



北京市地方计量技术规范

JJF (京) XXXX-202X

快速核酸检测仪校准规范

Calibration Specification for Rapid Nucleic Acid Detectors

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

北京市市场监督管理局 发布

快速核酸检测仪 校准规范

Calibration Specification for Rapid

Nucleic Acid Detectors

JJF(京) XXXX-202X

归口单位：北京市市场监督管理局

主要起草单位：北京市计量检测科学研究院

参加起草单位：

本规范委托XXX负责解释

目 录

1	范围.....	(1)
2	引用文件.....	(1)
3	术语和计量单位.....	(1)
3.1	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.....	(2)
6.2	测量标准及其他设备.....	(3)
7	校准项目与校准方法.....	(3)
7.1	校准项目.....	(3)
7.2	温度校准.....	(4)
7.3	检出限的检查.....	(9)
7.4	样本检测重复性.....	(9)
8	校准结果表达.....	(10)
8.1	校准结果处理.....	(10)
8.2	校准结果的测量不确定度.....	(10)
9	复校时间间隔.....	(11)
附录 A	快速核酸检测仪校准结果记录参考格式.....	(12)
附录 B	快速核酸检测仪校准证书内页参考格式.....	(16)
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.....	(17)

引 言

JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》、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修订工作的基础性系列规范。

本规范为北京市首次发布。

快速核酸检测仪校准规范

1 范围

本规范适用于将核酸提取、扩增检测一体化运行，基于控温基因扩增技术的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 1527-2015 聚合酶链反应分析仪校准规范

JJF 1101-2019 环境试验设备温度、湿度参数校准规范

JJF 1817-2020 核酸分析仪校准规范

JJF 1821-2020 聚合酶链反应分析仪温度校准装置校准规范

YY/T 1173-2010 聚合酶链反应分析仪

3 术语和计量单位

3.1 术语

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

3.1.1 阈值循环数 Ct cycle threshold 【YY/T 1173-2010 3.15】

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）。

3.1.2 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的技术。

3.1.3 拷贝数 copy number 【JJF1265-2010 4.29】

特定基因在某一生物体基因组中所含的个数以及每个生物细胞中所具有的转录物（RNA）个数。

3.1.4 检出限 limit of detection

为某特定分析方法在给定的置信度内可从样品中检出待测物质的最小浓度或最小量。

3.1.5 平均升温速率 mean heating rate 【YY/T 1173-2010 3.4】

升温过程中模块单位时间内上升的平均温度度数。

3.1.6 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。

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器,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℃	
温度波动度	—	±0.5℃
平均升温速率	≥1.5℃/s	参考厂家技术要求
平均降温速率	≥1.5℃/s	—
平均温度过冲量	≤1℃	
温度持续时间相对偏差	±10%	
检出限	≤500 copies/mL	
样本检测重复性	≤5%	
注：上述计量特性指标仅供参考，不判断合格与否。		

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。

测量标准技术指标要求见表 2。校准时可选用表 2 所列的测量标准，也可以选用符合要求的其他测量标准。

表2 测量标准、其他设备及技术要求

标准	技术要求	
	基于实时荧光 PCR 技术测量标准器	基于等温扩增技术测量标准器
温度参数测量标准	测温范围：(0~120) °C 分辨力：不低于 0.01 °C 最大允许误差：±0.10°C 采样间隔不大于 0.1s	测温范围：(0~120) °C 分辨力：不低于 0.01 °C 最大允许误差：±0.10°C 采样间隔不大于 10s
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：±1s / h	
新型冠状病毒核酸标准物质	ORFlab 基因、N 基因有证标准物质	
移液器	(2.5、10、100、200、1000、5000) μL 检定合格	
注：1、也可以选择满足校准要求的其他测量标准。2、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有证标准物质。		

7 校准项目与校准方法

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 设备类型	基于实时荧光 PCR 技术	基于等温扩增技术
温度偏差	+	+
温度波动度	-	+

平均升温速率	+	+
平均降温速率	+	-
平均温度过冲量	+	+
温度持续时间准确性	+	+
检出限的检查	+	+
样本检测重复性	+	+
注：+表示校准项目，-表示非校准项目		

7.2 温度校准

7.2.1 测量点位置和数量

将快速核酸检测仪测量标准放置于快速核酸检测仪中，独立控温快速核酸检测仪可逐个对反应模块校准或同时对多个反应模块分别校准，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校准，以 16 通道快速核酸检测仪为例，测量点分布遵循均匀分布的原则，可参照图 2 所示，每增加 8 通道可增加 2 个测量点。

