
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》

实验报告

(征求意见稿)

2024年01月

实验报告

一、 实验目的

验证《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》的适用性和可行性。

二、 实验地点

验证实验在北京金域医学检验实验室、江苏硕世生物科技有限公司、中国计量科学研究院完成。

三、 环境条件

25°C, 30% RH (相对湿度)

四、 实验仪器与实验设计

实验仪器：ABI7500 实时荧光 PCR 仪，厂家：赛默飞

实验设计

4.1 定量检测系统性能验证

4.1.1 正确度验证

使用高值和低值标准物质，每批重复测定 2 次，连续测定 5 个批次，记录检测结果，计算全部检测结果的均值，比较检测均值与参考值的偏倚。

评判标准：根据试剂盒说明书。

4.1.2 精密度验证

使用标准物质或病毒样品高值和低值各 1 例，共检测 5 个批次，每个批次将这两个浓度的样品各重复进行 4 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 20 个数据，计算浓度值的 LOG 值的 CV 值，考察实验室的精密度。

评判标准：根据试剂盒说明书。

4.1.3 线性验证

将高浓度样品用阴性血清样品依次向下 10 倍梯度稀释 5 个浓度，每个浓度样品重复检测 3 次，计算均值，将均值和理论值做线性回归分析（y 为理论值，x 为实测均值），得出线性回归方程 $y=a+bx$ 和相关系数 r^2 。

评判标准： r^2 大于 0.98。

4.2 定性检测系统性能验证

4.2.1 符合性验证

采用卫生部室间质评的样品 15 例，使用病毒核酸检测试剂进行检测。

评判标准：符合率要求 100%。

4.2.2 精密度验证

使用标准物质或病毒样品弱阳性和阴性样品各 1 例，共检测 5 个批次，每个批次将这两个水平的样品各重复进行 4 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 20 个数据，计算 CT 值的 CV 值，考察实验室的精密度。

评判标准：根据试剂盒说明书。

4.2.3 检出限验证

将标准物质稀释至试剂盒声称的检出限，同一批次重复检测 5 次。

评判标准：5 次检测，必须 100% 检出靶核酸。

4.2.4 交叉反应验证

分别取不含靶核酸的非目标病原体的样品各 1 例，用目标病原体核酸检测试剂盒检测，每个样品重复检测三次。

评判标准：检测结果均为阴性。

4.2.5 抗干扰能力验证

将阳性样品分为两组，一组为实验组，另一组为对照组。实验组分别加入总胆红素（300 μ mol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）对照组加入等体积的生理盐水，同时进行检测，每个样品重复检测 3 次。

评判标准：实验组 3 次检测结果均为阳性。

4.3 定量检测系统性能确认

4.3.1 正确度

4.3.1.1 偏倚评估

选择合适的核酸定量标准物质，制备成 2 个浓度水平的样品（代表方法可报告范围中高、低的决定性浓度）。每天对每个浓度水平的标准物质重复测定 2 次，连续测定 5 天，记录结果，计算全部结果的均值，计算偏倚。绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级。

4.3.1.2 回收试验

在天然阳性样品中加入一定体积的已知浓度标准物质制成高值水平样品、低值水平样品。每个样品重复测定 3 次，计算回收率。回收率在 85%~115%范围内确认为该检测系统可用于正常检测。

4.3.2 精密度

在重复性条件下，采用核酸标准物质（一般包括高、低两个浓度，其中之一接近决定性水平），连续测定 5 天，每天一个分析批，每批两个浓度水平，每个浓度水平重复测定 5 次。根据相应公式计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (S_l)，批内精密度 (CV%)、批间精密度 (CV%)、实验室内精密度 (CV%)。

4.3.3 测量不确定度

采用企业定量参考品重复检测 5 次，计算实验室内复现性引入的测量不确定度。采用有证标准物质，重复检测 5 次，计算偏倚引入的测量不确定度。最后按相应公式计算合成标准不确定度和扩展不确定度。

