

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510098412.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 21 日

[11] 公开号 CN 1916634A

[22] 申请日 2005.9.6

[21] 申请号 200510098412.4

[71] 申请人 珠海丽珠试剂有限公司

地址 519020 广东省珠海市拱北桂花北路

[72] 发明人 储迅涛 宋小冬 张久春

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

新型乙型肝炎病毒表面抗原确认试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及联合应用抗乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的特异性抗体 (抗-HBs 抗体) 和 HBsAg 免疫检测试剂对 HBsAg 免疫检测结果为有反应性的样本进行确认的检测方法及相关的检测试剂盒, 以确定有反应性的样本是否为阳性, 即真正含有 HBsAg。本发明还涉及 HBsAg 酶免疫检测结果在“灰区”范围内的样本的确认检测方法及相关检测试剂盒。

1. 一种确认 HBsAg 为阳性的免疫检测方法，包括：
提供 HBsAg 免疫测定结果为有反应性的样本；
向所述样本中加入特异性抗-HBs 抗体；
另外向所述样本中加入不含特异性抗-HBs 抗体的对照试剂作为对照；
对所述加入特异性抗-HBs 抗体的样本及不加入特异性抗-HBs 抗体的对照分别进行 HBsAg 免疫检测；及
将加入所述特异性抗-HBs 抗体的样本检测结果与不加入所述特异性抗-HBs 抗体的对照检测结果进行比较，
其中加入所述特异性抗-HBs 抗体的样本检测结果比对照的免疫检测结果下降至少 30%，提示所述样本为 HBsAg 阳性。
2. 如权利要求 1 所述方法，其中所述免疫检测是 HBsAg 酶免疫检测，所述检测结果为吸光度值。
3. 如权利要求 1 或 2 所述方法，其中所述下降至少为 50%。
4. 如权利要求 1-3 任一权利要求所述的方法，还包括在免疫检测前将所述样本用溶剂进行稀释的步骤。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述稀释的比例为 1:50，1:100，1:1000，1:10000，或在此范围内的稀释度。
6. 如权利要求 1-3 任一权利要求所述的方法，其中所述有反应性也包括 HBsAg 酶免疫检测的结果在“灰区”范围的情况。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述的“灰区”的下限为 Cutoff 值 $\times 0.7$ ，“灰区”的上限为 Cutoff 值 $\times 2$ 。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的方法, 还包括选自以下的能够使检测结果的吸光度值提高至高于“灰区”的上限的步骤: 1) 延长所述样本与所述特异性抗体的反应时间至 30 分钟~2 小时; 2) 提高所述样本与所述特异性抗体的反应温度至 35°C~42°C; 3) 对所述样本与所述特异性抗体(抗-HBs)反应后进行洗涤, 然后再加入所述酶标记抗体; 4) 延长加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应时间至 30 分钟~4 小时; 5) 提高加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应温度至 35°C~42°C; 6) 延长所述酶标记抗体与底物的反应时间至 30 分钟~1 小时; 以及 7) 加大所述样本的加入量至 50 μ l ~500 μ l。

9. 如权利要求 1-8 中任一权利要求所述的方法, 其中所述的特异性抗-HBs 抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述的抗体为来源于人、小鼠、大鼠、豚鼠、马、兔、羊的抗体。

11. 如权利要求 10 所述的方法, 其中所述的抗体与 HBsAg 酶免疫检测步骤中所用的抗体为相同或不相同来源。

12. 一种 HBsAg 确认试剂盒, 用于对 HBsAg 酶免疫检测结果为有反应性的样本进行 HBsAg 的确认, 该试剂盒包括:

特异性抗-HBs 抗体试剂; 及

说明权利要求 1 或 2 所述的方法的操作步骤与检测结果的说明书。

13. 如权利要求 12 所述的 HBsAg 确认试剂盒, 还含有 HBsAg 酶免疫检测试剂盒试剂。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的试剂盒, 其中所述检测样本的检测结果比对照样本的检测结果下降至少为 50%时, 所述样本为 HBsAg 阳性。

15. 如权利要求 12-14 任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述说明书

进一步包括在免疫检测前将所述样本用溶剂进行稀释的步骤并将稀释样本进行同样的检测的说明。

16. 如权利要求 15 所述的试剂盒, 其中所述稀释比例选自 1:50, 1:100, 1:1000, 1:10000, 或在此范围内的稀释度。

17. 如权利要求 12-14 任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述有反应性包括 HBsAg 酶免疫检测的结果在“灰区”范围的情况。

