



中华人民共和国国家标准

GB/T 33411—2025

代替 GB/T 33411—2016



酶联免疫分析试剂盒通则

Guidelines for enzyme immunoassays kit

2025-04-25 发布

2025-04-25 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。

本文件代替 GB/T 33411—2016《酶联免疫分析试剂盒通则》，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：

- 更改了适用范围(见第 1 章,2016 年版的第 1 章)；
- 更改了检出限的要求及检验方法(见 4.4.2 和 5.2,2016 年版的 2.4.1 和 3.3)；
- 删除了定量限的要求(见 2016 年版的 2.4.2)；
- 增加了特异性的要求和检验方法(见 4.4.3 和 5.3)；
- 增加了阴性对照品符合率的要求和检验方法(见 4.4.5 和 5.5)；
- 增加了阳性对照品符合率的要求和检验方法(见 4.4.6 和 5.6)；
- 更改了正确度的要求和检验方法(见 4.4.7 和 5.7,2016 年版的 2.6 和 3.5)；
- 更改了精密度的要求和检验方法(见 4.4.8 和 5.8,2016 年版的 2.5 和 3.4)；
- 增加了稳定性的要求和检验方法(见 4.4.9 和 5.9)；
- 增加了样品制备(见 5.1)；
- 更改了标准曲线线性检验方法(见 5.4,2016 年版的 3.2)；
- 更改了使用说明书要求(见第 6 章,2016 年版的第 4 章)。

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/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：无锡市食品安全检验检测中心、江苏省微生物研究所有限责任公司、烟台至公生物医药科技有限公司、深圳市易瑞生物技术股份有限公司、南京金斯瑞生物科技有限公司。

本文件主要起草人：黄丽俊、宓晓黎、李利东、董刘敏、华佳森、付辉、孙震、车团结、冯永巍、薛庆海、王炳志、周小宇、焉丽波、覃喜建、黄永健。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 本文件于 2016 年首次发布；
- 本次为第一次修订。

酶联免疫分析试剂盒通则

1 范围

本文件规定了酶联免疫分析试剂盒的通用要求、使用说明书要求和标签,并描述了相应的检验方法。

本文件适用于酶联免疫分析试剂盒的研究、生产和使用过程中的质量评价及检验方法。

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/T 4889—2008 数据的统计处理 and 解释 正态分布均值和方差的估计与检验

GB/T 44830—2024 酶联免疫试剂盒检测通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 通用要求

4.1 外观

试剂盒外观完整,内装各组分齐全;包被抗原或抗体的固相载体透明干燥,且密封包装;液体组分澄清透明;冻干组分呈疏松体,经复溶后,其溶液澄清,无异物。

4.2 试剂盒主要组成

试剂盒由一整套试剂和材料组成,宜包括:包被固相载体、抗体、标准物质/标准样品/质控品/对照品、酶结合物、底物、洗涤液和终止液等。

4.3 试剂和材料

4.3.1 固相载体:吸附性能、空白值、透明度等应满足试剂盒的性能要求。

4.3.2 抗体:应具有高亲和力和高特异性,满足试剂盒的性能要求。

4.3.3 标准物质/标准样品:经国家认证并授予标准物质/标准样品证书的标准物质/标准样品,或满足溯源要求的商品化标准溶液。

4.3.4 酶结合物:应既有酶的催化活性,且保持了抗体或抗原的免疫活性,酶与抗体或抗原分子比和稳定性应满足试剂盒的性能要求。

4.4 性能

4.4.1 性能指标

试剂盒的性能指标包括检出限、特异性、标准曲线线性、阴性对照品符合率、阳性对照品符合率、正

确度、精密度和稳定性,应根据试剂盒的类型,选择相应性能指标进行检验。

4.4.2 检出限

检出限应符合如下要求之一:

- a) 空白标准偏差法:测定空白样品或阴性质控样品不少于 20 次,检出限不大于浓度平均值加上 3 倍的标准偏差的值;
- b) 逐级稀释法:将阳性对照品进行逐级稀释检测,最低检出限不大于生产企业规定的检出限。

4.4.3 特异性

存在与待测抗原/抗体有结构类似物或功能类似物,应检测交叉反应率。说明书中应明确列出交叉反应物的名称及交叉反应率。

4.4.4 标准曲线线性

以标准溶液考察线性和范围。标准曲线范围应在产品说明书规定的浓度范围内,其拟合线性相关系数的绝对值应大于 0.99。

4.4.5 阴性对照品符合率

对阴性对照品/样品进行检测,其阴性对照品符合率应不小于 95%。

4.4.6 阳性对照品符合率

对阳性对照品/样品进行检测,其阳性对照品符合率应为 100%。

4.4.7 正确度

正确度应符合如下要求之一:

- a) 与参比方法的比较:采用 F 检验和 T 检验比对,配对 T 检验两组数据的平均值不存在显著性差异;
- b) 与有证(基体)标准物质的比较:不同浓度水平相对偏差符合表 1 的要求;有证基体标准物质检测值在证书的特性值范围内;
- c) 与添加样品的比较:不同浓度水平回收率符合表 1 的要求。

表 1 不同浓度水平对方法正确度要求

质量浓度(ρ)	相对偏差 ^a	回收率范围 ^b
$\rho \leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	-50% ~ +20%	50% ~ 120%
$1 \mu\text{g}/\text{kg} < \rho \leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	-40% ~ +20%	60% ~ 120%
$10 \mu\text{g}/\text{kg} < \rho \leq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$	-30% ~ +20%	70% ~ 120%
$100 \mu\text{g}/\text{kg} < \rho \leq 1000 \text{mg}/\text{kg}$	-20% ~ +10%	80% ~ 110%
$\rho > 1 \text{g}/\text{kg}$	-10% ~ +5%	90% ~ 105%