4.3.4 分析特异性

4.3.4.1 交叉反应

使用不含目标序列的核酸样品、分析物的结构类似物、具有同源性序列的核酸片段、检测范围外的型别等物质对交叉反应进行确认，制备 $3\times LoD$ 浓度水平阳性样品以及阴性样品，加入相应浓度的交叉，重复测试 3 次，对交叉情况进行确认。评判标准：阴性样品的检测结果为阴性， $3\times LoD$ 阳性样品全部检出，即为无交叉反应发生。

4.3.4.2 干扰实验

选择相应的干扰物质，确定干扰物质研究浓度。制备 $3\times LoD$ 浓度水平阳性样品，每个样品实验组和对照组均重复测试 3 次。采用配对比对的方式，比较添加（实验组）与未添加（对照组）相应浓度干扰物质的样品检测结果的差异。评判标准：实验组和对照组的偏倚值 $< 10\%$ ，即为干扰物质不影响试剂检测性能。

4.3.5 灵敏度

采用 PCR 检测系统同批次分析二个已知浓度水平的样品 C1（高值）、C2（低值），每个样品测量 3 次，3 次测定响应信号值代表该物质的响应值，样品 C1、C2 响应值差 (ΔCT) 除以 C1、C2 浓度差即为检测系统的灵敏度。

4.3.6 线性范围

使用已知浓度的企业参考品，进行 10 倍系列稀释得到 6 个梯度浓度的参考品，每个样品重复 3 次，计算均值，将均值和理论值做线性回归分析（ y 为理论值， x 为实测均值），得出线性回归方程 $y=a+bx$ 和相关系数 r^2 。评判标准：标准曲线的 r^2 值大于 0.98。

4.3.7 检出限

将已知浓度的标准物质梯度稀释 5 个浓度梯度，每个浓度重复检测 3 次，记录 3 次重复均能检出的最低浓度为 C_y 。再将 10 倍 C_y 浓度（标记为 $10C_y$ ）的样品分别稀释至浓度 $10C_y$ 、 $3.16C_y$ 、 C_y 、 $C_y/3.16$ 、 $C_y/10$ ，每个浓度重复检测 10 次，将得到的数据进行 Probit 分析，95%阳性检出率对应的测量浓度即为 LoD。

4.3.8 定量限

将已知浓度的标准物质梯度稀释 5 个浓度，每个浓度重复检测 20 次。统计分析每个浓度水平在 20 次重复检测中的阳性检出率及定量检测结果与理论浓度对数的绝对偏差，将多次测量结果的绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级的浓度水平作为定量限。

4.4 定性检测系统性能确认

4.4.1 符合性

采用已知的靶病原体样品 15 例，使用目标病原体核酸检测试剂进行检测评估。

4.4.2 精密度确认

以检测系统的复现性来确认精密度。由不同操作者进行同一样品的检测，持续 20 天，至少包含 3 个浓度水平：阴性样品、弱阳性样品和阳性样品。3 个样品测量结果的变异不影响最终结果的判读。批内、批间和实验室内检出结果 CT 值的变异系数 CV 值均 $\leq 5\%$ ；阳性检出率均为 100%；阴性符合率为 100%。

4.4.3 分析特异性

4.4.3.1 交叉反应确认

分别采用非靶病原体的强阳样品各 1 例，每个样品重复检测三次；分别将非靶病原体与靶病原体样品进行混合，混合后非靶病原体为强阳，靶病原体样品为 3LoD。

交叉反应确认标准：非靶病原体强阳性样品阴性符合率为 100%，检测非靶病原体与靶病原体混合样品阳性检出率为 100%；确认上述病原体与该试剂盒不存在交叉且无干扰。

4.4.3.2 抗干扰能力确认

将病毒检测结果为中强阳性、临界阳性（3LoD）和阴性的样品分为两组，一组为实验组，另一组为对照组。实验组分别加入总胆红素（300 μ mol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）；对照组加入等体积的生理盐水，同时用 3 批试剂进行检测，每个样品重复检测 3 次。