18. 如权利要求 17 所述的试剂盒, 其中所述“灰区”的下限为 Cutoff 值 $\times 0.7$, 所述“灰区”的上限为 Cutoff 值 $\times 2$ 。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的试剂盒, 其中所述试剂盒的说明书还包括选自以下的能够使检测结果的吸光度值提高至高于“灰区”的上限的步骤: 1) 延长所述样本与所述特异性抗体的反应时间至 30 分钟~2 小时; 2) 提高所述样本与所述特异性抗体的反应温度至 35°C~42°C; 3) 对所述样本与所述特异性抗体(抗-HBs)反应后进行洗涤, 然后再加入所述酶标记抗体; 4) 延长加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应时间至 30 分钟~4 小时; 5) 提高加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应温度至 35°C~42°C; 6) 延长所述酶标记抗体与底物的反应时间至 30 分钟~1 小时; 以及 7) 加大所述样本的加入量至 50 μ l~500 μ l。

20. 如权利要求 12-19 中任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述的特异性抗-HBs 抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒, 其中所述的抗体为来源于人、小鼠、大鼠、豚鼠、马、兔、羊的抗体。

22. 如权利要求 21 所述的试剂盒, 其中所述的抗体与 HBsAg 酶免疫检测步骤中的抗体为相同或不同来源。

新型乙型肝炎病毒表面抗原确认试剂盒

发明领域

本发明涉及乙型肝炎病毒表面抗原(Hepatitis Virus B Surface Antigen, 简称 HBsAg)免疫检测方法 with 试剂盒, 特别涉及 HBsAg 酶免疫检测呈“阳性”(有反应性)或在“灰区”范围内的样本检测结果得到确认的检测方法与试剂盒。

背景技术

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, 简称 HBV)是乙型肝炎的病原体。HBsAg 是 HBV 的重要血清学标志。在血清(或其他体液)中存在 HBsAg 表明受检者感染 HBV。HBsAg 实验室检测方法主要为免疫测定, 常用的是放射免疫法(RIA)和酶免疫检测(EIA), 目前尤以酶免疫检测使用最为广泛。

HBsAg 酶免疫检测的基本原理和操作步骤如下(参见图 1): 在聚苯乙烯微板的反应孔内包被针对 HBsAg 的特异性抗体(抗-HBs), 在反应孔中加入待测样本, 保温反应、洗涤后加入酶标记的抗-HBs, 如果样本中含有 HBsAg, 则在反应孔上通过桥接, 形成抗-HBs—HBsAg—抗-HBs·酶复合物, 再通过酶催化底物进行显色反应。样本的吸光度值大于 Cutoff 值(临界值)为阳性(有反应性), 小于 Cutoff 值为阴性。

在以上经典的两步法酶免疫检测中有两个特异性的抗原抗体反应, 第一个是样本中的 HBsAg 与反应孔上包被的抗-HBs 反应, 洗涤去除样本中未结合到反应孔上的物质, 再加入酶标记抗-HBs 进行第二个反应, 即反应孔上的 HBsAg 与酶标记抗-HBs 的反应。

由于抗原抗体反应和酶与底物反应的强度与反应的时间和温度在一定范围内成正比, 因此酶免疫检测的敏感性与测定中反应的温度和时间有直接关系。

为了简化检测步骤和缩短检测时间, 国产的 HBsAg 酶免疫检测试剂

多采用一步快速法,即将样本和酶标记抗-HBs同时加入,两次抗原抗体反应合并为一次,如图2。

这种一步快速法总体上讲也能满足临床需要,但由于缺乏了两步法中第一步反应后的洗涤,样本中如有非特异性干扰物存在,测定中可能促发假阳性反应。另外,为了缩短反应时间,快速法试剂成份的改变也增加了非特异性反应出现的可能性。

在HBsAg的酶免疫检测中,很多原因可导致假阳性反应。例如样本中可能存在非特异性的干扰物质。此外,如果HBsAg酶免疫检测试剂的包被抗体和酶标记抗体都使用了鼠源性单克隆抗体,则部分人群体内含有的人抗鼠抗体(HAMA)会桥接包被抗体和酶标记抗体,也能造成假阳性反应。由于HBsAg阳性可作为HBV感染的一种依据,国外对于HBsAg酶免疫检测呈阳性的样本称为有反应性,一般都要进行确认,排除假阳性反应后才能报告HBsAg阳性。

国外HBsAg酶免疫检测试剂的实际敏感度一般显著高于其标示的敏感度,加之国外试剂的精密度较好(Cutoff值附近的变异系数小于10%),因此低于Cutoff值的样本即可判为HBsAg阴性,而高于或等于Cutoff值的样本则须进行确认以排除假阳性。

