



# 中华人民共和国国家计量技术规范

JJF xxxx—202x

## 微生物快速浓缩仪校准规范

Calibration Specification for Microbial Rapid Concentration Instruments

(征求意见稿)

×××× - ×× - ×× 发布

×××× - ×× - ×× 实施

国家市场监督管理总局 发布

# 微生物快速浓缩仪校准规范

JJF xxxx—202x

## Calibration Specification for Microbial Rapid

### Concentration Instruments

---

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：

参加起草单位：

本规范委托全国生物计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

参加起草人：

全国生物计量技术委员会

# 目 录

引言	(II)
1 范围	(1)
2 引用文件	(1)
3 术语和计量单位	(1)
3.1 菌落计数单位	(1)
4 概述	(1)
5 计量特性	(1)
5.1 液体流量重复性	(1)
5.2 细菌回收率和回收率的重复性	(1)
5.3 病毒回收率和回收率的重复性	(1)
6 校准条件	(1)
6.1 环境条件	(1)
6.2 测量标准及其他设备	(2)
7 校准项目和校准方法	(2)
7.1 校准前检查与准备	(2)
7.2 液体流量重复性	(2)
7.3 细菌回收率和回收率的重复性	(3)
7.4 病毒回收率和回收率的重复性	(4)
8 校准结果表达	(5)
8.1 校准结果处理	(5)
8.2 校准结果的测量不确定度	(5)
9 复校时间间隔	(5)
附录 A 培养基和试剂	(6)
附录 B 校准原始记录参考格式	(7)
附录 C 校准证书内页格式(推荐)	(8)
附录 D 测量结果不确定度评定示例	(9)

# 引 言

JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001《通用计量术语及定义》和 JJF 1059.1《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。

校准方法及计量特性的选择等主要参考了 GB4789.10-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、WS/T 799-2022《污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准》。

本规范为首次发布。

# 微生物快速浓缩仪校准规范

## 1 范围

本规范适用于滤膜型和滤柱型液态微生物快速浓缩仪的校准。

## 2 引用文件

本规范引用了下列文件：

GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

WS/T 799-2022 污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准

注：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 术语和计量单位

### 3.1 菌落计数单位 colony forming unit; CFU

指在活菌培养计数时，由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落，称为菌落形成单位，以其表达活菌的数量。

## 4 概述

微生物快速浓缩仪（以下简称浓缩仪）一般分为滤膜型浓缩仪和滤柱性浓缩仪两类。

滤膜型浓缩仪是将适当孔径的滤膜放入过滤器，过滤液态样品，将样品中的微生物滞留在滤膜表面，从而达到富集的目的。

滤柱型浓缩仪是基于一次性浓缩柱加湿泡沫洗脱技术，快速有效的浓缩大体积液体生物样品，并洗脱到适合后续检测分析的小体积样液。

浓缩仪的构造一般是由洗脱液模块、高效过滤模块、蠕动泵和废液系统等组成。

## 5 计量特性

### 5.1 液体流量重复性

### 5.2 细菌回收率和回收率的重复性

### 5.3 病毒回收率和回收率的重复性

注：相关计量特性范围请参考厂家提供的说明书中的技术指标要求。

## 6 校准条件

### 6.1 环境条件

#### 6.1.1 环境温度：(10~30)℃；

#### 6.1.2 相对湿度：不大于 85%。

注：上述条件与制造商的产品规定不一致时，以产品规定为准。

## 6.2 测量标准及其他设备

6.2.1 金黄色葡萄球菌平板计数标准物质或国家批准的其他符合技术要求的细菌计数有证标准物质，菌落数量值 $\geq 5 \times 10^1$  CFU，相对扩展不确定度不大于30%（ $k=2$ ）；新型冠状病毒全序列假病毒RNA标准物质。

