

国家计量技术规范规程制修订

《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分
析性能验证和确认技术规范》
(征求意见稿)
编制说明

全国生物计量技术委员会

中国计量科学研究院

2024年02月

一、任务来源

根据国家市场监督管理总局 2022 年国家计量技术规范制定、修订及宣贯计划（市监计量发〔2022〕70 号）立项，由中国计量科学研究院、北京金域医学检验实验室有限公司和中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所共同承担《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分析性能验证和确认技术规范》的制定工作。

二、规范修订的必要性

荧光定量 PCR 方法具有检测速度快、结果重复性高等优势，被广泛应用于核酸定量和定性的分析过程。荧光定量 PCR 方法广泛应用于食源微生物、食品过敏源、转基因食品、乳品等检测。与此同时，该方法已经在肿瘤诊断、病毒检测、动物疾病检测与筛查以及药物疗效的评价与考核等方面发挥重要作用，目前国内外的公司研制了多种荧光定量 PCR 仪器^[1]。

荧光定量 PCR 利用荧光标记物的荧光信号积累，实时监测 PCR 反应中每一个循环扩增产物的量，通过已知量值的工作标准物质建立标准曲线对核酸样品进行定量分析。针对 RNA 定量需要进行逆转录，将 RNA 逆转录为 cDNA，再进行荧光定量 PCR 检测^[2]。常用荧光标记物有 TaqMan 探针、荧光染料等，TaqMan 探针为标记有荧光基团和淬灭基团的一段寡核苷酸序列，能与目的 DNA 序列特异性结合。在 PCR 扩增过程中，荧光基团和淬灭基团分离，产生荧光信号。由于荧光定量 PCR 的定量结果依赖于标准曲线，标准曲线显著影响测量结果的准确性^[3, 4]。

荧光定量 PCR 仪主要由样品载台、热循环部件、控制部件、光学检测部件、电源部件、计算机及应用软件等部件组成^[5]。荧光定量 PCR 仪在病原微生物检测等领域发挥重要作用。然而在不同实验室，荧光定量 PCR 分析性能的验证与确认方法有较大的差异，可能会影响测量结果的准确性与可比性^[6]。制定《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分析性能验证和确认技术规范》，将为荧光定量 PCR 分析性能的控制提供参考，提升相关测量结果的有效性，帮助提高医疗诊断科学性与食品安全性。

三、《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分析性能验证和确认技术规范》制定过程

1. 成立起草小组

2022 年 1-6 月《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分析性能验证和确认技术规范》，组织成立规范起草小组，包括中国计量科学研究院、北京金域医学检验实验室有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、江苏硕世生物科技有限公司，项目正式启动。

2. 规范起草

2022 年 7 月-9 月，起草小组对国内外相关的标准、文献和规范进行了调研，根据调研结果，起草了《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分析性能验证和确认技术规范》初稿。

2022 年 9 月-12 月，起草小组对规范草稿中的技术指标和要求进行了专家仔细，通过咨询和讨论，进行完善修改。

2023 年 1 月-2024 年 1 月，针对确定的技术指标和要求开始实验

验证。并根据验证结果反复修改完善草稿。

3. 征求意见

2023年2月，经过起草小组的充分讨论，形成了征求意见稿。开始面向全国征求意见。

四、规范制定的主要技术依据及原则

（一）依据

本次制订中校准规范文本结构按照 JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》的要求完成。其中不确定度评定部分按照 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》要求完成。主要性能指标参考了 JJF 1527-2015《聚合酶链式反应分析仪校准规范》、WS/T 420《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》、WS/T 492《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》、WS/T 514《临床检验方法检出能力的确立和验证》、CNAS-GL037《临床化学定量检验程序性能验证指南》，以及 CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》中相关内容。

（二）原则

1、结构

结构按照引言、范围、引用文献、概述、性能验证和性能确认指标、工作条件、确认与验证时机、确认程序、验证程序、性能确认/验证结果表达、性能确认/验证时间间隔、附录。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位的选择遵照 JJF1001-2011《通用计量术语及定义》选择使用。

3、性能确认和验证指标的确定原则

根据荧光定量 PCR 仪的特点,确定检测系统分析性能验证和确认的主要技术指标,同时参考了 JJF 1527-2015《聚合酶链式反应分析仪校准规范》、WS/T 420《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》、WS/T 492《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》、WS/T 514《临床检验方法检出能力的确立和验证》、CNAS-GL037《临床化学定量检验程序性能验证指南》,以及 CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》等标准中的有关指标。