国产HBsAg酶免疫检测试剂由于采用了短反应时间的一步法,更增加了出现非特异性反应的可能。国产HBsAg酶免疫检测试剂的实际敏感度一般与其标示的敏感度相接近,精密度也略差(出厂时要求变异系数小于15%,临床测定中的变异系数可能更高),因此测定数值在Cutoff值上下一定范围内的样本就无法确定其是有反应性还是无反应性,而出现所谓的“灰区”问题。为此,样本检测结果如在此“灰区”范围内,HBsAg的确认试验不仅要确认属于“有反应性”的样本是否为HBsAg阳性,也要排除实际属于“无反应性”的HBsAg阴性样本。因此与国外的试剂盒比较,对国产HBsAg酶免疫检测试剂盒有反应性的(即所谓的“阳性”)检测结果的确认更加复杂并十分必要。

因此为进一步确认HBsAg酶免疫检测的有反应性的结果,排除目前该检测方法中存在的假阳性,本发明旨在建立一种HBsAg的确认方法并生产开发出相应的确认试剂,对HBsAg酶免疫检测结果呈有反应性(阳性)

或在“灰区”范围内的样本进行确认，从而克服目前不能对国产 HBsAg 酶免疫检测试剂有反应性的样本进行确认的缺陷。

发明内容

本发明通过使用特异性抗体(抗-HBs)中和检测样本中的 HBsAg，再进行 HBsAg 免疫检测，以达到对 HBsAg 免疫检测有反应性的样本进行确认的目的。

本发明的第一方面涉及一种确认 HBsAg 有反应性的检测样本为 HBsAg 阳性的免疫检测方法，包括：

向所述样本中加入特异性抗-HBs 抗体；

另外向所述样本中加入不含特异性抗-HBs 抗体的对照试剂作为对照；

对所述加入特异性抗-HBs 抗体的样本及不加入特异性抗-HBs 抗体的对照分别进行 HBsAg 免疫检测；及

将加入所述特异性抗-HBs 抗体的样本检测结果与不加入所述特异性抗-HBs 抗体的对照检测结果进行比较，

其中加入所述特异性抗-HBs 抗体的样本检测结果比对照的免疫检测结果有至少 30%的下降，优选下降至少为 50%，提示所述样本为 HBsAg 阳性。

优选地，本发明所述免疫检测是 HBsAg 酶免疫检测，所述检测结果为吸光度值。

优选地，本发明所述抗-HBs 试剂的浓度可选范围为 500 IU/L 至 5000 IU/L。

在本发明的一个实施方案中，本发明所述方法进一步包括在免疫检测前将所述样本用溶剂进行稀释的步骤。优选所述稀释的比例为 1:50，1:100，1:1000，1:10000，或在此范围内的稀释度。

在本发明的另一实施方案中，所述有反应性为 HBsAg 酶免疫检测结果在“灰区”范围。

在本发明的一个实施方案中，当所述有反应性为 HBsAg 酶免疫检测结果在“灰区”范围时，优选将所述检测结果的吸光度值提高至高于“灰

区”的上限，其包括选自以下的步骤：1)延长所述样本与所述特异性抗体的反应时间至30分钟~2小时；2)提高所述样本与所述特异性抗体的反应温度至35°C~42°C；3)对所述样本与所述特异性抗体反应后进行洗涤，然后再加入所述酶标记抗体；4)延长加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应时间至30分钟~4小时；5)提高加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应温度至35°C~42°C；6)延长所述酶标记抗体与底物的反应时间至30分钟~1小时；以及7)加大所述样本的加入量至50 μ l~500 μ l。

本发明的第二方面涉及一种对HBsAg酶免疫检测结果为有反应性的样本进行HBsAg确认的试剂盒，该试剂盒包括：

特异性抗-HBs抗体试剂；及

说明本发明所述对有反应性的样本进行HBsAg确认的操作步骤与检测结果的说明书。

本发明试剂盒待确认样本的有反应性是指HBsAg酶免疫检测结果在“灰区”范围或高于“灰区”范围。

在一个实施方案中，当所述待确认样本的有反应性在“灰区”范围时，试剂盒的说明书还包括说明能够使检测结果的吸光度提高至高于“灰区”的上限的选自以下的步骤：1)延长所述样本与所述特异性抗体的反应时间至30分钟~2小时；2)提高所述样本与所述特异性抗体的反应温度至35°C~42°C；3)对所述样本与所述特异性抗体反应后进行洗涤，然后再加入所述酶标记抗体；4)延长加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应时间至30分钟~4小时；5)提高加入所述酶标记抗体后的抗原抗体反应温度至35°C~42°C；6)延长所述酶标记抗体与底物的反应时间至30分钟~1小时；以及7)加大所述样本的加入量至50 μ l~500 μ l。

