内蒙古自治区地方计量技术规范

JJF（蒙）067—2024

快速核酸检测仪校准规范

Calibration Specification for Rapid Nucleic Acid Detectors

2024-03-01发布　　2024-06-01实施

内蒙古自治区市场监督管理局 发布

快速核酸检测仪校准规范

Calibration Specification for Rapid Nucleic Acid Detectors

JJF(蒙)067—2024

归　口　单　位：内蒙古自治区市场监督管理局

主要起草单位：内蒙古自治区计量测试研究院

满洲里市检验检测中心

内蒙古自治区人民医院

参加起草单位：赤峰市产品质量检验检测中心

本规范委托内蒙古自治区计量测试研究院负责解释

本规范主要起草人：

许春彬（内蒙古自治区计量测试研究院）

王　辉（满洲里市检验检测中心）

张晓燕（内蒙古自治区人民医院　）

朴维英（内蒙古自治区人民医院　）

梁先红（内蒙古自治区计量测试研究院）

参加起草人：

李　明（满洲里市检验检测中心）

杨　涛（内蒙古自治区人民医院　）

刘大伟（赤峰市产品质量检验检测中心）

目　录

引言……（Ⅱ）
1 范围……（1）
2 引用文件……（1）
3 术语……（1）
4 概述……（2）
5 计量特性……（2）
6 校准条件……（2）
6.1 环境条件……（3）
6.2 测量标准及其他设备……（3）
7 校准项目和校准方法……（3）
7.1 校准项目……（3）
7.2 温度校准……（4）
7.3 样本检测重复性……（8）
8 校准结果表达……（9）
8.1 校准记录……（9）
8.2 校准结果的处理……（9）
9 复校时间间隔……（9）
附录 A 校准结果记录参考格式……（11）
附录 B 校准证书内页参考格式……（14）
附录 C 快速核酸检测仪温度偏差的测量不确定度评定示例……（15）

引　言

JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》、JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》共同构成支撑本规范制定工作的基础性系列规范。

本规范为内蒙古自治区首次发布。

快速核酸检测仪校准规范

1 范围

本规范适用于快速核酸 检测仪的校准，其他类似设备也可参照本规范进行校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1007-2007 温度计量名词术语及定义

JJF 1101-2019 环境试验设备温度、湿度参数校准规范 JJF 1265-2022 生物计量术语及定义

JJF 1527-2015 聚合酶链反应分析仪校准规范 YY／T 1173-2010 聚合酶链反应分析仪凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范；凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本规范。

3 术语

JJF 1265-2022、JJF 1527-2015、YY／T 1173-2010中界定的以下术语和定义适用于本规范。

3.1 阈值循环数 Ct cycle threshold

实时检测扩增过程中，反应管内的荧光信号到达指数扩增时经历的循环周期数。主要的计算方式是以扩增过程前3～15个循环的荧光值的10倍标准差为阈值，当荧光值超过阈值时的循环数则为阈值循环数（Ct）。

[来源： YY/T 1173-2010，3.15]

3.2 等温扩增技术 isothermal amplification technology

反应过程始终维持在恒定的温度下，通过添加不同活性的酶和各自特异性引物来达到快速核酸扩增目的技术。

3.3 拷贝数 copy number

具有一个特定核酸序列的分子数目。如以copies/μl 表示。

[来源：JJF 1265-2022，4.41]

3.4 温度偏差 temperature deviation

恒温过程中模块内实测温度平均值与设定温度之差。

3.5 平均升温速率 mean heating rate

升温过程中模块单位时间内上升的平均温度度数。

［来源：YY/T 1173-2010，3.4］

3.6 平均降温速率 mean cooling rate

降温过程中模块单位时间内下降的平均温度度数。

［来源：YY/T 1173-2010，3.6］

3.7 平均过冲温度 average temperature overshoot

从基础温度升温或降温至设定温度时模块内实测温度偏离设定温度的幅度。

3.8 温度波动度 temperature fluctuation

恒温过程中模块内实测温度随时间的变化量。

3.9 持续时间 duration time

恒温过程中模块内维持温度的时间。

4 概述

快速核酸检测仪通常是基于实时荧光 PCR 技术或等温扩增技术的小型化检测仪，将核酸提取和扩增整合到一个设备，在短时间内完成对核酸的扩增检测。快速核酸检测仪主要由反应模块、光源模块、磁导模块、加热模块、光电检测系统、显示模块等部分组成，需与专用的核酸检测试剂盒配套使用。