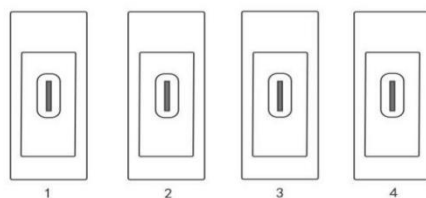


图 1 独立控温快速核酸检测仪测量点分布示意图

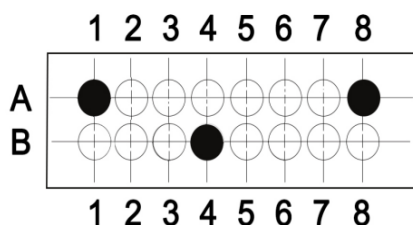


图 2 非独立控温的快速核酸检测仪测量点分布示意图

7.2.2 测量程序

根据被校准快速核酸检测仪的说明书设定控温程序，基于实时荧光 PCR 技术和基于等温扩增技术的快速核酸检测仪控温程序设置可参考表 4 和表 5。也可根据用户要求设置控

温程序。基于实时荧光 PCR 技术快速核酸检测仪校准装置设置采样间隔为 100ms，基于等温扩增技术快速核酸检测仪校准装置设置采样间隔为 10s，启动快速核酸检测仪校准装置，放入快速核酸检测仪中采集并记录整个循环程序温度数据。

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	循环次数
1	50°C	30s	1
2	90°C	30s	1
3	40°C	30s	6
4	95°C	30s	
5	70°C	30s	1
6	60°C	30s	1
7	40°C	30s	1

表 5 基于等温扩增技术快速核酸检测仪控温程序

设定温区	设定温度点	设定温度持续时间
上温区	95°C	10min
中温区	67°C	10min
下温区	58°C	10min

7.2.3 温度偏差

基于实时荧光 PCR 技术快速核酸检测仪温度达到设定温度 10s 后开始读取测量值，读取 10s，均匀读取 20 组数据；基于等温扩增技术快速核酸检测仪温度达到设定温度 2min 后开始读取测量值，读取 5min，均匀读取 30 组数据，温度偏差的计算按照公式 (1) (2) 分别计算：

$$\Delta t_{max} = t_{max} - t_s \quad (1)$$

$$\Delta t_{min} = t_{min} - t_s \quad (2)$$

式中：

Δt_{max} —— 温度上偏差，°C；

Δt_{min} ——温度下偏差, °C;

t_{max} ——各测量点规定时间内测量的最高温度, °C。

t_{min} ——各测量点规定时间内测量的最低温度, °C。

t_s ——设备设定温度, °C。

7.2.4 温度波动度

基于等温扩增技术快速核酸检测仪温度达到设定温度 2min 后开始读取测量值, 读取 5min, 均匀读取 30 组数据, 各测量点最高温度与最低温度值差值的一半, 冠以“±”号, 取全部测量点中变化量的最大值作为温度波动度的校准结果, 计算按照公式 (3) 计算:

$$\Delta t_f = \pm \max[(t_{jmax} - t_{jmin})/2] \quad (3)$$

式中:

Δt_f ——温度波动度, °C;

t_{jmax} ——测量点 j 实测最高温度, °C;

t_{jmin} ——测量点 j 实测最低温度, °C。

7.2.5 平均升温速率

基于实时荧光 PCR 技术快速核酸检测仪在设置程序步骤 3-4 循环 6 次的过程中, 取前 5 次仪器从 40°C 升温至 95°C 循环时(如下图 3 所示), 截从(50±0.5)°C 瞬时升温至(90±0.5)°C 瞬时的温度曲线计算升温速率, 平均升温速率的计算按照公式 (4) (5) 计算:

$$\overline{V}_u = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m V_{uj} \quad (4)$$

$$V_u = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{t_{bi} - t_{ai}}{\tau_{hi}} \quad (5)$$

式中:

\overline{V}_u ——平均升温速率, °C/s ;

V_{uj} ——第 j 个测量点升温速率, °C/s ;

V_u ——升温速率, °C/s ;

n ——累积循环次数, 按本规范程序取前 5 次;

t_{ai} ——(50±0.5)°C 温度点第 i 次测量值, °C;

t_{bi} ——(90±0.5) °C温度点第*i*次测量值, °C;