抗干扰能力确认标准：中强阳样品实验组和对照组阳性检出率为 100%，且实验组和对照组检测结果 CT 值平均值绝对偏差 \leq 1；弱阳实验组和对照组阳性检出率均为 100%；实验组和对照组阴性符合率均为 100%。

4.4.4 检出限确认

将标准物质稀释至 100000 copies/mL、10000 copies/mL、1000 copies/mL、500 copies/mL 和 250 copies/mL，用同一批次重复检测 3 次。确定 3 次重复均能检出的最低浓度为 C_y ，再将 10 倍 C_y 浓度（标记为 10 C_y ）的样品分别稀释至浓度 10 C_y 、3.16 C_y 、 C_y 、 $C_y/3.16$ 、 $C_y/10$ ，每个浓度重复检测 10 次，将得到的数据进行 Probit 分析，95%阳性检出率对应的测量浓度即为 LoD。

五、 测量标准及其他设备

使用的标准物质：人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）RNA 标准品，批号：220021-20160101（浓度：130,000 IU/mL）；乙肝病毒核酸国家标准品（批号 300022-201601，浓度 1.0 E+08 IU/mL）。

六、 实验结果

6.1 定量检测性能验证

6.1.1 巨细胞病毒核酸定量检测系统验证

项目：巨细胞病毒核酸定量检测			
验证依据： 本技术规范			
1.检测系统概述：			
检测方法	PCR-荧光探针法	检测日期	2023.05.11
检测设备	ABI7500 实时荧光 PCR 仪，厂家：赛默飞		

检测试剂 人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒（PCR-荧光探针法），圣湘，23001

2.性能验证指标

2.1 正确度： 偏倚 $< \pm 7.5\%$

2.2 精密度： 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均 $\leq 5\%$

2.3 线性： 在 $2.83E+02$ copies/mL 至 $4.09E+07$ copies/mL 范围内线性关系 $R^2 \geq 0.98$

3.验证方法及判断

3.1 正确度验证

使用圣湘标准品 B（高值）和 D（低值），每批重复测定 2 次，连续测定 5 个批次，记录检测结果，计算全部检测结果的均值，比较检测均值与参考值的偏倚。

评判标准：偏倚 $< \pm 7.5\%$ 。

样品	B（高值）		D（低值）	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
1	4.21E+6	4.81E+6	3.09E+4	3.76E+4
2	4.40E+6	4.76E+6	3.99E+4	3.66E+4
3	4.51E+6	4.58E+6	4.10E+4	4.33E+4
4	5.18E+6	5.69E+6	5.34E+4	5.67E+4
5	4.56E+6	5.52E+6	2.91E+4	4.23E+4
均值	4.82E+06		4.11E+04	
LOG（均值）	6.68		4.61	
参考值	4.0E+06		4.0E+04	
LOG（参考值）	6.60		4.60	
偏倚	1.23%		0.25%	

评估总结：

圣湘标准品 B（高值）和 D（低值）的 5 个批次共 10 个检测数据的均值与参考值的偏倚均 $< \pm 7.5\%$ ，符合评判标准，验证通过。

3.2 精密度验证

使用巨细胞病毒样品高值和低值各 1 例，共检测 5 个批次，每个批次将这两个浓度的样品各重复进行 4 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 20 个数据，计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (S_l)，及对应的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)。

评判标准：批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均 $\leq 5\%$ 。

精密度结果统计表

批次	高值样品	浓度 (copies/mL)	对数值	低值样品	浓度 (copies/mL)	对数值
第一批	Rep1	4.04E+06	6.61	Rep1	3.55E+04	4.55
	Rep2	4.87E+06	6.69	Rep2	4.79E+04	4.68
	Rep3	4.19E+06	6.62	Rep3	4.34E+04	4.64
	Rep4	4.31E+06	6.63	Rep4	4.03E+04	4.61
第二批	Rep1	5.26E+06	6.72	Rep1	3.87E+04	4.59
	Rep2	4.32E+06	6.64	Rep2	4.71E+04	4.67
	Rep3	4.05E+06	6.61	Rep3	4.46E+04	4.65
	Rep4	4.06E+06	6.61	Rep4	5.17E+04	4.71