^a 适用于采用有证标准物质验证方法的正确度。
^b 适用于使用标准添加样品的正确度。

4.4.8 精密度

4.4.8.1 批内变异系数

用同一批次的试剂盒检测三个浓度/水平的参考品/样品至少各 6 次,批内变异系数应不大于 10%。

4.4.8.2 批间变异系数

用三批次试剂盒检测三个浓度/水平的参考品/样品至少各 6 次,批间变异系数应不大于 15%。

4.4.9 稳定性

在规定的储存与运输条件下,试剂盒在有效期内各项指标应符合 4.4.2~4.4.8 的相关要求。必要时做加速稳定性试验。

5 检验方法

5.1 样品制备

阴性样品和阳性样品的制备参照 GB/T 44830—2024 的 5.1。

三浓度水平阳性质控样品制备:一般是在方法测定范围内的最低浓度、中间浓度(关注浓度)和最高浓度进行三个水平试验;对于已制定最高残留限量的,关注浓度为最高残留限量;对于未制定最高残留限量的,关注浓度为常见限量指标。对于禁用物质的,关注浓度为方法检出限浓度水平的 2 倍。

定性用三浓度/水平质控样品制备:一般用阴性、弱阳性和阳性进行三个水平试验,阴性及弱阳性质控样品为临界值两侧 C_5 、 C_{95} 附近浓度/水平,阳性的质控样品为方法检出限的 2 倍浓度水平。

5.2 检出限

5.2.1 空白标准偏差法

按 GB/T 44830—2024 中 5.5.1 的规定计算定性检出限。

5.2.2 逐级稀释法

用阳性对照品进行逐级稀释,并进行测定,当目标分析物刚好能检出的浓度即为估算检出限。选取空白样品基质至少 20 个平行样,分别添加估算检出限浓度的目标分析物,计算检出概率不低于 95% 时样品中所含目标分析物的含量水平。

5.3 特异性

根据试剂盒类型选择交叉反应率的验证方法,测定交叉反应率。

方法一:将目标分析物的结构类似物或功能类似物加入样品中,其浓度可以是检出限 10 倍、100 倍或更高,采用试剂盒测定其含量,按公式(1)计算交叉反应率。

$$CR = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

CR —— 交叉反应率;

C_1 —— 添加样品的测量均值;

C_2 —— 对照样品的测量均值;

C_3 ——干扰物浓度。

方法二:测定目标分析物与结构类似物或功能类似物的半数抑制浓度比值,按 GB/T 44830—2024 中 5.5.4 的规定检验。适用于竞争法试剂盒。

5.4 标准曲线线性

按 GB/T 44830—2024 中 5.4.1 的规定检验。

5.5 阴性对照品符合率

对 50 份阴性对照品/样品进行检测,按公式(2)计算阴性对照品符合率。

$$X = \frac{a}{b} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——阴性对照品符合率;

a ——结果为阴性的对照品数量;

b ——总阴性对照品数量。

5.6 阳性对照品符合率

对检出限 1 倍浓度水平的 50 份阳性对照品/样品进行检测,按公式(3)计算阳性对照品符合率。

$$X = \frac{c}{d} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X ——阳性对照品符合率;

c ——结果为阳性的对照品数量;

d ——总阳性对照品数量。



5.7 正确度

5.7.1 与参比方法的比较

按 GB/T 48830—2024 中的 5.5.3.1 及 GB/T 4889—2008 的规定检验。

5.7.2 与有证(基体)标准物质的比较

5.7.2.1 用有证标准物质时

配制三浓度/水平质控样品,每个样品至少进行 6 次平行独立测定,按公式(4)计算相对偏差。

$$B = \frac{M - T}{T} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

B ——相对偏差;

M ——测定均值;

T ——标定值。

5.7.2.2 用有证基体标准物质时

按照 GB/T 44830—2024 中 5.5.3.2 的规定,进行至少 6 次平行测试。

5.7.3 与添加样品的比较

按 GB/T 44830—2024 中 5.5.3.3 的规定检验。

5.8 精密度

批内精密度和批间精密度按 GB/T 44830—2024 中 5.5.2 的规定检验。

5.9 稳定性

5.9.1 效期稳定性试验

宜取不少于三批次试剂盒试验,在规定的储存条件下保存至有效期末,间隔一定的时间,按 5.2~5.8 检测各项指标。

5.9.2 加速稳定性试验

宜取不少于三批次试剂盒试验,在规定的热稳定性条件和保存期,间隔一定的时间,按 5.2~5.8 检测各项指标。

6 使用说明书要求

试剂盒应附产品使用说明书,或等等的指导性文件。文件内容应至少包括以下部分:

- a) 产品名称;
- b) 测定原理;
- c) 适用范围:提及检测的目标物和适用的基质范围;
- d) 使用单位需自备的设备和试剂;
- e) 主要组成;
- f) 操作指南:包括样品前处理的方法、检测方法、结果判定等;
- g) 分析质量参数:检出限、特异性、标准曲线线性、阴性/阳性对照品符合率、正确度、精密度等;
- h) 保存条件和有效期;
- i) 注意事项:如涉及化学和生物安全问题应警告,包括关于安全使用的特殊要求或特殊情况的处理预案等。

7 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。