τ_{hi} ——从 t_{ai} 到达 t_{bi} 的时间, s。

m ——测量点数量。

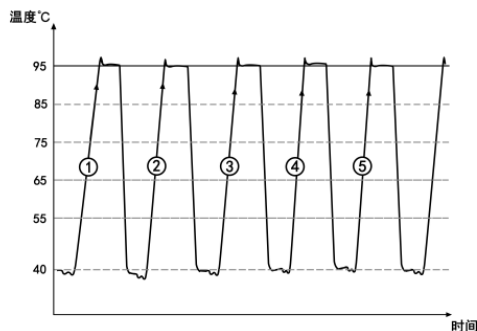


图 3 实时荧光 PCR 技术平均升温速率步骤 3-4 循环取前 5 次

基于等温扩增技术快速核酸检测仪取从常温状态升温至 95°C, 截从最接近 50°C 瞬时升温至最接近 90°C 瞬时的温度曲线计算升温速率 (如下图 4 所示), 平均升温速率的计算按照公式 (6) 计算:

$$\bar{V}_u = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{(t_{bi} - t_{ai})}{\tau_{hi}} \quad (6)$$

式中:

\bar{V}_u ——平均升温速率, °C/s ;

t_{ai} ——最接近 50°C 温度点第*i*个测量点测量值, °C;

t_{bi} ——最接近 90°C 温度点第*i*个测量点测量值, °C;

τ_{hi} ——从 t_{ai} 到达 t_{bi} 的时间, s。

m ——测量点数量。

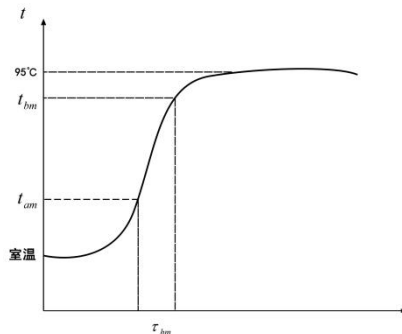


图 4 等温扩增技术平均升温速率截取示意图

7.2.6 平均降温速率

基于实时荧光 PCR 技术快速核酸检测仪在设置程序步骤 3-4 循环过程中,仪器从 95℃ 降温至 40℃ 循环一共 5 次(如下图 5 所示),截取仪器各循环从(90±0.5)℃ 降温至(50±0.5)℃ 的温度曲线计算降温速率,平均降温速率的计算按照公式(7)(8)计算:

$$\overline{V_d} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m V_{dj} \quad (7)$$

$$V_d = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(t_{bi} - t_{ai})}{\tau_{di}} \quad (8)$$

式中:

$\overline{V_d}$ ——平均降温速率, °C/s ;

V_{dj} ——第 j 个测量点降温速率, °C/s ;

V_d ——降温速率, °C/s ;

n ——累积循环次数,按本规范程序取全部 5 次降温段;

t_{ai} ——(50±0.5) °C 温度点第 i 次测量值, °C;

t_{bi} ——(90±0.5) °C 温度点第 i 次测量值, °C;

τ_{di} ——从 t_{bi} 到达 t_{ai} 的时间, s。

m ——测量点数量。

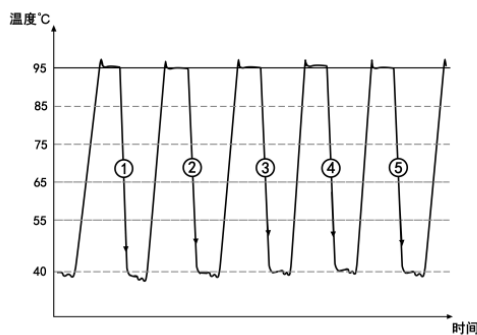


图 5 实时荧光 PCR 技术平均降温速率步骤 3-4 循环取 5 次

7.2.7 平均温度过冲量

基于实时荧光 PCR 技术快速核酸检测仪温度过冲量以设备温度从 40℃ 升温至设定温度 95℃ 时,实测温度值超出设定温度的值。平均温度过冲量计算按照公式(9)分别计算:

$$\overline{\Delta t} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m (t_{sjmax} - t_s) \quad (9)$$

式中:

$\overline{\Delta t}$ ——平均温度过冲量， $^{\circ}\text{C}$ ；

t_s —— 设定温度值， 95°C ；

t_{jmax} ——第 j 个测量点 6 次测得的最大过冲温度值， $^{\circ}\text{C}$ ；

m ——测量点数量。

基于等温扩增技术快速核酸检测仪温度过冲量以设备温度从室温升温至设定温度 95°C ，实测温度超出设定温度的值。平均温度过冲量计算按照公式（10）分别计算：

$$\overline{\Delta t} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m (t_{sjmax} - t_s) \quad (10)$$