注：需在一定生物安全防护条件下操作。

6.2.2 移液器：（10~100） $\mu\text{L}$ ，（100~1000） $\mu\text{L}$ 各1支，经检定合格。

6.2.3 电子天平：分度值不大于 0.1 mg，①级。

6.2.4 秒表：最大允许误差  $\pm 0.1$  s/h。

6.2.5 恒温培养箱： $37^\circ\text{C} \pm 1.0^\circ\text{C}$ 。

6.2.3 荧光定量PCR仪。

6.2.4 生物安全柜。

6.2.5 高压蒸汽灭菌锅。

6.2.6 离心管：15 mL，无菌。

6.2.7 无菌水。

## 7 校准项目和校准方法

### 7.1 校准前检查与准备

浓缩仪应具有名称、型号、制造厂、出厂编号等标识。各部件齐全连接良好，各旋钮及按键应能正常工作，无影响使用性能的缺陷。

### 7.2 液体流量重复性

将 100 mL（或根据浓缩仪浓缩体积范围）无菌水注入一个空烧杯（或浓缩仪自带的容器），将排水口通至另一个预先称重过的空烧杯  $m_0$ ，同时启动秒表和浓缩仪，待抽取完毕后，停止计时，用天平称量烧杯和无菌水的总质量  $m$ ，计算得出仪器流量实测值  $Q_m$ 。重复测量 6 次，按照公式（1）和公式（2）计算得到液体流量重复性  $S_r$ ，重复性以单次测量的相对实验标准偏差表示。

$$Q_m = \frac{m - m_0}{\rho \times t} \quad (1)$$

$$S_r = \frac{1}{\bar{Q}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Q_i - \bar{Q})^2}{(n-1)}} \times 100\% \quad (2)$$

式中： $Q_m$ ——液体流量实测值，mL/s；

$m$ ——烧杯和无菌水的总质量，g；

$m_0$ ——空烧杯质量，g；

$\rho$ ——试验温度下水的密度，g/mL；

$t$ ——收集液体的时间，s；

$\bar{Q}$ ——液体流量 6 次测量值的平均值，mL/s；

$Q_i$ ——第  $i$  次测量，液体流量的测量值，mL/s；

$S_r$ ——流量重复性，%；

$n$ ——测量次数。

### 7.3 细菌回收率和回收率的重复性

在生物安全柜中，将已知浓度的金黄色葡萄球菌平板计数标准物质（或其他符合技术要求的细菌计数标准物质）加入到 100 mL（或根据浓缩仪浓缩体积范围）无菌水中，混合摇匀。打开浓缩仪进行浓缩，取 0.1 mL 浓缩液加入到培养皿里，用涂布棒涂布均匀，在  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养 48 h。设置 3 个平行组。对 3 个平行组皿里的菌落进行计数，计算平均值计为  $C_b$ 。按公式（3）计算细菌回收率。重复测量 3 次，按公式（4）用极差法计算得到细菌回收率的重复性  $H_b$ 。

$$R_b = \frac{C_b \times V_b}{C_{b0} \times V_{b0}} \times 100\% \quad (3)$$

式中： $R_b$ ——细菌回收率，%；

$C_b$ ——浓缩液中细菌的浓度，CFU/mL；



$V_b$ ——浓缩液的体积，mL；

$C_{b0}$ ——加入细菌液体中细菌的浓度 CFU/mL；

$V_{b0}$ ——加入细菌液体的体积，mL。

$$H_b = \frac{H_{b\max} - H_{b\min}}{C_n} \quad (4)$$

式中： $H_b$ ——细菌回收率的重复性，%；

$H_{b\max}$  ——细菌回收率测量结果中的最大值，%；

$H_{b\min}$  ——细菌回收率测量结果中的最小值，%；

$C_n$ ——极差系数， $C_3=1.77$ 。

#### 7.4 病毒回收率和回收率的重复性

将已知浓度的新型冠状病毒全序列假病毒 RNA 标准物质加入到 100 mL（或根据浓缩仪浓缩体积范围）无菌水中，混合摇匀。打开浓缩仪进行浓缩，按照病毒核酸提取试剂盒说明，取适量浓缩液进行核酸提取，提取完成后应立即封盖并马上进行实时荧光定量 PCR 检测。按公式（5）计算病毒回收率。重复测量 3 次，按公式（6）用极差法计算得到病毒回收率的重复性  $H_v$ 。