5 计量特性

仪器计量特性见表1。

表 1 快速核酸检测仪计量特性

校准项目	技术要求	
	基于实时荧光PCR技术	基于等温扩增技术
温度偏差	±0.5℃	
平均升温速率	≥1.5℃/s	–
平均降温速率	≥1.5℃/s	–
平均过冲温度	≤2℃	–
温度波动度	–	±0.5℃
持续时间偏差	±10%	
样本检测重复性	≤5%	
注：以上所有技术指标不用于合格性判定，仅供参考。		

6 校准条件

6.1 环境条件

温度：（10～40）℃；相对湿度：不大于 85%。

6.2 测量标准及其他设备

快速核酸检测仪温度参数测量标准为高精度采集系统（通常为温度记录器），由精密温度传感器、数据采集分析模块组成，应与快速核酸检测仪不同形状、结构的反应模块相匹配并接触良好、紧密贴合。

测量标准、其他设备及技术要求见表2

表 2 测量标准、其他设备及技术要求

序号	名称	规格	技术要求
		基于实时荧光PCR技术	基于等温扩增技术
1	温度参数 测量标准	测量范围：（0～120）℃ 分辨力：不低于 0.01℃ 最大允许误差：±0.1℃ 采样时间间隔：≤0.1s	测量范围：（0～120）℃ 分辨力：不低于 0.01℃ 最大允许误差：±0.1℃ 采样时间间隔：≤10s
2	时间参数 测量标准	采用温度记录器的记录时间作为快速核酸检测仪时间测量标准 分辨力：不低于 0.1s ；最大允许误差：±0.10s/h	
3	新型冠状病毒 核酸标准物质	ORFlab基因、N 基因 国家有证标准物质	
4	移液器	（2.5、10、100、200、1000、5000）μL检定合格	

注：本规范采用新型冠状病毒核酸标准物质为例，若快速核酸检测仪用于检测其他病原体可采用相应的国家有证标准物质。

7 校准项目和校准方法

7.1 校准项目

基于实时荧光PCR技术和等温扩增技术的快速核酸检测仪校准项目见表3。

表 3 快速核酸检测仪校准项目

校准项目	基于实时荧光PCR技术	基于等温扩增技术
温度偏差	+	+
平均升温速率	+	–
平均降温速率	+	–
平均过冲温度	+	–
温度波动度	–	+

持续时间偏差	+	+
样本检测重复性	+	+
注：+表示应校准；-表示不校准。		

7.2 温度校准

7.2.1 测量方法

独立控温模块快速核酸检测仪可逐个模块校准或同时对多个模块分别校准，参照图1所示。非独立控温的快速核酸检测仪作为一个整体进行温度校准，以8通道、16通道快速核酸检测仪为例，布点遵循均匀分布的原则，可参照图 2（a）和图 2（b）所示，每增加8通道可增加3个点。多模块或多通道的快速核酸检测仪以所有布点计算结果的最大值作为测量结果。

基于实时荧光PCR技术的快速核酸检测仪控温程序设置可参照表4进行，设置温度采样间隔为0.1s。基于等温扩增技术的快速核酸检测仪温度设定程序可参照表5进行，设置温度采样间隔为10s。也可根据用户要求设置温控程序。将专用无线温度校准装置置入样品槽中，启动温度测量标准，自动采集并记录整个循环程序温度数据。

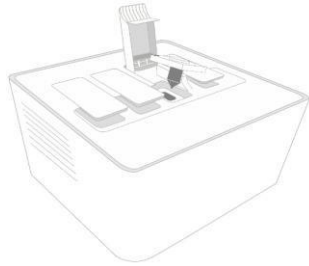


图 1独立模块快速核酸检测仪布点示意图

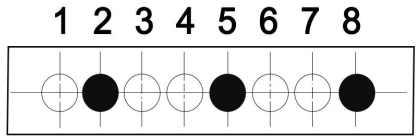


图2（a）8通道快速核酸检测仪布点示意图

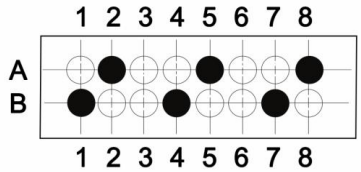


图2（b）16通道快速核酸检测仪布点示意图

表4 基于实时荧光PCR技术快速核酸检测仪控温程序

步骤	设定温度点/℃	设定温度持续时间/s	循环数
1	50	30	×1
2	90	30	×1
3	40	30	×6
4	95	30	
5	70	30	×1
6	60	30	×1
7	40	30	×1