附图的简要说明

图1所示为两步法EIA测定HBsAg的示意图。

图2所示为一步快速法EIA测定HBsAg的示意图。

具体实施方式

本发明是在HBsAg免疫检测试剂盒尤其是在HBsAg酶免疫检测试

剂盒与检测方法的基础上开发出的新产品与新方法。目的是使 HBsAg 免疫检测结果,尤其是 HBsAg 酶免疫检测试剂盒检测结果呈有反应性(所谓“阳性”)或在“灰区”范围内的样本得到 HBsAg 确认。

本发明中,所述检测结果在 HBsAg 酶免疫检测中以吸光度值(A 值)表示,吸光度值大于 Cutoff 值(临界值)为有反应性(即所谓的“阳性”),小于 Cutoff 值为阴性。

本发明中,所述的 HBsAg 酶免疫检测检测方法包括两步法、一步法及快速一步法,优选快速一步法。

本发明所述的“灰区”,为本领域所述技术人员公认的可疑阳性和可疑阴性区间,这一区间根据 HBsAg 酶免疫检测的不精密度(变异系数)等的不同而变。例如在某一特定条件下将“灰区”定义为对 HBsAg 测得的吸光度值介于 Cutoff 值 $\times 0.7$ 至 Cutoff 值 $\times 2$ 之间,即“灰区”。根据国家或各地方相关规定,更大或更小的“灰区”也在本发明的范围之内。

本发明试剂盒含有或方法中使用抗-HBs 的特异性抗体试剂,可选择地,所述抗-HBs 可是单克隆或多克隆抗体,该抗体可以是人源或动物源抗体,例如人源抗-HBs、大鼠抗-HBs、小鼠抗-HBs、兔抗-HBs、山羊抗-HBs、绵羊抗-HBs、马抗-HBs、猴抗-HBs 等,本发明优选使用多克隆抗体。

本发明的抗-HBs 的特异性抗体试剂在进行检测时,可选择地与利用抗体检测 HBsAg 的试剂联合使用,例如 HBsAg 酶免疫检测试剂盒(以下简称 HBsAg EIA Kit)。因此优选地本发明的试剂盒或方法是联合 HBsAg EIA Kit 或方法使呈 HBsAg 有反应性或在“灰区”范围内的血清或血浆样本得到确认检测,即证明其是 HBsAg 阳性。

本发明的试剂盒还涉及联合使用 HBsAg EIA Kit 的方法,包括两步法、一步法及快速一步法的 HBsAg EIA Kit 方法均可以用于本发明所述试剂盒的操作程序中。

在本发明的优选实施方案中,可在 HBsAg EIA Kit(以丽珠 HBsAg ELISA 试剂盒为例)的微孔板上加入所述样本后,向其中分别加入不含抗-HBs 的对照试剂或含抗-HBs 的特异性抗体试剂与样本进行反应,加入不含抗-HBs 与含抗-HBs 的微孔分别设为对照孔和检测孔;也可向所述样本

中加入不含抗-HBs 的对照试剂和含抗-HBs 的特异性抗体试剂与样本进行反应后,再分别加入到所述 HBsAg EIA Kit(以丽珠 HBsAg ELISA 试剂盒为例)的微孔板中(分别设为对照孔和检测孔)。检测孔中的特异性抗体与微孔反应板上的固相抗体竞争样本中的 HBsAg,从而使结合到微孔反应板上的 HBsAg 量减少;而对照孔中不存在竞争,因此样本中的 HBsAg 能正常地结合到微孔反应板上。随后按一般酶免疫检测,加入酶标记抗-HBs 反应后加底物液显色,用酶标仪测得吸光度值(A 值)。如样本中有 HBsAg 存在,则检测孔的 A 值会明显低于对照孔,若检测孔中和后的抑制率较高,例如至少为 30%,优选至少为 50%,则样本中的 HBsAg 存在得到确认,即该有反应性的检测结果成为阳性检测结果。

在本发明的优选实施方案中,通常采用一般操作程序,该操作程序特别适合当有反应性的样本检测 A 值 $> \text{Cutoff 值} \times 2$ (超过“灰区”上限)时的 HBsAg 检测;当 A 值介于 $\text{Cutoff 值} \times 0.7$ 至 $\text{Cutoff 值} \times 2$ 之间时,即检测值可能位于“灰区”,可附加采用“灰区”操作程序(在不同的地区、不同的实验室及使用不同的 HBsAg EIA Kit 时,“灰区”范围可有所不同)。