$$R_v = \frac{C_v \times V_v}{C_{v0} \times V_{v0}} \times 100\% \quad (5)$$

式中： $R_v$ ——病毒回收率，%；

$C_v$ ——浓缩液中病毒的浓度，copies/mL；

$V_v$ ——浓缩液的体积，mL；

$C_{v0}$ ——加入病毒液体中病毒的浓度 copies/mL；

$V_{v0}$ ——加入病毒液体的体积，mL。

$$H_v = \frac{H_{v\max} - H_{v\min}}{C_n} \quad (6)$$

式中： $H_v$ ——病毒回收率的重复性，%；

$H_{v\max}$  ——病毒回收率测量结果中的最大值，%；

$H_{v\min}$  ——病毒回收率测量结果中的最小值，%；

$C_n$ ——极差系数， $C_3=1.77$ 。

## 8 校准结果表达

### 8.1 校准结果处理

经校准后的浓缩仪应核发校准证书，校准证书应符合 JJF 1071—2010 中 5.12 的要求，并给出各校准项目名称和测量结果以及扩展不确定度。校准原始记录格式（推荐性表格）见附录 D，校准证书内页格式（推荐性表格）见附录 E。

### 8.2 校准结果的测量不确定度

浓缩仪校准结果的测量不确定度按 JJF 1059.1—2012 的要求评定，校准结果测量不确定度评定示例见附录 F。

## 9 复校时间间隔

浓缩仪复校准间隔建议一般不超过 1 年。由于复校时间间隔的长短是由浓缩仪的使用情况、使用者、浓缩仪本身质量等诸因素所决定的，因此，送校单位可根据实际使用情况自主决定复校时间间隔。

## 附录 A

### 培养基和试剂

#### A.1 无菌水

取适量蒸馏水，121 °C高压灭菌 15 min。

#### A.2 Baird-Parker 琼脂平板

##### A.2.1 成分

胰蛋白胨 10.0 g

牛肉膏 5.0 g

酵母膏 1.0 g

丙酮酸钠 10.0 g

甘氨酸 12.0 g

氯化锂(LiCl·6H<sub>2</sub>O) 5.0 g

琼脂 20.0 g

蒸馏水 950 mL

##### A.2.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与通过 0.22 μm 孔径滤膜进行过滤除菌的 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合，保存于冰箱内。

##### A.2.3 制法

将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，调节 pH 至 7.0±0.2。分装每瓶 95 mL，121 °C高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50 °C，每 95 mL 加入预热至 50 °C 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

## 附录 B

## 校准原始记录格式

(推荐性表格)

仪器名称			型号规格	
制造厂商			出厂编号	
委托单位	名称		联系人	
	地址		电话	
温度			湿度	
校准日期			证书编号	
记录编号			标准物质编号	
校准员			核验员	

## 1 液体流量重复性

次数 $n$	空烧杯质量 $m_0$ (g)	烧杯和无菌水总质量 $m$ (g)	液体收集时间 $t$ (s)	流量测定值 $Q_m$ (mL/s)	流量平均值 $\bar{Q}_m$ (mL/s)	流量重复性 $S_r$ (%)
1						
2						
3						

## 2 细菌回收率和回收率的重复性

样品编号	菌落数 (CFU)			平均值 (CFU/mL)	浓缩后的体积 (mL)	加入菌液的浓度 (CFU/mL)	加入菌液的体积 (mL)	细菌回收率 (%)	细菌回收率平均值 (%)	细菌回收率的重复性 (%)
	平行 1	平行 2	平行 3							
B-1										
B-2										
B-3										

## 3 病毒回收率和回收率的重复性

样品编号	浓缩液中病毒的浓度 (copies/mL)			平均值 (copies/mL)	浓缩后的体积 (mL)	加入病毒的浓度 (copies/mL)	加入病毒液的体积 (mL)	病毒回收率 (%)	病毒回收率平均值 (%)	病毒回收率的重复性 (%)
	平行 1	平行 2	平行 3							
V-1-1										
V-1-2										
V-1-3										

## 附录 C

## 校准证书内页格式

(推荐性表格)

序号	校准项目	校准结果
1	液体流量重复性	
2	细菌回收率	
3	细菌回收率的重复性	
4	病毒回收率	
5	病毒回收率的重复性	

校准员：\_\_\_\_\_ 核验员：\_\_\_\_\_

## 附录 D

## 测量不确定度评定示例

## D.1 细菌回收率测量结果不确定度评定

## D.1.1 测量方法

在生物安全柜中，将已知浓度的金黄色葡萄球菌平板计数标准物质加入到 100 mL 无菌水中，混合摇匀。打开浓缩仪进行浓缩，取 0.1 mL 浓缩液加入到培养皿里，用涂布棒涂布均匀，在  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养 48 h。设置 3 个平行组。对 3 个平行组皿里的菌落进行计数，计算平均值计为  $C_b$ 。按公式 (D.1) 计算细菌回收率。