五、规范制定说明

《荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统分析性能验证和确认技术规范》包括引言、范围、引用文献、概述、性能验证和性能确认指标、工作条件、确认与验证时机、确认程序、验证程序、性能确认/验证结果表达、性能确认/验证时间间隔、附录等部分。

1、范围

本规范适用于以核酸样品为测量对象的荧光定量聚合酶链反应(以下简称 PCR)核酸检测系统的分析性能验证和确认。

2、引用文献

本规范引用了下列文件:

JJF1059.1 测量不确定度评定与表示

JJF 1527 聚合酶链式反应分析仪校准规范

GB/T37871 核酸检测试剂盒质量评价技术规范

ISO9000-200 质量管理体系-基本原则和术语

WS/T 416 干扰实验指南

WS/T 420 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证

WS/T 492 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证

WS/T 505 定性测定性能评价指南

WS/T 514 临床检验方法检出能力的确立和验证

CNAS-GL037 临床化学定量检验程序性能验证指南

CNAS-GL039 分子诊断检验程序性能验证指南

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，其最新版本适用于本规范。

3、术语

这一部分对技术规范中使用的术语进行了定义，确认、验证、测量精密度、测量重复性、期间测量精密度、测量正确度、测量偏倚、检出限、定量限、分析特异性、测量系统的灵敏度等，相关术语与相关国家标准、行业标准和国际标准中的术语表述一致。

4、概述

这部分主要描述了荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统的组成、原理、结构，并简要介绍了荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统组成。

5、性能验证和性能确认指标

性能确认包括正确度、精密度（含测量重复性和期间精密度）、

测量不确定度、分析特异性（含抗干扰能力）、灵敏度、检出限、线性范围、定量限。性能验证包括正确度、精密度（含测量重复性和期间精密度）、线性范围。

6、确认与验证时机

确认时机：试剂厂商研发的试剂或检测系统在正式投入使用前；临床实验室自建方法时；实验室所使用的检测系统与试剂供应商所要求的检测系统不完全一致时；任何严重影响检测系统分析性能的情况发生后，应在检测系统重新启用前对受影响的性能部分进行确认。影响检测系统分析性能的情况可包括但不限于更换设备型号、更换试剂原材料批号等。

验证时机：新检测系统常规应用前；任何严重影响检测系统分析性能的情况发生后，应在检测系统重新启用前对受影响的性能部分进行验证。影响检测系统分析性能的情况可包括但不限于仪器主要部件故障、仪器搬迁、设施或环境的严重失控、试剂和关键耗材更换等；常规使用期间，实验室可基于分析系统的稳定性，利用日常工作产生的检验和质控数据，定期对检验程序的分析性能进行评估，应能满足检验结果预期用途的要求。

7、确认程序

这部分主要针对荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统的确认，分为定量检测系统和定性检测系统。定量检测系统的确认主要针对关键指标包括正确度、偏倚、回收效率、精密度、测量不确定度、分析特异性、线性范围、检出限和定量限，进行具体操作程序的描述。定性

检测系统的确认主要针对关键指标包括准确度、精密度、分析特异性和检出限，进行具体操作程序的描述。与仪器的校准规范相比，本部分明确了如何对荧光定量聚合酶链反应核酸定量和定性检测系统进行确认，用户可根据预期用途进行部分或全部引用。

8、验证程序

这部分主要针对荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统的验证，分为定量检测系统和定性检测系统。定量检测系统的验证主要针对关键指标包括正确度、精密度、线性范围，进行具体操作程序的描述。定性检测系统的确认主要针对关键指标包括符合率、精密度和检出限，进行具体操作程序的描述。与仪器的校准规范相比，本部分明确了如何对荧光定量聚合酶链反应核酸定量和定性检测系统进行验证，用户可根据预期用途进行部分或全部引用。

9、性能确认/验证结果表达

经性能确认/验证后的荧光定量聚合酶链反应核酸检测系统，可以出具性能确认/验证报告，报告内需包含确认/验证的原始数据及结论，具体的验证和确认原始记录格式分别在附录 1-4 中给出。

10、性能确认/验证时间间隔

在检测系统未发生重大变化时，性能确认无需再做。每年定期回顾性能参数，无重大变化时，性能验证可以回顾性分析来替代。