式中：

$\overline{\Delta t}$ ——平均温度过冲量， $^{\circ}\text{C}$ ；

t_s —— 设定温度值， 95°C ；

t_{jmax} ——第 j 个测量点测得的最大过冲温度值， $^{\circ}\text{C}$ ；

m ——测量点数量。

7.2.8 温度持续时间相对误差

温度持续时间相对误差按照公式（11）计算：

$$\Delta\tau = \frac{\tau_s - \tau_c}{\tau_c} \times 100\% \quad (11)$$

式中：

$\Delta\tau$ ——温度持续时间相对误差， $\%$ ；

τ_c ——实测温度持续时间， s ；

τ_s ——设定温度持续时间， s 。

7.3 检出限的检查

将标准物质稀释到设备宣称的检出限（参照配套使用的核酸检测试剂盒说明书，比如 500 copies/mL ）作为样本，对同一模块或通道进行 2 次检测，分别记录 ORFlab 基因和 N 基因的扩增结果，与设备宣称的检出限进行比较。

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。

7.4 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 (12) 计算。

$$CV = \frac{SD}{\bar{M}} \times 100\% \quad (12)$$

式中:

CV —— 变异系数

SD —— 标准差

\bar{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 校准结果处理

校准结果应在校准证书(报告)上反映,校准证书(报告)应至少包括以下信息:

- a) 标题:如“校准证书”;
- b) 实验室名称和地址;
- c) 进行校准的地点(如果与实验室的地址不同);
- d) 证书或报告的唯一性标识(如编号),每页及总页数的标识;
- e) 客户的名称和地址;
- f) 被校对象的描述和明确标识;
- g) 进行校准的日期,如果与校准结果的有效性和应用有关时,应说明被校对象的接收日期;
- h) 如果与校准结果的有效性和应用有关时,应对被校样品的抽样程序进行说明;
- i) 对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) 校准结果及其测量不确定度的说明;
- m) 对校准规范的偏离的说明;
- n) 校准证书和校准报告签发人的签名、职务或等效标识;
- o) 校准结果仅对被校对象有效的声明;
- p) 未经实验室书面批准,不得部分复制证书或报告的声明。

快速核酸检测仪校准结果记录参考格式见附录 A，快速核酸检测仪校准证书内页参考格式见附录 B。校准结果测量不确定度评定示例见附录 C。

9 复校时间间隔

建议复校间隔时间为一年，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

A.1 基于实时荧光 PCR 技术快速核酸检测仪校准原始记录参考格式

证书编号: XXXXXX-XXXX

基本信息			
委托单位名称:		委托单位地址:	
制造厂商:		仪器名称:	
规格型号:		出厂编号:	
校准依据:			
环境温度: °C		环境湿度: %RH	
校准日期			
校准员:		核验员:	
标准器信息			
计量标准(器)名称			
计量标准器溯源单位及证书号		有效期至	
测量范围		准确度等级	

一、 温度偏差:

设定温度点: _____ °C

测量点 次数	A1 (°C)	A8 (°C)	B4 (°C)
1				
2				
3				
.....				
最大值				
最小值				
上偏差 (°C)		下偏差 (°C)		

二、 平均升温速率、平均降温速率、平均温度过冲量:

测量点	A1	A8	B4
-----	----	----	----	-------

过冲量 (°C)				
平均温度过冲量 (°C)				
平均升温速率 (°C/s)				
平均降温速率 (°C/s)				

三、温度持续时间相对误差:

测量点	
设定温度持续时间(s)	
实测温度持续时间(s)	
相对误差(%)	

四、检出限的检查

核酸浓度 (copies/μL)	扩增结果		检查结果

五、样本检测重复性

核酸浓度 (copies/μL)	Ct 值						变异系数

A.2 基于等温扩增技术快速核酸检测仪校准原始记录参考格式

证书编号: XXXXXX-XXXX

基本信息			
委托单位名称:		委托单位地址:	
制造厂商:		仪器名称:	
规格型号:		出厂编号:	
校准依据:			
环境温度: °C		环境湿度: %RH	
校准员:		核验员:	
标准器信息			
计量标准(器)名称			
计量标准器溯源单位及证书号		有效期至	
测量范围		准确度等级	

一、温度偏差、温度波动度

设定温度点: °C

测量点 次数	1 (°C)	2 (°C)	3 (°C)
1				
2				
3				
.....				
最大值				
最小值				
上偏差 (°C)			下偏差 (°C)	
温度波动度 (°C)				

二、平均升温速率、平均温度过冲量

测量点	1	2	3
过冲量 (°C)				
平均温度过冲量 (°C)				
平均升温速率 (°C/s)				

三、温度持续时间

测量点	

设定温度持续时间(s)	
实测温度持续时间(s)	
温度持续时间相对误差(%)	