## D.1.2 测量模型

$$R_b = \frac{C_b \times V_b}{C_{b0} \times V_{b0}} \times 100\% \quad (\text{D.1})$$

式中： $R_b$ ——细菌回收率，%；

$C_b$ ——浓缩液中细菌的浓度，CFU/mL；

$V_b$ ——浓缩液的体积，mL；

$C_{b0}$ ——加入细菌液体中细菌的浓度 CFU/mL；

$V_{b0}$ ——加入细菌液体的体积，mL。

## D.1.3 合成标准不确定度计算公式

依据不确定度传播率，当各输入量间不相关时，有：

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^n c^2(x_i) u^2(x_i) \quad (\text{D.2})$$

则

$$u_c = \sqrt{c_{C_b}^2 u_{C_b}^2 + c_{V_b}^2 u_{V_b}^2 + c_{C_{b0}}^2 u_{C_{b0}}^2 + c_{V_{b0}}^2 u_{V_{b0}}^2} \quad (\text{D.3})$$

由公式 (D.1) 可得

$$c_{C_b} = \frac{\partial R_b}{\partial C_b} = \frac{V_b}{C_{b0} \times V_{b0}} \quad (\text{D.4})$$

$$c_{V_b} = \frac{\partial R_b}{\partial V_b} = \frac{C_b}{C_{b0} \times V_{b0}} \quad (\text{D.5})$$

$$c_{C_{b0}} = \frac{\partial R_b}{\partial C_{b0}} = -\frac{C_b \times V_b}{C_{b0}^2 \times V_{b0}} \quad (D.6)$$

$$c_{V_b} = \frac{\partial R_b}{\partial V_b} = -\frac{C_b \times V_b}{C_{b0} \times V_{b0}^2} \quad (D.7)$$

#### D.1.4 不确定度来源

不确定度来源主要包括：

- a) 输入量  $C_b$  引入的标准不确定度  $u_{C_b}$ ；
- b) 输入量  $V_b$  引入的不确定度  $u_{V_b}$ ；
- c) 输入量  $C_{b0}$  引入的标准不确定度  $u_{C_{b0}}$ ；
- d) 输入量  $V_{b0}$  引入的不确定度  $u_{V_{b0}}$ 。

#### D.1.5 标准不确定度分量评定

##### D.1.5.1 输入量 $C_b$ 引入的标准不确定度 $u_{C_b}$ 评定

输入量  $C_b$  引入的标准不确定度  $u_{C_b}$  主要来源于重复测量和量取 0.1 mL 浓缩液引入的不确定度。

选一台浓缩仪，按照 D.1.1 的测量方法测量 3 组，每组重复测量 6 次，对重复测量结果进行分析，测量结果见表 D.1。

表 D.1 浓缩液中细菌浓度测定结果

测量次数	测量结果 (CFU/mL)					
	1	2	3	4	5	6
1	560	510	620	440	500	460
2	840	830	820	800	810	710
3	1210	990	1180	1080	1110	980

合并样本标准偏差  $s_p$  按公式 (D.8) 计算：

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (C_{kj} - \bar{C}_j)^2}{m(n-1)}} \quad (D.8)$$

式中：

$m$ ——测量次数；

$n$ ——每次测量设置的平行组数量；

$c_{kj}$ ——第  $j$  个测量点第  $k$  次的测量值，%；

$\bar{c}_j$ ——第  $j$  个测量点测量值的算术平均值，%。

通过公式（D.8）计算出合并样本标准偏差如下：

$$s_p = 23.3 \text{ CFU/mL}$$

由于每组重复测量 3 次（ $n=3$ ），因此重复测量引入的不确定度分量  $u_1$  为：

$$u_1 = \frac{s_p}{\sqrt{n}} = \frac{23.3}{\sqrt{3}} = 13.5 \text{ CFU/mL}$$

量取 0.1 mL 浓缩液使用的移液器的扩展不确定度为 2.0  $\mu\text{L}$ ， $k=2$ ，按矩形分布计算，则

$$u_2 = \frac{2.0}{2 \times \sqrt{3}} = 0.6 \mu\text{L}$$

综上，输入量  $C_b$  引入的标准不确定度  $u_{C_b}$  为：

$$u_{C_b} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{13.5^2 + 0.6^2} = 13.5 \text{ CFU/mL}$$

