunoassays kit test

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

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

酶联免疫试剂盒检测通则

1 范围

本文件描述了酶联免疫试剂盒的检测一般要求和检测过程。

本文件适用于酶联免疫试剂盒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 4889 数据的统计处理和解释 正态分布均值和方差的估计与检验

GB/T 27404 实验室质量控制规范 食品理化检测

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 一般要求

4.1 产品

酶联免疫试剂盒应附产品说明书，或等等的指导性文件。

4.2 实验室

实验室的生物安全管理应符合GB 19489中的相应要求。

4.3 检测人员

检测人员应熟悉相关法律法规、检测方法原理，掌握质量检测操作规范、技术标准、质量管理和实验安全等专业知识和技能。

4.4 检测指标

标准曲线相关系数、灵敏度、精密度、正确度和特异性。

5 检测过程

5.1 检测样品的选择及制备

5.1.1 阴性样品与待分析样品应来源于同一物种，并具有相似的结构特性，包括不含有或方法学未能检出目标分析物的样品，以及含有或添加其他与目标分析物结果类似物质（易产生交叉反应）的样品，按酶联免疫试剂盒说明书的步骤进行前处理。

5.1.2 阳性样品是指含有目标分析物的待测样品，按酶联免疫试剂盒说明书的步骤进行前处理。

5.1.3 阴性样品和阳性样品应具有基质符合性，以及与实际样品所含除目标分析物外其他成分的相似性，重点考虑典型样品基质或相似基质，综合考虑蛋白、脂肪、水分、糖分、高聚物或多聚体物质、色泽、酸碱性等影响检测的组分进行区分选择。

5.1.4 对于多种目标分析物的检测，尽可能对全部目标分析物进行检测，若因客观条件限制不能检测全部目标分析物，宜对所有目标分析物进行分类（如结构类似程度、危害程度等），每一类至少选择一种目标分析物进行检测。

5.1.5 阳性样品或阴性样品宜采用国家有证标准物质、参考物质或者质量控制品等，选择适宜的实验室标准分析方法或经典方法对样品中的目标分析物进行仪器测定，确认所有阴性样品不能检出目标分析物，确认所有阳性样品中目标分析物的浓度。测定完成后的各类样品应进行随机编号处理，形成盲样，可自行制备。

5.2 试剂准备

将试剂盒从冷藏环境中取出，在室温平衡 15-30 分钟后，按照酶联免疫试剂盒说明书配制标准品、洗涤缓冲液、样本稀释液、抗体工作液、酶标抗体工作液、底物、终止液等相关试剂。

5.3 操作步骤

根据待测样本数量、系列标准溶液、空白对照孔的数量决定所需的酶标板板条数，每个样本及标准溶液重复测定2次或3次。记录实际加样情况，按照酶联免疫试剂盒说明书中的步骤进行操作。

5.4 结果计算

5.4.1 标准曲线

按照酶联免疫试剂盒说明书的程序操作，读取各孔的吸光值并取平均值，通过系列标准浓度与针对每个浓度获得的平均吸光值绘制标准曲线。得到四参数拟合标准曲线或其他规定的标准曲线。

以标准品吸光度值为纵坐标，以标准品浓度为横坐标，进行四参数曲线拟合，按式（1）建立方程，并计算相关系数。

$$y = d + \frac{a-d}{1+(\frac{x}{EC_{50}})^b} \dots\dots\dots (1)$$

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；

EC_{50} — 半数抑制浓度；

d — 最小吸光度值；

相关系数的计算：利用数据统计处理软件计算相关系数。

5.4.2 数据计算

通过标准曲线计算得到每个样本的测定浓度值。若样本吸光度值超出标准曲线范围，则先稀释至合适倍数，重新进行检测，其分析结果为标准曲线计算获得的浓度乘以稀释倍数。

5.5 数据分析

5.5.1 灵敏度

重复测定空白样本或阴性样本不少于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)，计算 \bar{x}_0+3s ，即为检出限。计算 \bar{x}_0+10s ，即为定量限。