四、检出限的检查

核酸浓度 (copies/ μ L)	扩增结果		检查结果

五、样本检测重复性

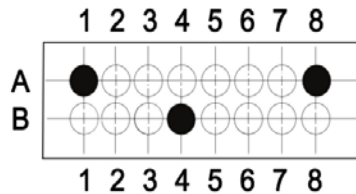
核酸浓度 (copies/ μ L)	Ct 值						变异系数

附录 B

快速核酸检测仪校准证书内页参考格式

校 准 结 果

1. 布点示意图如 B.1 所示。



图B.1 布点示意图

2. 校准结果:

设定温度点 (°C)					
温度上偏差 (°C)					
温度下偏差 (°C)					
温度波动度 (°C)					
平均温度过冲量 (°C)					
平均升温速率 (°C/s)					
平均降温速率 (°C/s)					
温度持续时间相对误差(%)					
检出限的检查					
样本检测重复性					
温度偏差校准结果的扩展不确定度					

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

C.1 测量方法

将快速核酸检测仪及快速核酸检测仪校准装置各部件连接完好，快速核酸检测仪校准装置置于仪器反应模块中，并确保与反应模块接触良好。按照仪器说明书或用户要求或推荐使用的温度控制程序，并运行该程序。温度上偏差的计算按照公式 (C.1) 进行。

C.2 数学模型

$$\Delta t_{max} = t_{max} - t_s \quad (C.1)$$

式中：

Δt_{max} ——温度上偏差， $^{\circ}\text{C}$ ；

t_{max} ——各测量点规定时间内测量的最高温度， $^{\circ}\text{C}$ 。

t_s ——设备设定温度， $^{\circ}\text{C}$ 。

C.3 不确定度来源

根据上述数学模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下三个方面：

- (1) 测量重复性引入的标准不确定度分量 u_1 ；
- (2) 快速核酸检测仪校准装置分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' ；
- (3) 快速核酸检测仪校准装置准确度引入的标准不确定度分量 u_2 ；

C.4 各输入量的标准不确定度分量的评定

C.4.1 重复性测量引入的不确定度分量 u_1

以 95°C 为例，对同一台仪器，在相同的测量条件下，重复测量 10 次，温度稳定后读取温度测量值，3 个快速核酸检测仪校准装置的重复测量数据见表 C.1

表 C.1 温度测量结果

次数 测量点	不同测量点温度传感器测量结果 ($^{\circ}\text{C}$)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	94.98	94.90	95.00	95.04	95.13	94.99	95.02	95.03	95.09	94.98
A8	95.25	95.32	95.28	95.21	95.12	95.25	95.13	95.24	95.11	95.23
B4	94.96	94.85	95.01	95.12	95.14	94.93	94.95	94.98	94.94	94.99

合并样本标准偏差 按公式 (C.2) 计算：

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (y_{kj} - \bar{y}_j)^2}{m(n-1)}} \quad (\text{C.2})$$

式中:

m —— 测量点的数量;

n —— 每个测量点测量次数;

y_{kj} —— 第 j 个测量点第 k 次的测量值, $^{\circ}\text{C}$;

\bar{y}_j —— 第 j 个测量点测量值的平均值, $^{\circ}\text{C}$;

通过 (C.2) 计算出合并样本标准偏差如下:

$$s_p = 0.07^{\circ}\text{C}$$

因此重复测量引入的不确定度分量 u_1 为: $u_1 = 0.07^{\circ}\text{C}$

C.4.2 快速核酸检测仪校准装置分辨力引入的不确定度 u_1'

快速核酸检测仪校准装置的分辨力为 0.01°C , 分散区间半宽为 0.005°C , 按均匀分布计算, $k = \sqrt{3}$, 则 u_1' 为:

$$u_1' = \frac{0.005}{\sqrt{3}}^{\circ}\text{C} = 0.003^{\circ}\text{C}$$

由于重复测量引入的标准不确定度分量 u_1 大于分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' , 两者具有一定的相关性, 因此在不确定度计算时不考虑由读数分辨力引入的标准不确定度分量 u_1' 。

A.4.3 快速核酸检测仪校准装置准确度引入的标准不确定度分量 u_2 :

快速核酸检测仪校准装置的最大允许误差 $\pm 0.10^{\circ}\text{C}$, 按均匀分布计算, 则 u_2 为:

$$u_2 = \frac{0.1}{\sqrt{3}}^{\circ}\text{C} = 0.058^{\circ}\text{C}$$

C.5 合成标准不确定度 u_c

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 0.09^{\circ}\text{C}$$

C.6 扩展不确定度 U

取 $k = 2$, 则: $U = k \times u_c = 0.18^{\circ}\text{C}$