#### D.1.5.2 输入量 $V_b$ 引入的不确定度 $u_{V_b}$ 评定

使用的移液器的扩展不确定度为 3.4  $\mu\text{L}$ ， $k=2$ ，按矩形分布计算，则

$$u_{V_b} = \frac{3.4}{2 \times \sqrt{3}} = 1.0 \mu\text{L}$$

#### D.1.5.3 输入量 $C_{b0}$ 引入的标准不确定度 $u_{C_{b0}}$ 评定

输入量  $C_{b0}$  引入的标准不确定度  $u_{C_{b0}}$  主要来源于细菌计数标准物质引入的不确定度。本实验采用的金黄色葡萄球菌平板计数标准物质菌含量为  $2.1 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$ ，扩展不确定度为  $0.6 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$ ， $k=2$ ，故其标准不确定度为：

$$u_{C_{b0}} = \frac{0.6 \times 10^3}{2} = 300 \text{ CFU/mL}$$

#### D.1.5.4 输入量 $V_{b0}$ 引入的标准不确定度 $u_{V_{b0}}$ 评定

使用的移液器的扩展不确定度为 3.4  $\mu\text{L}$ ， $k=2$ ，按矩形分布计算，则

$$u_{V_b} = \frac{3.4}{2 \times \sqrt{3}} = 1.0 \mu\text{L}$$

#### D.1.5.5 灵敏系数的计算

$$c_{C_b} = \frac{\partial R_b}{\partial C_b} = \frac{V_b}{C_{b0} \times V_{b0}} = \frac{2.35}{2100 \times 1} = 1.1 \times 10^{-3} (\text{CFU/mL})^{-1}$$



$$c_{V_b} = \frac{\partial R_b}{\partial V_b} = \frac{C_b}{C_{b0} \times V_{b0}} = \frac{803}{2100 \times 1} = 0.4(\text{mL})^{-1}$$

$$c_{C_{b0}} = \frac{\partial R_b}{\partial C_{b0}} = -\frac{C_b \times V_b}{C_{b0}^2 \times V_{b0}} = -\frac{803 \times 2.35}{2100^2 \times 1} = -4.3 \times 10^{-4}(\text{CFU/mL})^{-1}$$

$$c_{V_{b0}} = \frac{\partial R_b}{\partial V_{b0}} = -\frac{C_b \times V_b}{C_{b0} \times V_{b0}^2} = -\frac{803 \times 2.35}{2100 \times 1^2} = -0.9(\text{mL})^{-1}$$

#### D.1.6 标准不确定度分量一览表

标准不确定度一览表见表 D.2。

表 D.2 细菌回收率测定结果标准不确定度一览表

不确定度来源	标准不确定度分量 $u(x_i)$	灵敏系数 $c_i$	$ c_i \times u(x_i) $
$C_b$	13.5 CFU/mL	$1.1 \times 10^{-3}(\text{CFU/mL})^{-1}$	0.01485
$V_b$	1.0 $\mu\text{L}$	$0.4(\text{mL})^{-1}$	0.0004
$C_{b0}$	300 CFU/mL	$-4.3 \times 10^{-4}(\text{CFU/mL})^{-1}$	0.129
$V_{b0}$	1.0 $\mu\text{L}$	$-0.9(\text{mL})^{-1}$	0.0009

#### D.1.7 合成标准不确定度 $u_c$

由公式 (D.3) 可得合成标准不确定度  $u_c$  为：

$$u_c = \sqrt{c_{C_b}^2 u_{C_b}^2 + c_{V_b}^2 u_{V_b}^2 + c_{C_{b0}}^2 u_{C_{b0}}^2 + c_{V_{b0}}^2 u_{V_{b0}}^2} = 13\%$$