表5 基于等温扩增技术快速核酸检测仪控温程序

步骤	设定温区	设定温度点/℃	设定温度持续时间/min
1	上温区	95	10
2	中温区	67	10
3	下温区	58	10

7.2.2 温度偏差

温度偏差按照公式（1）、（2）计算。

$$\Delta T_{\mathrm{d}} = \overline{T_{\mathrm{c}}} - T_{\mathrm{s}} \qquad (1)$$

$$\overline{T_{\mathrm{c}}} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} T_{\mathrm{i}} \qquad (2)$$

式中：

ΔT_{d} ——模块温度偏差，℃；

$\overline{T_{\mathrm{c}}}$ ——该模块温度实测值的平均值，℃；

T_{s} ——模块设定温度，℃；

T_i ——该模块校准装置第 i 次的测量值，℃；

n ——测量次数。

7.2.3 平均升温速率（基于实时荧光PCR技术）

从 40℃升至95℃过程中截取50℃至90℃的温度曲线如图 3 所示（取温度达到50℃和

90℃后采集的第一个值）计算升温速率，平均升温速率按照公式（3）、（4）计算：

$$V_{ui}=\frac{(T_B-T_A)}{t} \qquad (3)$$

$$\overline{V_{ui}}=\frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m}V_{ui} \qquad (4)$$

式中：

V_{ui}——模块第i个循环升温速率，℃/s ；

V_{ui}——模块平均升温速率，℃/s ；

T_A——50℃温度点测量值，℃；

T_B——90℃温度点测量值，℃；

t——从T_A到达T_B的时间，s；

m——累积循环数，按本规范程序设置为 6。

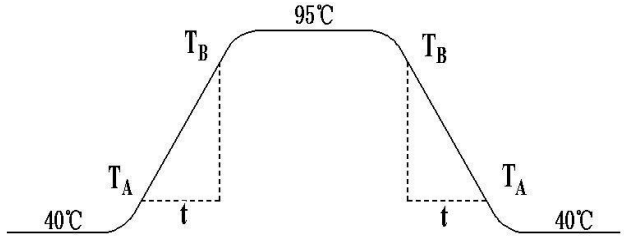


图 3 升降温速率取点示意图

7.2.4 平均降温速率（基于实时荧光PCR技术）

从95℃降至40℃过程中截取90℃至50℃的温度曲线如图3所示（取温度降至90℃和 50℃后采集的

第一个值）计算降温速率，平均降温速率按照公式（5）、（6）计算：

$$V_{di}=\frac{(T_B-T_A)}{t} \qquad (5)$$

$$\overline{V_{di}}=\frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m}V_{di} \qquad (6)$$

式中：

V_{di}——模块第i个循环升温速率，℃/s；

$\overline{V_{di}}$——模块平均升温速率，℃/s；

T_A——50℃温度点测量值，℃；

T_B——90℃温度点测量值，℃；

t——从T_B到达T_A的时间，s；

m——累积循环数，按本规范程序设置为 6。

7.2.5 平均过冲温度（实时荧光PCR技术）

模块温度从 40℃升温至设定温度 95℃或从 95℃降温至设定温度 40℃时，模块内实测温度偏离设定温度的温度值，如图 4 所示。平均升温过冲温度按照公式（7）、（8）计算，平均降温过冲温度按照公式（9） ）、（10）计算。

$$\Delta T_{95℃} = \overline{T}_{\max} - T_{s95℃} \quad (7)$$

$$\overline{T}_{\max} = \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m} T_{i\max} \quad (8)$$

$$\Delta T_{40℃} = \overline{T}_{\min} - T_{s40℃} \quad (9)$$

$$\overline{T}_{\min} = \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m} T_{i\min} \quad (10)$$