第三批	Rep1	5.18E+06	6.71	Rep1	5.67E+04	4.75
	Rep2	4.91E+06	6.69	Rep2	5.04E+04	4.7
	Rep3	5.08E+06	6.71	Rep3	5.39E+04	4.73
	Rep4	4.34E+06	6.64	Rep4	6.25E+04	4.8
第四批	Rep1	4.44E+06	6.65	Rep1	4.30E+04	4.63
	Rep2	4.18E+06	6.62	Rep2	5.03E+04	4.7
	Rep3	4.31E+06	6.63	Rep3	4.81E+04	4.68
	Rep4	6.85E+06	6.84	Rep4	4.55E+04	4.66
第五批	Rep1	5.79E+06	6.76	Rep1	4.55E+04	4.66
	Rep2	5.53E+06	6.74	Rep2	4.70E+04	4.67
	Rep3	4.65E+06	6.67	Rep3	5.73E+04	4.76
	Rep4	4.77E+06	6.68	Rep4	5.51E+04	4.74
批内标准差 (S_r)	4.15E+02			3.55E+01		
批间方差 (S_b^2)	3.06E+10			2.84E+06		
实验室内标准差 (S_l)	1.75E+05			1.69E+03		
批内精密度 (CV%)	0.01%			0.07%		
批间精密度 (CV%)	3.68%			3.50%		
实验室内精密度 (CV%)	3.68%			3.50%		

评估总结:

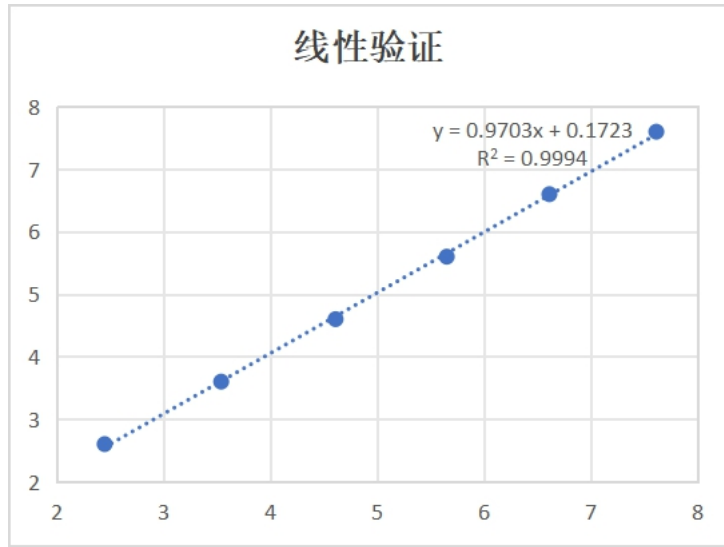
无论高值或低值的批内精密度 $CV \leq 5\%$, 批间精密度 $CV \leq 5\%$, 且实验室内精密度 CV 值均 $\leq 5\%$ 符合评判标准, 验证通过。

3.3 线性验证

将高浓度样品 (标准品 A: $4E+07$ copies/mL) 用阴性血清样品依次向下 10 倍梯度稀释 5 个浓度, 每个浓度样品重复检测 3 次, 计算均值, 将均值和理论值做线性回归分析 (y 为理论值, x 为实测均值), 得出线性回归 $y=a+bx$ 和相关系数 R^2 。

评判标准: 实验结果 $R^2 \geq 0.98$ 。

	E7	E6	E5	E4	E3	E2
重复 1	4.49E+07	3.85E+06	4.96E+05	3.72E+04	3.82E+03	2.44E+02
重复 2	4.03E+07	3.99E+06	4.48E+05	4.55E+04	3.53E+03	2.84E+02
重复 3	3.75E+07	4.43E+06	3.85E+05	3.82E+04	2.99E+03	3.20E+02
均值	4.09E+07	4.09E+06	4.43E+05	4.03E+04	3.45E+03	2.83E+02
对数值	7.61	6.61	5.65	4.61	3.54	2.45
理论值	7.60	6.60	5.60	4.60	3.60	2.60
偏倚	0.13%	0.15%	0.89%	0.22%	-1.67%	-5.77%