在本发明的实施方案中,通常按一般操作步骤,其包括:

将向原倍样本和/或稀释样本中加入含本发明特异性抗-HBs (检测孔)或不含该抗体(对照孔)的试剂;

然后对上述加入含有或不含有特异性抗-HBs 试剂的样本进行 HBsAg 酶免疫检测;

比较所述加入含有或不含有特异性抗-HBs 试剂的样本的吸光度值。

如果含有特异性抗-HBs 比不含有特异性抗-HBs 的检测值优选降低 50%(抑制率),可确认为 HBsAg 阳性。本领域所述技术人员应理解,由于加入特异性抗-HBs 的目的是与 HBsAg 酶标抗体竞争结合 HBsAg,因此降低 50%是比较安全的检测值,但是低于此降低值的其它的能够说明有竞争抑制关系的降低值也是本发明的范围,例如至少 30%。

在本发明的一个实施方案中,本发明所述操作程序还包括对阳性参考品进行上述检测的平行分析。例如,在 HBsAg EIA Kit 中检测到的参考阳性对照孔 A 值应较高,优选必须大于 0.50 和小于 1.50,且抑制率必须

大于 50%,优选大于 80%,否则上述实验结果无效。所述阳性参考品选自经确认为 HBsAg 阳性的人血清。

在本发明的实施方案中,可利用稀释生物样本的溶剂对样本进行稀释。不改变样本的检测性质的稀释溶剂是本领域所属技术人员公知的,例如人血清、各种动物血清或动物血清蛋白溶液、PBS、生理盐水等等。所述稀释比例为 1:50、1:100、1:1000、1:10000 的稀释或在此范围内的稀释度。优选 1:100。

在本发明的一个实施方案中,若 1:100 比例的稀释样本的抑制率 < 50%,而其对照孔的检测值较高,例如 A 值 ≥ 2.0 ,则应对该样本进行更大倍数(例如 1000 倍、10000 倍)的稀释,再重复上述一般操作程序。

在本发明的另一实施方案中,若原倍样本的抑制率 < 50%,1:100 倍稀释样本的对照孔检测值较低,例如 A 值 < Cutoff 值 $\times 2$,则应对该样本进行 1:50 倍稀释,再重复一般操作步骤。

本发明的另一实施方案还涉及“灰区”操作程序。如果本发明所述待确认样本 HBsAg 检测结果在“灰区”范围内,且检测值例如 A 值较低时,在加本发明所述特异性抗-HBs 抗体后的 HBsAg 测定中难于用计算抑制率的方法进行确认,那么须改变反应条件,使对照孔的检测值超出“灰区”范围。使对照孔的检测值超出“灰区”范围的方法的特征是:1)延长样本与特异性抗体(抗-HBs)的反应时间(30 分钟~2 小时);2)提高样本与特异性抗体(抗-HBs)的反应温度(35°C~42°C);3)样本与特异性抗体(抗-HBs)反应后进行洗涤,然后再加入酶标记抗体;4)延长加入酶标记抗体后的抗原抗体反应时间(30 分钟~4 小时);5)提高加入酶标记抗体后的抗原抗体反应温度(35°C~42°C);6)延长酶标记抗体与底物的反应时间(30 分钟~1 小时);和 7)加大样本的加入量(50 μ l~500 μ l)。

因此本发明所述的“灰区”操作程序基本与一般操作步骤相同,优选地其与一般操作步骤的不同点为加入酶标记物后温育时间相对延长,例如 120 分钟。

在本发明的实施方案中,检测吸光度值的仪器是本领域所属技术人员公知的,例如酶标仪。

实施例

实施例 1 一般操作程序

A. 操作步骤:

取出确认试剂盒及HBsAg酶免疫检测试剂盒 (丽珠HBsAg EIA Kit), 平衡(15-20 分钟)至室温。

每次试验设空白孔一孔, 空白孔中仅加入对照试剂 100 μ l。

用生理盐水 1:100 稀释样本, 检测时需同时测定原倍样本及稀释样本。

原倍样本需设定对照孔和检测孔各 1 孔, 100 倍稀释样本也需设定对照孔和检测孔各 1 孔(见表 1)。

每次实验设参考阳性 1 份, 同样设置对照孔和检测孔各 1 孔(见表 1)。

在对照孔中加入对照试剂 50 μ l, 检测孔中加入特异性抗体试剂 50 μ l(见表 1)。

将 100 倍稀释样本加入到 1 孔对照孔(孔 1)和 1 孔检测孔(孔 2)中, 每孔 50 μ l; 将原倍样本加入到 1 孔对照孔(孔 3)和 1 孔检测孔(孔 4)中, 每孔 50 μ l(见表 1)。