#### D.1.8 扩展不确定度 $U$

取包含因子  $k=2$ ，则扩展不确定度  $U$  为：

$$U = k \times u_c = 26\%$$

### D.2 病毒回收率测量结果不确定度评定

#### D.2.1 测量方法

将已知浓度的新型冠状病毒全序列假病毒 RNA 标准物质加入到 100 mL（或根据浓缩仪浓缩体积范围）水中，混合摇匀。打开浓缩仪进行浓缩，按照病毒核酸提取试剂盒说明，取适量浓缩液进行核酸提取，提取完成后应立即封盖并马上进行实时荧光定量 PCR 检测。按公式 (D.9) 计算病毒回收率。

#### D.2.2 测量模型

$$R_v = \frac{C_v \times V_v}{C_{v0} \times V_{v0}} \times 100\% \quad (D.9)$$

式中： $R_v$ ——病毒回收率，%；

$C_v$ ——浓缩液中病毒的浓度，copies/mL；

$V_v$ ——浓缩液的体积，mL；

$C_{v0}$ ——加入病毒液体中病毒的浓度 copies/mL；

$V_{v0}$ ——加入病毒液体的体积，mL。

### D.2.3 合成标准不确定度计算公式

依据不确定度传播率，当各输入量间不相关时，有：

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^n c^2(x_i) u^2(x_i) \quad (D.10)$$

则

$$u_c = \sqrt{c_{C_v}^2 u_{C_v}^2 + c_{V_v}^2 u_{V_v}^2 + c_{C_{v0}}^2 u_{C_{v0}}^2 + c_{V_{v0}}^2 u_{V_{v0}}^2} \quad (D.11)$$

由公式（D.9）可得

$$c_{C_v} = \frac{\partial R_v}{\partial C_v} = \frac{V_v}{C_{v0} \times V_{v0}} \quad (D.12)$$

$$c_{V_v} = \frac{\partial R_v}{\partial V_v} = \frac{C_v}{C_{v0} \times V_{v0}} \quad (D.13)$$

$$c_{C_{v0}} = \frac{\partial R_v}{\partial C_{v0}} = -\frac{C_v \times V_v}{C_{v0}^2 \times V_{v0}} \quad (D.14)$$

$$c_{V_{v0}} = \frac{\partial R_v}{\partial V_{v0}} = -\frac{C_v \times V_v}{C_{v0} \times V_{v0}^2} \quad (D.15)$$

### D.2.4 不确定度来源

不确定度来源主要包括：

a) 输入量  $C_v$  引入的标准不确定度  $u_{C_v}$ ；

b) 输入量  $V_v$  引入的不确定度  $u_{V_v}$ ；

c) 输入量  $C_{v0}$  引入的标准不确定度  $u_{C_{v0}}$ ;

d) 输入量  $V_{v0}$  引入的不确定度  $u_{V_{v0}}$ 。

## D.2.5 标准不确定度分量评定

### D.2.5.1 输入量 $C_v$ 引入的标准不确定度 $u_{C_v}$ 评定

输入量  $C_v$  引入的标准不确定度  $u_{C_v}$  主要来源于重复测量和实时荧光定量 PCR 仪引入的不确定度。

选一台浓缩仪，按照 D.2.1 的测量方法重复测量 3 组，每组重复测量 6 次，对重复测量结果进行分析，测量结果见表 D.3。

表 D.3 浓缩液中病毒浓度测定结果

测量次数	测量结果 (copies/mL)					
	1	2	3	4	5	6
1	10125	8026	8535	9147	8804	8462
2	6233	6674	5821	6722	6199	6337
3	8712	8362	9652	8493	9048	8961

合并样本标准偏差  $s_p$  按公式 (D.16) 计算：

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (v_{kj} - \bar{v}_j)^2}{m(n-1)}} \quad (D.16)$$

式中：

$m$ ——测量次数；

$n$ ——每次测量设置的平行组数量；

$v_{kj}$ ——第  $j$  个测量点第  $k$  次的测量值，%；

$\bar{v}_j$ ——第  $j$  个测量点测量值的算术平均值，%。

通过公式 (D.16) 计算出合并样本标准偏差如下：

$$s_p = 172.4 \text{ copies/mL}$$

由于每组重复测量 3 次 ( $n=3$ )，因此重复测量引入的不确定度分量  $u_1$  为：

$$u_1 = \frac{s_p}{\sqrt{n}} = \frac{172.4}{\sqrt{3}} = 99.6 \text{ copies/mL}$$

实时荧光定量 PCR 仪的扩展不确定度为 10.3%， $k=2$ ，按矩形分布计算，则

$$u_2 = \frac{8017 \times 10.3\%}{2} = 413 \text{ copies/mL}$$

综上，输入量  $C_v$  引入的标准不确定度  $u_{C_v}$  为：

$$u_{C_v} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{99.6^2 + 413^2} = 425 \text{ copies/mL}$$