评估总结：

检测 CMV 阳性样品在 2.44E+02 copies/mL 至 4.49E+07 copies/mL 范围内线性关系 $R^2=0.9994 \geq 0.98$ ，试剂性能良好。已满足试剂盒最低线性范围（400 copies/mL）下限，线性范围评价合格。由线性范围评价，结合厂家声明的技术参数，可将该项目的检测下线定为 400copies/mL。线性范围验证通过。

4.总结

根据以上正确度、精密度、线性、检测系统比对和人员比对等验证结果，以此对巨细胞病毒核酸定量检测作出方法性能评价，在此次评价过程中未发现性能不接受的状况，说明该检测方法的分析性能能被接受，满足临床标本检测要求。

6.1.2 丙型肝炎病毒核酸定量检测系统验证

项目：丙型肝炎病毒（HCV-RNA）定量检测			
验证依据： 本技术规范			
1. 检测系统概述：			
检测方法	RT-PCR 荧光探针法	检测日期	2023.05.17
检测设备	ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪（JY113），厂家：ABI		
检测试剂	1.提取试剂： HCV 丙型肝炎病毒核酸测定量检测试剂盒（PCR -荧光探针法)-磁珠法核酸提取试剂，批号 23010； 2.扩增试剂：HCV 丙型肝炎病毒核酸测定量检测试剂盒（PCR -荧光探针法），批号 23010；		
验证时机	<input checked="" type="checkbox"/> 新开展项目 <input type="checkbox"/> 检测系统变更：更换检测设备 <input type="checkbox"/> 影响检验程序分析性能情况发生 <input type="checkbox"/> 其它		
2.性能验证指标：（依据试剂盒说明书）			
2.1 正确度： 偏倚 $< \pm 7.5\%$ 。			
2.2 精密度： 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均 $\leq 5\%$			

2.3 线性范围：线性相关参数 $R^2 > 0.995$ 。

3. 验证方法及判断：

4.1 正确度验证

验证方案：使用圣湘标准品 B（高值）和 D（低值），每批重复测定 2 次，连续测定 5 个批次，记录检测结果，计算全部检测结果的均值，比较检测均值与参考值的偏倚。

评判标准：偏倚 $< \pm 7.5\%$ 。

样品	B（高值）		D（低值）	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
1	3.30E+06	3.19E+06	4.03E+03	4.93E+03
2	4.27E+06	3.52E+06	2.87E+03	4.11E+03
3	3.38E+06	3.14E+06	4.45E+03	5.38E+03
4	3.28E+06	3.10E+06	3.76E+03	4.58E+03
5	3.19E+06	2.99E+06	4.96E+03	4.49E+03
均值	3.34E+06		4.37E+03	
LOG（均值）	6.52		3.64	
参考值	5.01E+06		5.01E+03	
LOG（参考值）	6.70		3.70	
偏倚	2.69%		1.62%	

评估总结：圣湘标准品 B（高值）和 D（低值）的 5 个批次共 10 个检测数据的均值与参考值的偏倚均 $< \pm 7.5\%$ ，符合评判标准，验证通过。

4.2 精密度验证

验证方案：使用丙肝病毒样品高值和低值各 1 例，共检测 5 个批次，每个批次将这两个浓度的样品各重复进行 4 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 20 个数据，计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (S_l)，及对应的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)。

评判标准：批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均 $\leq 5\%$ 。

项目名称/单位：丙型肝炎病毒（HCV-RNA）

检测设备：ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪

检测试剂：

1. 提取试剂：HCV 丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒（PCR - 荧光探针法）- 磁珠法核酸提取试剂，批号 23010；