将阳性参考品(HBsAg 强阳性以及 HIV、HCV, TP 抗体阴性的血清, 经灭活后稀释制得, 含约 5ng/ml HBsAg)加入到参考阳性的对照孔(孔 5)和检测孔中(孔 6), 每孔 50 μ l(见表 1)。

轻拍混匀, 或置于振荡器上混匀(10-15 秒); 置 37°C 温育 30 分钟。

每孔加入酶标记物(HBsAg EIA Kit 组分)50 μ l; 轻拍混匀, 或置于振荡器上混匀(10-15 秒)。

温育, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书(见附件 1)。

洗板, 手洗或采用洗板机洗板, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书。

显色, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书。

终止, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书。

比色, 用空白孔校零, 再读取各孔 A 值。

表 1

孔 号	1	2	3	4	5	6
设 置	100 倍稀释样本 对照孔	100 倍稀释样本 检测孔	原倍样本 对照孔	原倍样本 检测孔	参考阳性 对照孔	参考阳性 检测孔
对照试剂	50 μ l	/	50 μ l	/	50 μ l	/
特异性 抗体试剂	/	50 μ l	/	50 μ l	/	50 μ l
样 本	100 倍稀释样本 50 μ l	100 倍稀释样本 50 μ l	原倍样本 50 μ l	原倍样本 50 μ l	阳性参考 品 50 μ l	阳性参考 品 50 μ l

B. 一般程序的结果计算:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照孔 A 值} - \text{检测孔 A 值}}{\text{对照孔 A 值}} \times 100\%$$

注: 检测孔的 A 值大于对照孔的 A 值时, 抑制率按 0 计算。

C. 一般操作程序的结果判定:

1. 参考阳性对照孔 A 值必须大于 0.50, 且抑制率必须大于 80%, 否则实验结果无效。
2. 若原倍样本对照孔 A 值 < Cutoff 值 $\times$ 2, 则采用原倍样本按“灰区”操作程序进行试验。
3. 若原倍样本或 100 倍稀释样本的抑制率 > 50%, 则可确认为 HBsAg 阳性。
4. 若原倍样本的抑制率 < 50%; 100 倍稀释样本的抑制率 < 50% 且其对照孔的 A 值 < 2.0; 则可确认为 HBsAg 阴性。
5. 若 100 倍稀释样本的抑制率 < 50%, 而其对照孔的 A 值 $\geq$ 2.0, 则应对该样本进行更大倍数(1000 倍、10000 倍)的稀释, 再重复一般确认操作程序。
6. 若原倍样本的抑制率 < 50%, 100 倍稀释样本的对照孔 A 值 < Cutoff 值 $\times$ 2, 则应对该样本进行 1:50 稀释, 再重复一般确认操作程序。50 倍稀释样本的抑制率 $\geq$ 50% 可确认为 HBsAg 阳性, < 50% 可确认为 HBsAg 阴性。