式中：

$\Delta T_{95℃}$——模块升温平均过冲温度，℃；

$T_{s95℃}$——模块设定温度值，95℃；

$\overline{T}_{\max}$——该模块各循环升温实测最大过冲温度平均值，℃；

$T_{i\max}$——模块第 i个循环升温实测最大过冲温度，℃；

$\Delta T_{40℃}$——模块降温平均过冲温度，℃；

$\Delta T_{s40℃}$——模块设定温度值，40℃；

$\overline{T}_{\min}$——该模块各循环降温实测最大过冲温度平均值，℃；

$T_{i\min}$——模块第i个循环降温实测最大过冲温度，℃；

m——累积循环数，按本规范程序设置为6。

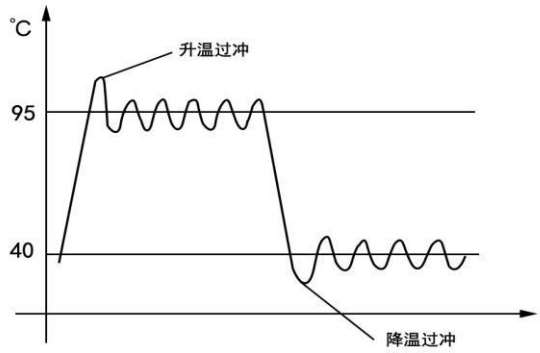


图4　单循环过冲温度示意图

7.2.6 温度波动度（等温扩增技术）

温度波动度按照公式（11）计算：

$$\Delta T_{\mathrm{f}} = \pm\frac{1}{2}\left(T_{\max} - T_{\min}\right) \qquad (11)$$

式中：

ΔT_{f}——模块温度波动度，℃；

$T_{\max}$——模块恒温时间内实测最高温度，℃；

$T_{\min}$——模块恒温时间内实测最低温度，℃。

7.2.7 持续时间偏差

t_1、t_2 取点示意图如图 5 所示，持续时间的偏差按照公式（12）、（13）计算：

$$\Delta t = t_{\mathrm{c}} - t_{\mathrm{s}} \qquad (12)$$

$$t_{\mathrm{c}} = t_2 - t_1 \qquad (13)$$

式中：

Δt——持续时间偏差，s ；

t_{c} ——实际持续时间，s ；

t_{s} ——设定持续时间，s ；

t_1——校准装置采集到的第一个到达设定温度的时刻；

t_2——校准装置采集到的最后一个维持设定温度的时刻。

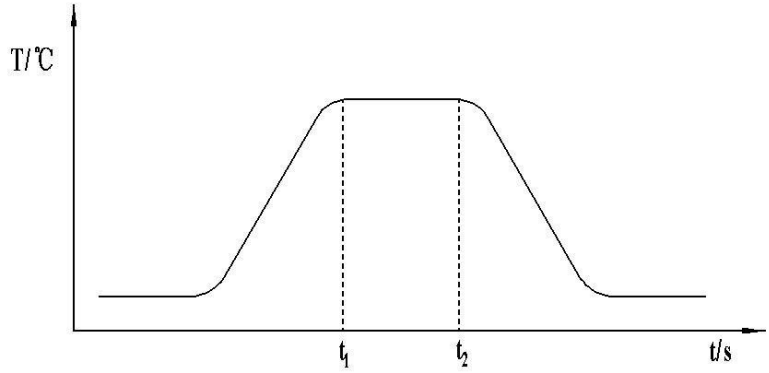


图 5 t_1 、t_2 取点示意图

7.3 样本检测重复性

样本检测重复性用变异系数表示。将标准物质稀释到高于检出限的一定浓度（比如1000 copies/mL）作为样本，对同一模块或通道进行6次或6次以上重复性检测，分别记录ORFlab基因和N基因的Ct值。按照公式（14）计算。