2. 扩增试剂：HCV 丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒（PCR - 荧光探针法），批号 23010；

精密度扩增曲线：

精密度结果统计表					
高值样品	定量 (IU/mL)	对数值	低值样品	定量 (IU/mL)	对数值
第一批	5.26E+06	6.72	第一批	4.13E+03	3.62
	3.97E+06	6.6		4.79E+03	3.68
	3.86E+06	6.59		6.51E+03	3.81

	4.38E+06	6.64		7.00E+03	3.84
第二批	3.90E+06	6.59	第二批	4.43E+03	3.65
	1.96E+06	6.29		3.78E+03	3.58
	3.30E+06	6.52		5.51E+03	3.74
	5.21E+06	6.72		6.06E+03	3.78
第三批	3.92E+06	6.59	第三批	3.26E+03	3.51
	3.06E+06	6.49		4.59E+03	3.66
	3.85E+06	6.59		6.46E+03	3.81
	4.68E+06	6.67		5.83E+03	3.77
第四批	4.84E+06	6.68	第四批	3.99E+03	3.6
	2.89E+06	6.46		4.17E+03	3.62
	3.53E+06	6.55		4.22E+03	3.62
	4.23E+06	6.63		5.64E+03	3.75
第五批	4.54E+06	6.66	第五批	3.97E+03	3.6
	3.18E+06	6.5		4.04E+03	3.61
	3.58E+06	6.55		4.98E+03	3.7
	3.63E+06	6.56		6.35E+03	3.8
批内标准差 (S_r)	4.83E+02		1.75E+01	4.83E+02	
批间方差 (S_b^2)	2.14E+10		4.01E+04	2.14E+10	
实验室内标 准差 (S_i)	1.46E+05		2.01E+02	1.46E+05	
批内精密度 (CV%)	0.01%		0.35%	0.01%	
批间精密度 (CV%)	3.76%		4.02%	3.76%	
实验室内精 密度 (CV%)	3.76%		4.03%	3.76%	

评估总结：无论高值或低值的批内精密度 $CV \leq 5\%$ ，批间精密度 $CV \leq 5\%$ ，实验室内精密度 CV 值均 $\leq 5\%$ ，符合评判标准，验证通过。

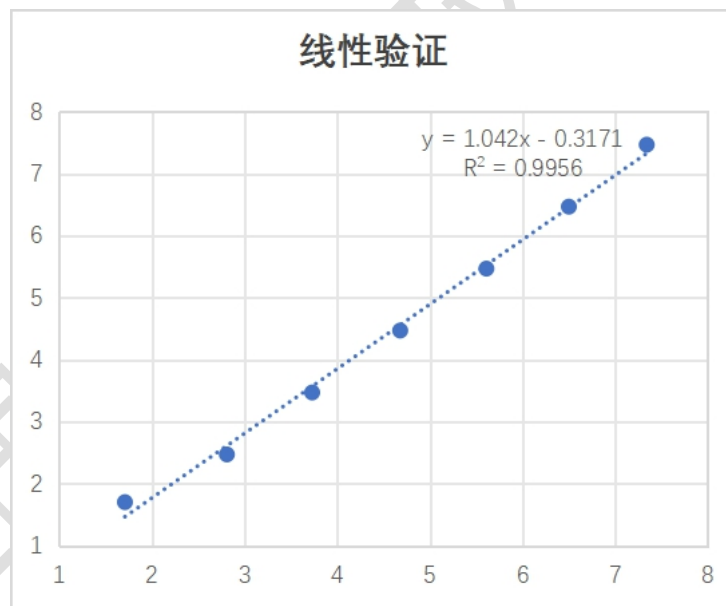
4.3 线性范围验证

验证方案：参考试剂说明书的线性范围为 $5.0E+01 \sim 1.0E+08$ IU/mL，综合临床需求，本次拟验证的线性范围为 $5.0E+01 \sim 1.0E+08$ IU/mL。故本次线性范围验证实验采用浓度为 $3.0E+08$ IU/mL 的厂家提供质控品，按 10 倍梯度稀释，每个样品检测 3 次，计算均值，将均值与理论值作线性回归分析（ x 为理论值， y 为实测均值），得出线性回归 $y=a+bx$ 和相关系数 R^2 。

