

WS/T 223—2002

前 言

乙型病毒性肝炎(简称乙肝)是由乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)引起的传染性疾病,在我国人群中感染率较高,是严重危害人民身体健康的常见传染病之一。对乙肝的诊断主要以实验室检测乙肝表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg)为主,检测方法主要有酶免疫法、反向间接血凝法、放免法、化学发光法、免疫荧光法等,目前应用较广、较普及的是酶免疫法。

本标准所使用的缩略语为 HBV、HBsAg。

本标准从 2002 年 7 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准由北京大学医学部人民医院肝病研究所负责起草。

本标准主要起草人:陶其敏、全文斌。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

乙型肝炎表面抗原酶免疫
检验方法

WS/T 223—2002

Guidelines for enzyme immuno-assay of
hepatitis B surface antigen

1 范围

本标准规定了血清 HBsAg 酶免疫检验方法(两步法)中相关的技术要求。

本标准适用于各基础、临床实验室和流行病学研究中血清 HBsAg 测定。

2 方法选择

2.1 常用方法

HBsAg 的酶免疫检验方法根据反应模式可分为“一步法”和“两步法”两种方法。“一步法”是将待测样品和酶标记抗体同时加入到反应孔中进行反应,从而达到快速的目的;“两步法”则是先将样品加入到反应孔中,待反应结束后再加入酶标记抗体,从而使待测样品的“捕获反应”和酶标记抗体的“酶联反应”分开进行,因而反应更加稳定、重复性也更好。

2.2 推荐方法

由于“一步法”存在产生“前带现象”的可能,故在本标准中不列为推荐方法;本标准推荐使用酶免疫“两步法”。

2.3 方法原理

本标准推荐使用酶免疫“两步法”检测 HBsAg:将抗-HBs 的单克隆抗体(简称单抗)或多克隆抗体(简称多抗)包被于聚苯乙烯微孔板等固相载体上,加入待测血清,如其中含有 HBsAg,则可与固相上的包被抗体结合;洗板去除不参加反应的无关蛋白成分后,加入酶(如辣根过氧化物酶)标记的第二株抗体使之与血清中 HBsAg 反应,在固相载体上形成包被抗体-血清中 HBsAg-酶标记抗体的复合物(即双抗体夹心);再加入底物后,酶催化底物,产生显色反应,根据显色反应颜色的深浅可判定血清样品中 HBsAg 的有无及相对含量。

3 试剂和材料

国内目前已有成套的试剂盒供应。

显色反应底物液可选用邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD)-过氧化氢(H_2O_2)溶液(简称 OPD)或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)- H_2O_2 溶液(简称 TMB)。使用 OPD 时,可选用 2 mol/L 的硫酸(H_2SO_4)作为终止液,比色时选用 492 nm 作为测定波长;使用 TMB 时,可选用 2 mol/L 的盐酸或 2 mol/L 的硫酸溶液作为终止液,比色时选用 450 nm 作为测定波长。

注:国内市场目前亦有 HBsAg 检测的快速酶免疫试剂盒供应,该试剂盒系加有标本加速剂和酶标记抗体加速剂,可达到快速反应的目的,具体操作方法详见各生产厂家的试剂盒说明书。

WS/T 223—2002

4 仪器和设备

包括酶标仪、移液系统(移液器及移液器头)和恒温设备(水浴箱)等。所选用的仪器设备应满足以下要求:

- a) 酶标仪在 450 nm 和 492 nm 的波长不精密度应 $\leq 1\%$,分别在 449 nm~451 nm 和 491 nm~493 nm 之间,吸光度(A 值)要求可以测到小数点后两位;
- b) 移液系统在 100 μL 和 50 μL 的移液不精密度应 $\leq 1\%$,分别在 99 μL ~101 μL 和 49.5 μL ~50.5 μL 之间;
- c) 恒温系统在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、43 $^{\circ}\text{C}$ 的温度变异应 $\leq \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

5 样品

5.1 血液样品的采取

取受试者的前臂静脉血。止血带的使用时间应不超过 1 min,同时避免溶血。

5.2 血液样品的处理、贮存和测定前准备

血液样品采取后室温下静置 30 min~45 min 使其凝血,避免溶血,2 000 r/min 离心 5 min 后立刻吸出血清置密封的试管中贮存。

分离出的血清标本可于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 1 周,如需贮存更长时间,则应保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下,用时提前取出融化并使其温度升至室温,充分混匀后测定。保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 的标本应避免反复冻融,否则可能会影响测定结果的准确性。

注: HBsAg 的检测亦可用血浆类标本,其抗凝剂可选用枸橼酸钠(106 mmol/L 的水溶液与血液按 1:9 比例使用)、乙二胺四乙酸二钠(15 g/L 的水溶液与血液按 1:9 比例使用)、肝素(100 u/mg~125 u/mg 的肝素钠粉剂配成 1 g/L 的水溶液与血液按 1:9 比例使用)等。

6 测定步骤

6.1 测定前准备

将贮存的成套试剂盒及待测血清样品取出,使其温度升至室温后混匀使用。

准备或开启仪器设备。

6.2 测定操作

- a) 已包被好的微孔反应板中每孔加入待测血清 100 μL ,每次实验均应设阴性、阳性对照及空白孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴或恒温箱保温 2 h 或 43 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h;
- b) 洗板 3~5 次,每次均将各孔中注满洗液,静置 20 s 以上,倾去液体,拍干;
- c) 每孔中加入酶标记的抗体 100 μL ,保温同前,洗板 3~5 次,同前;
- d) 每孔加入显色底物液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15 min~20 min 后加入终止液 50 μL ;
- e) 酶标仪测定结果。

7 测定结果的表述和有效性判断

7.1 测定结果的表述

加入终止液后,用空白孔校零,再读取各孔的 A 值,凡标本的 A 值/阴性对照均值 ≥ 2.1 者判定为 HBsAg 阳性,反之为阴性。

7.2 测定结果的有效性判断

阴性对照及阳性对照孔所测 A 值应在试剂盒的要求范围内,否则应分析原因后重新测定。

注

- 1 所得结果应表示至小数点后 2 位;

WS/T 223—2002

- 2 阴性对照均值为阴性对照各孔所测定 A 值的均值,其 CV 值应 $<15\%$;
- 3 阴性对照均值 ≤ 0.05 时按 0.05 计算, >0.05 时按实测值计算。

8 灵敏度、精密度和特异性

8.1 灵敏度

本方法的灵敏度一般应 ≥ 1 ng/mL,应可检测出 adr、adw、ayw 三种亚型的 HBsAg。

8.2 精密度

应用本方法对同一份样品进行检测(>10 孔),批内 CV 值应 $<15\%$ 。

8.3 特异性

血清样品中的抗坏血酸、血红蛋白等物质可能为本方法的干扰物质,生理水平的上述物质应不明显影响测定结果,某些试剂的配方设计和测定方式应可不同程度地减少上述物质的干扰。

9 安全注意事项

血清样品和来源于血液的质控物质都可能含有致病微生物,应视为有传染性的物质,必须按传染病实验室检查规程进行操作,避免吞入口中或与皮肤接触。