5.5.2 精密度

使用同一批次的试剂盒，选取低、中、高3个浓度水平的阳性样本重复测定10次，计算得到批内变异系数。使用3个不同批次的同一试剂盒，选取低、中、高3个浓度水平的阳性样本每个批次重复测定3次，计算得到批间变异系数。

按式(2)计算变异系数：

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

CV — 变异系数，单位为%；

s — 标准偏差；

\bar{x} — 重复测定的平均值。

实验室内的变异系数范围可参考附录A。

5.5.3 正确度

5.5.3.1 与参比方法的一致性

采用试剂盒与已知的国际或国家认可的参考方法对同一份样本进行重复测定10次，按GB/T 4889中的F检验和T-检验进行评价，具体参见附录B。

5.5.3.2 采用有证标准物质

对有证标准物质进行10次重复检测，计算10次重复检测的平均值、标准偏差和变异系数，按照公式(3)计算正确度。

$$\text{正确度}(\%) = \frac{\text{检测值}}{\text{认定值}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

5.5.3.3 回收率

选用试剂盒适用的每种基体，添加低、中、高3个浓度水平的目标分析物，每个水平重复测定10次，计算检测结果的平均值与理论值的偏差。3个浓度水平的偏差范围可参考附录C。

5.5.4 特异性

按照酶联免疫试剂盒说明书的程序操作，测定与目标物的结构类似物或功能类似物的交叉反应。

对于夹心法试剂盒，配制一定浓度（C）的结构类似物，采用试剂盒检测计算得到相应的浓度（C'），按照公式（4）计算交叉反应率（CR）。

$$CR = \frac{C'}{C} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

CR — 交叉反应率，单位为%；

C — 结构类似物的配制浓度；

C' — 结构类似物的测定浓度；

对于竞争法试剂盒，将结构类似物稀释至系列浓度，按照4.4.1步骤得到相应的半数抑制浓度，按照公式（4）计算交叉反应率。

$$CR = \frac{\text{目标物的}EC_{50}}{\text{类似物的}EC_{50}} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

式中：

CR — 交叉反应率，%；

EC_{50} — 半数抑制浓度，根据标准曲线计算得到。

附录 A
(资料性)
实验室内部的变异系数范围

被测组分含量	实验室内变异系数 (CV) /%
0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	43
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	30
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	21
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	15
1 mg/kg	11
10 mg/kg	7.5
100 mg/kg	5.3
1000 mg/kg	3.8
1%	2.7
10%	2.0
100%	1.3

本表引自GB/T 27404-2008的附录F. 2。

附录 B
(资料性)
与参比方法一致性评价

先采用F检验，考察酶联免疫试剂盒与已知的国际或国家认可的参考方法所取得的两组数据的标准偏差是否一致；若一致，再采用配对T检验，考察两组数据的平均值是否存在显著性差异，若不存在显著性差异，说明两种方法测定结构具有较好的一致性。

B.1 F 检验

按照公式B.1进行F检验，考察两组检测数据的标准偏差是否一致，若一致按B.2执行；若不一致，则两组检测结果不一致。

$$F = \frac{S_{大}^2}{S_{小}^2} \dots \dots \dots (B.1)$$

式中：

S_大 一两组数据中标准偏差大的数值；

S_小 一两组数据中标准偏差小的数值；

B.2 T 检验

按照公式B.2进行T检验，

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \dots \dots \dots (B.2)$$

式中：

x₁ 一第1组测定结果的平均值；

x₂ 一第2组测定结果的平均值；

s 一两组等精度测定结果的合并实验标准偏差；

n₁ 一第1组测定的平行测定次数；

n₂ 一第2组测定的平行测定次数。

其中，两组等精度测定结果的合并实验标准偏差s按公式B.3计算：

$$s = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \dots \dots \dots (B.3)$$

式中：

s₁ 一第1组测定结果的标准偏差；

s₂ 一第2组测定结果的标准偏差。

附录 C
(资料性)
回收率偏差范围

浓度水平范围 mg/kg	回收率范围 %
>100	95-105
1-100	90-110
0.1-1	80-110
<0.1	60-120

本表引自GB/T 27404-2008的附录F.1。