$$CV = \frac{SD}{\overline{M}} \times 100\% \qquad (14)$$

式中：

CV ——变异系数；

SD ——标准差；

$\overline{M}$ ——测量结果的平均值。

多模块或多通道的快速核酸检测仪可以根据用户要求进行。

8 校准结果表达

8.1 校准记录

校准记录格式参见附录A。

8.2 校准结果的处理

校准证书内页格式参见附录B，校准证书应至少包括以下内容：

a）标题：“校准证书”；

b）实验室名称和地址；

c）进行校准的地点（如果与实验室地址不同）；

d）证书的唯一性标识（如编号），每页及总页数的标识；

e）客户的名称和地址；

f）被校准设备的描述和明确标识；

g）进行校准的日期，如果与校准结果的有效性或应用有关时，应说明被校对象接收日期；

h）如果与校准结果的有效性或应用有关时，应对被校样品的抽样程序进行说明；

i）校准所依据的技术规范的标识，包括名称及代号；

j）本次校准所用测量标准的溯源性及有效性说明；

k）校准环境的描述；

l）校准结果及测量不确定度的说明；

m）对校准规范的偏离的说明；

n）校准证书或校准报告签发人的签名、职务或等效标识；

o）校准结果仅对被校设备有效的声明；

p）未经实验室书面批准，不得部分复制证书的声明。

9 复校时间间隔

建议复校间隔时间为1年，使用特别频繁时应适当缩短。凡在使用过程中经过修理、更换重要器件等一般需要重新校准。

由于复校间隔时间的长短是由快速核酸检测仪的使用情况、使用者、仪器本身质量等因素所决定，因此，用户可根据实际使用情况确定复校时间间隔。

附录A

快速核酸检测仪校准结果记录参考格式

委托单位_____ 仪器名称_____

制造厂_____ 型号规格_____

出厂编号_____ 校准地点_____

校准日期_____ 环境温度____℃ 环境相对湿度____% 校准员_____

校准依据_____ 核验员_____

本次校准用标准器信息：

标准器名称_____ 标准器编号_____

型号/规格_____ 制造单位_____

溯源单位_____ 证书编号_____ 有效期至_____

准确度等级/最大允许误差/不确定度_____

1、外观及工作正常性检查：

2、温度偏差

温度设定值/℃	实测温度值/℃							平均值/℃	温度偏差/℃
	1	2	3	4	5	6	……		

3、平均升温速率（实时荧光PCR技术）

温度设定值/℃	测量点						
	1	2	3	4	5	6	……
时间差/s							

升温速率/(℃/s)							
平均升温速率/(℃/s)							

4、平均降温速率（实时荧光PCR技术）

温度设定值/℃	测量点						
	1	2	3	4	5	6	……
时间差/s							
降温速率/(℃/s)							
平均降温速率/(℃/s)							

5、平均过冲温度（实时荧光PCR技术）

T_{imax} 或 T_{imin}	测量值/℃						
	1	2	3	4	5	6	……
$\overline{T}_{max}$ 或 $\overline{T}_{min}$							
$\Delta T_{95℃}$ 或 $\Delta T_{40℃}$							

6、温度波动度（等温扩增技术）

温度值/℃	测量值/℃
T_{max}	
T_{imin}	
ΔT_f	

7、持续时间偏差（实时荧光PCR技术）

时刻	
设定值/s	
持续时间/s	
偏差/s	

8、样本检测重复性

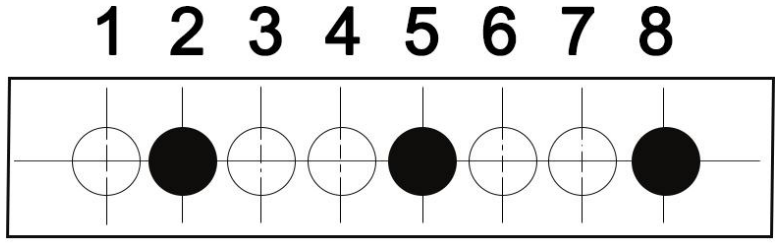
核酸浓度（copies/μL）	Ct值						变异系数

附录B

快速核酸检测仪校准证书内页参考格式

1. 布点示意图如B.1所示。

校　准　结　果



图B.1布点示意图

2. 校准结果：

校准项目	校准结果	扩展不确定度（k=2）
温度偏差/℃		
平均升温速率/(℃/s)		
平均降温速率/(℃/s)		
升温平均过冲温度/℃		
降温平均过冲温度/℃		
温度波动度/℃		
持续时间偏差/s		
样本检测重复性		/

附录C

快速核酸检测仪温度偏差测量不确定度评定示例

C.1 方法概述

用专用无线温度校准装置对一台8通道基于实时荧光PCR技术的快速核酸检测仪单模块分别在40℃、50℃、60℃、70℃、90℃、95℃进行校准，记录各点测量值。

C.2 测量模型

温度偏差可表示为：

$$\Delta T_{\mathrm{d}} = \overline{T_{\mathrm{c}}} - T_{\mathrm{s}}$$

式中：

ΔT_{d} ——模块温度偏差，℃；

$\overline{T_{\mathrm{c}}}$ ——该模块温度实测值的平均值，℃；

T_{s} ——模块设定温度，℃。

灵敏系数 $c_1 = \dfrac{\partial \Delta T_{\mathrm{d}}}{\partial \overline{T_{\mathrm{c}}}} = 1$ $c_2 = \dfrac{\partial \Delta T_{\mathrm{d}}}{\partial T_{\mathrm{s}}} = -1$