#### D.2.5.2 输入量 $V_v$ 引入的不确定度 $u_{V_v}$ 评定

使用的移液器的扩展不确定度为 3.4  $\mu\text{L}$ ， $k=2$ ，按矩形分布计算，则

$$u_{V_b} = \frac{3.4}{2 \times \sqrt{3}} = 1.0 \mu\text{L}$$

#### D.2.5.3 输入量 $C_{v0}$ 引入的标准不确定度 $u_{C_{v0}}$ 评定

输入量  $C_{v0}$  引入的标准不确定度  $u_{C_{v0}}$  主要来源于病毒标准物质引入的不确定度。

本实验采用的新型冠状病毒（2019-nCoV）全序列假病毒 RNA 标准物质标准值 173000 copies/mL，扩展不确定度为 75000 copies/mL， $k=2$ ，故其标准不确定度为：

$$u_{C_{v0}} = \frac{75000}{2} = 37500 \text{ copies/mL}$$

#### D.2.5.4 输入量 $V_{v0}$ 引入的标准不确定度 $u_{V_{v0}}$ 评定

使用的移液器的扩展不确定度为 2.0  $\mu\text{L}$ ， $k=2$ ，按矩形分布计算，则

$$u_{V_v} = \frac{2.0}{2 \times \sqrt{3}} = 0.6 \mu\text{L}$$

#### D.2.5.5 灵敏系数的计算

$$c_{C_v} = \frac{\partial R_v}{\partial C_v} = \frac{V_v}{C_{v0} \times V_{v0}} = \frac{1.99}{1.73 \times 10^5 \times 0.2} = 5.8 \times 10^{-5} (\text{copies/mL})^{-1}$$

$$c_{V_v} = \frac{\partial R_v}{\partial V_v} = \frac{C_v}{C_{v0} \times V_{v0}} = \frac{8017}{1.73 \times 10^5 \times 0.2} = 0.23 (\text{mL})^{-1}$$

$$c_{C_{v0}} = \frac{\partial R_v}{\partial C_{v0}} = -\frac{C_v \times V_v}{C_{v0}^2 \times V_{v0}} = -\frac{8017 \times 1.99}{173000^2 \times 0.2} = -2.7 \times 10^{-6} (\text{copies/mL})^{-1}$$

$$c_{V_{v0}} = \frac{\partial R_v}{\partial V_{v0}} = -\frac{C_v \times V_v}{C_{v0} \times V_{v0}^2} = -\frac{8017 \times 1.99}{1.73 \times 10^5 \times 0.2^2} = -2.3 (\text{mL})^{-1}$$

#### D.2.6 标准不确定度分量一览表

标准不确定度一览表见表 D.4。

表 D.4 病毒回收率测定结果标准不确定度一览表

不确定度来源	标准不确定度分量 $u(x_i)$	灵敏系数 $c_i$	$ c_i \times u(x_i) $
$C_v$	425 copies/mL	$5.8 \times 10^{-5} (\text{copies/mL})^{-1}$	0.0247
$V_v$	1.0 $\mu\text{L}$	$0.23 (\text{mL})^{-1}$	0.00023
$C_{v0}$	37500 copies/mL	$-2.7 \times 10^{-6} (\text{copies/mL})^{-1}$	0.101
$V_{v0}$	0.6 $\mu\text{L}$	$-2.3 (\text{mL})^{-1}$	0.00138

D.2.7 合成标准不确定度  $u_c$ 

由公式 (D.11) 可得合成标准不确定度  $u_c$  为：

$$u_c = \sqrt{c_{C_v}^2 u_{C_v}^2 + c_{V_v}^2 u_{V_v}^2 + c_{C_{v0}}^2 u_{C_{v0}}^2 + c_{V_{v0}}^2 u_{V_{v0}}^2} = 10.4\%$$

D.2.8 扩展不确定度  $U$ 

取包含因子  $k=2$ ，则扩展不确定度  $U$  为：

$$U = k \times u_c = 21\%$$