实施例 2 “灰区”操作程序

A. 具体操作如下:

取出确认试剂盒及HBsAg酶免疫检测试剂盒 (丽珠HBsAg EIA Kit), 平衡(15-20 分钟)至室温。

每次试验设空白孔一孔, 空白孔中仅加入对照试剂 100 μ l。

每个样本设定对照孔和检测孔各 1 孔。

每次实验设参考阳性 1 份, 同样设置对照孔和检测孔各 1 孔。

在对照孔中加入对照试剂 50 μ l, 检测孔中加入特异性抗体试剂 50 μ l。

将原倍样本加入到 1 孔对照孔和 1 孔检测孔中, 每孔 50 μ l。

将阳性参考品加入到参考阳性的对照孔和检测孔中, 每孔 50 μ l。

轻拍混匀, 或置于振荡器上混匀(10-15 秒); 置 37°C 温育 30 分钟。

每孔加入酶标记物(HBsAg EIA Kit 组分)50 μ l。

轻拍混匀, 或置于振荡器上混匀(10-15 秒), 置 37°C 温育 120 分钟。

洗板, 手洗或采用洗板机洗板, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书。

显色, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书。

终止, 参照 HBsAg EIA Kit 说明书。

比色, 用空白孔校零, 再读取各孔 A 值。

B. “灰区”操作程序的结果计算:

同一般程序的结果计算。

C. “灰区”操作程序的结果判定:

参考阳性对照孔 A 值必须大于 1.0, 且抑制率必须大于 80%, 否则实验结果无效。

原倍样本的抑制率 > 50%, 且对照孔 A 值 > Cutoff 值 $\times$ 2(本实施例认定的“灰区”上限), 则可确认为 HBsAg 阳性。

原倍样本的抑制率 < 50%, 且对照孔 A 值 > Cutoff 值 $\times$ 2, 则可确认为 HBsAg 阴性。

原倍样本的抑制率 > 50%, 对照孔 A 值 < Cutoff 值 $\times$ 2, 表明该样本仍为可疑阳性。

实施例 3 样本试验一

某份血清样本, 用丽珠 HBsAg EIA Kit 测得的 A 值为 2.493。丽珠 HBsAg EIA Kit 的 Cutoff 值为 0.105, 该样本的 A 值大于 Cutoff 值 $\times 2$, 采用一般确认操作程序。试验中, 参考阳性对照孔 A 值为 0.520(大于 0.5), 检测孔 A 值为 0.022, 按公式计算抑制率为 95.77%(大于 80%), 实验有效; 原倍样本的对照孔 A 值为 2.121, 检测孔 A 值为 0.097, 抑制率为 95.43%; 100 倍稀释样本的对照孔 A 值为 0.034, 检测孔 A 值为 0.005, 抑制率为 85.3%。原倍样本和 100 倍稀释样本经中和试验后的抑制率均大于 50%, 故该份血清样本被确认为 HBsAg 阳性。

实施例 4 样本试验二

某份血清样本, 用丽珠 HBsAg EIA Kit 测得的 A 值为 2.929。该样本的 A 值大于 Cutoff 值 $\times 2$, 采用一般操作程序。试验中, 参考阳性对照孔 A 值为 0.520(大于 0.5), 检测孔 A 值为 0.022, 抑制率为 95.77%(大于 80%), 实验有效; 原倍样本的对照孔 A 值为 2.668, 检测孔 A 值为 2.797, 抑制率为 0; 100 倍稀释样本的对照孔 A 值为 0.880, 检测孔 A 值为 0.038, 抑制率为 95.68%。经中和试验后, 原倍样本的抑制率小于 50%, 但 100 倍稀释样本的抑制率大于 50%, 故该份血清样本被确认为 HBsAg 阳性。

实施例 5 样本试验三

某份血清样本, 用丽珠 HBsAg EIA Kit 测得的 A 值为 3.172。该样本的 A 值大于 Cutoff 值 $\times 2$, 采用一般操作程序。试验中, 参考阳性对照孔 A 值为 0.655(大于 0.5), 检测孔 A 值为 0.031, 抑制率为 95.27%(大于 80%), 实验有效; 原倍样本的对照孔 A 值为 3.017, 检测孔 A 值为 2.998, 抑制率为 0.63%; 1:100 倍稀释样本的对照孔 A 值为 2.860, 检测孔 A 值为 1.870, 抑制率为 34.62%, 可基本确认为 HBsAg 阳性。但原倍样本和 100 倍稀释样本经中和试验后的抑制率均小于 50%, 且 100 倍稀释样本对照孔的 A 值大于 2.0, 故对该份样本再进行 1:1000 稀释后重复进行操作。1000 倍稀释样本的对照孔 A 值为 2.399, 检测孔 A 值为 0.091, 抑制率为 96.21%,

大于 50%，故该份血清样本被确认为 HBsAg 阳性。

实施例 6 样本试验四

某份血浆样本，用丽珠 HBsAg EIA Kit 测得的 A 值为 0.576。该样本的 A 值大于 Cutoff 值 $\times 2$ ，采用一般操作程序。试验中，参考阳性对照孔 A 值为 0.655(大于 0.5)，检测孔 A 值为 0.031，抑制率为 95.27%(大于 80%)，实验有效；原倍样本的对照孔 A 值为 0.567，检测孔 A 值为 1.062，抑制率为 0；100 倍稀释样本的对照孔 A 值为 0.389，检测孔 A 值为 0.535，抑制率为 0。原倍样本和 100 倍稀释样本的抑制率均小于 50%，且 100 倍稀释样本对照孔的 A 值 < 2.0 ，故该份血浆样本被确认为 HBsAg 阴性(假阳性)。

实施例 7 样本试验五

某份血清样本，用丽珠 HBsAg EIA Kit 测得的 A 值为 0.174。丽珠 HBsAg EIA Kit 的 Cutoff 值为 0.105，该样本的 A 值小于 Cutoff 值 $\times 2$ ，但大于 Cutoff 值 $\times 0.7$ ，采用“灰区”操作程序。试验中，参考阳性对照孔 A 值为 1.172(大于 1.0)，检测孔 A 值为 0.062，抑制率为 94.71%(大于 80%)，实验有效；样本的对照孔 A 值为 0.753，超过了 Cutoff 值 $\times 2$ 的“灰区”上限，检测孔 A 值为 0.021，抑制率为 97.21%，大于 50%，故该份血清样本被确认为 HBsAg 阳性。