C.3 不确定度分量

C.3.1 测量重复性引入的标准不确定度分量u_1

在各个温度点采集数据见表C.1。

表C.1 测量重复性数据 单位：℃

设定温度	实测温度	平均温度
40	40.99、40.94、40.89、40.85、40.81、40.77、40.73、40.69、40.66、40.63、40.60、40.56、40.54、40.51、40.49、40.46、40.44、40.42、40.40、40.38、40.37、40.35、40.33、40.32、40.30、40.29、40.28、40.27、40.26、40.25	40.53
50	50.29、50.24、50.21、50.17、50.13、50.09、50.05、50.03、50.00、49.97、49.94、49.91、49.88、49.86、49.84、49.81、49.79、49.77、49.75、49.73、49.71、49.70、49.68、49.67、49.66、49.65、49.63、49.62、49.62、49.61、	49.87
60	60.02、59.96、59.91、59.86、59.81、59.77、59.74、59.69、59.66、59.63、59.60、59.58、59.55、59.52、59.50、59.49、59.47、59.45、59.43、59.42、59.39、59.39、59.37、59.36、59.35、59.34、59.33、59.32、59.31、59.31、	59.55

70	70.06、70.12、70.16、70.22、70.27、70.32、70.36、70.41、70.45、70.50、70.53、70.58、70.61、70.65、70.68、70.72、70.75、70.78、70.81、70.84、70.87、70.89、70.93、70.95、70.98、71.00、71.03、71.04、71.06、71.07	70.65
90	90.17、90.23、90.29、90.35、90.38、90.43、90.49、90.52、90.58、90.60、90.66、90.69、90.75、90.78、90.81、90.83、90.86、90.89、90.92、90.95、90.98、91.01、91.04、91.07、91.10、91.10、91.13、91.15、91.15、91.18	90.77
95	95.24、95.34、95.49、95.56、95.67、95.78、95.85、95.92、96.00、96.07、96.11、96.14、96.22、96.25、96.29、96.33、96.36、96.40、96.40、96.44、96.44、96.48、96.48、96.51、96.51、96.55、96.55、96.59、96.59、96.59	96.17

依据公式：$S(T)=\sqrt{\dfrac{\sum_{i=1}^{n}\left(T_i-\overline{T}\right)^2}{n-1}}$

可得测量重复性引入的标准不确定度分量u_1，见表C.2。

表C.2　重复性引入的标准不确定度分量　　单位：℃

温度	40	50	60	70	90	95
u_1	0.22	0.21	0.21	0.31	0.30	0.40

C.3.2 测量标准引入的标准不确定度u_2

专用无线温度校准装置溯源证书可知其扩展不确定度U=0.07℃，包含因子k=2，所以该校准装置引入的标准不确定度

$$u_2=\frac{U}{k}=\frac{0.07}{2}=0.035℃$$

C.3.3 设定温度分辨力引入的标准不确定度u_3

快速核酸检测仪的设定温度分辨力为0.1℃，区间半宽0.05℃，服从均匀分布，所以分辨力引入的标准不确定度分量为

$$u_3=\frac{0.05}{\sqrt{3}}=0.029℃$$

C.3.4 各标准不确定度分量汇总（见表C.3）

表C.3 各标准不确定度分量汇总

温度点（℃）	荧光定量扩增设备校准系统的准确度引入的不确定度分量	重复性引入的不确定度分量

	灵敏系数c_1	u_2（℃）	u_3（℃）	灵敏系数c_2	u_1（℃）
40	1	0.035	0.029	−1	0.22
50	1	0.035	0.029	−1	0.21
60	1	0.035	0.029	−1	0.21
70	1	0.035	0.029	−1	0.31
90	1	0.035	0.029	−1	0.30
95	1	0.035	0.029	−1	0.31

C.4 合成标准不确定度

以上各输入量无关，故温度示值偏差校准结果的合成标准不确定度u_c为：

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

计算结果见表C.4。

C.5 扩展不确定度

取包含因子$k = 2$，则扩展不确定度为：

$$U = ku_c$$

计算结果见表C.4。

表C.4　合成标准不确定度及扩展不确定度　　单位：℃

温度点	合成标准不确定度u_c	扩展不确定度U（k=2）
40	0.228	0.46
50	0.208	0.43
60	0.210	0.42
70	0.309	0.62
90	0.303	0.61
95	0.397	0.80