实施例 8 样本试验六

某份血清样本，用丽珠 HBsAg EIA Kit 测得的 A 值为 0.107。丽珠 HBsAg EIA Kit 的 Cutoff 值为 0.105，该样本的 A 值小于 Cutoff 值 $\times 2$ ，但大于 Cutoff 值 $\times 0.7$ ，采用“灰区”操作程序。试验中，参考阳性对照孔 A 值为 1.172(大于 1.0)，检测孔 A 值为 0.062，抑制率为 94.71%(大于 80%)，实验有效；样本的对照孔 A 值为 0.196，超过了 Cutoff 值，但未超过 Cutoff 值 $\times 2$ 的“灰区”上限，故该份血清样本为可疑阳性。

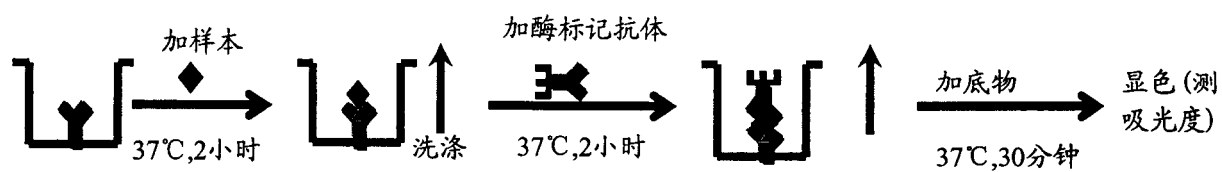


图1 两步法EIA测定HBsAg

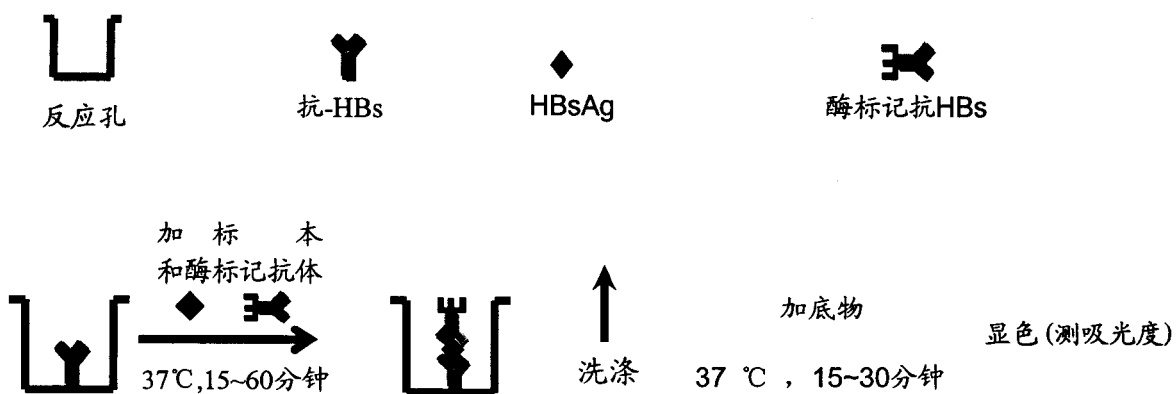


图2 一步快速法EIA测定HBsAg

专利名称(译)	新型乙型肝炎病毒表面抗原确认试剂盒		
公开(公告)号	CN1916634A	公开(公告)日	2007-02-21
申请号	CN200510098412.4	申请日	2005-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	珠海丽珠试剂股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	珠海丽珠试剂有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	珠海丽珠试剂有限公司		
[标]发明人	储迅涛 宋小冬 张久春		
发明人	储迅涛 宋小冬 张久春		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/53 G01N21/31		
代理人(译)	韩克飞		
其他公开文献	CN100520409C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及联合应用抗乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的特异性抗体(抗-HBs抗体)和HBsAg免疫检测试剂对HBsAg免疫检测结果为有反应性的样本进行确认的检测方法及相关的检测试剂盒,以确定有反应性的样本是否为阳性,即真正含有HBsAg。本发明还涉及HBsAg酶免疫检测结果在“灰区”范围内的样本的确认检测方法及相关检测试剂盒。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照孔A值} - \text{检测孔A值}}{\text{对照孔A值}} \times 100\%$$