接受标准：线性相关参数 $R^2 > 0.995$ 。

	E7	E6	E5	E4	E3	E2	E1 (50)
测试 1	2.18E+07	2.55E+06	3.76E+05	5.33E+04	5.49E+03	7.96E+02	4.08E+01
测试 2	2.59E+07	3.50E+06	3.46E+05	4.81E+04	5.44E+03	5.45E+02	4.17E+01
测试 3	1.79E+07	3.42E+06	5.05E+05	4.26E+04	5.22E+03	6.08E+02	7.19E+01
均值	2.19E+07	3.15E+06	4.09E+05	4.80E+04	5.39E+03	6.50E+02	5.15E+01
对数值	7.34	6.50	5.61	4.68	3.73	2.81	1.71
理论值	7.47	6.47	5.47	4.47	3.47	2.47	1.70

线性范围标准曲线:



评估总结：检测 HCV 阳性质控品在 5.0E+01 IU/mL~1.0E+08 IU/mL 范围内线性关系 $R^2=0.9956>0.995$ ，试剂性能良好。已满足试剂盒最低线性范围（50 IU/mL）下限，线性范围评价合格。由线性范围评价，结合厂家声明的技术参数，可将该项目的检测下线定为 50 IU/mL。线性范围验证通过。

验证结论：

根据对以上方法对正确度、精密度和线性范围的验证，以此对丙型肝炎病毒

(HCV-RNA)检测项目作出方法性能评价,在此次评价过程中未发现性能不可接受的情况,说明该检测方法的分析性能被接受,满足临床标本检测的要求。

6.1.3 乙型肝炎病毒核酸定量检测系统验证

项目: 乙肝病毒核酸定量检测				
验证依据: 本技术规范				
1.检测系统概述:				
检测方法	荧光 PCR 法		检测日期	2023.09.04~09.08
检测设备及编号	ABI7500 实时荧光 PCR 仪 (275053568)		厂家	赛默飞
检测试剂及批号	人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法), 23001		厂家	圣湘
2.性能验证指标				
2.1 正确度: 偏倚 $< \pm 7.5\%$				
2.2 精密度: 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室精密度(CV%)均 $\leq 5\%$				
2.3 线性: 在 $1 \times 10^2 \text{IU/mL} - 6.0 \times 10^8 \text{IU/mL}$ 范围内线性关系 $R^2 \geq 0.995$				
3.验证方法及判断				
3.1 正确度验证				
使用默乐乙型肝炎病毒核酸检测试剂检测两个浓度的康彻思坦标准物质 GBW(E)090137(浓度 S5)、GBW(E)090139(浓度 S2), 每个浓度每天检测两次, 连续检测五天, 结果取均值, 比较检测均值与参考值的偏倚。				
评判标准: 偏倚 $< \pm 7.5\%$ 。				
样品	S2 (低值)		S5 (高值)	
批次	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
1	3.17	3.16	6.51	6.46
2	3.27	3.32	6.65	6.59
3	3.22	3.23	6.54	6.49
4	3.17	3.18	6.60	6.53
5	3.19	3.20	6.60	6.52
均值	3.21		6.55	
参考值	3.15		6.66	
偏倚	1.90%		-1.65%	
评估总结:				
使用默乐乙型肝炎病毒核酸检测试剂检测两个浓度的康彻思坦标准物质,5 个批次各 10 个检测数据的均值与参考值的偏倚均 $< \pm 7.5\%$, 符合评判标准, 验证通过。				
3.2 精密度验证				
选取自留的 10^2 、 10^7IU/mL 两个浓度的临床样品, 作为重复性检测用样品, 每个浓度每天检测 4 次, 连续检测 5 天, 每个浓度共检测 20 次, 计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (S_l), 及对应的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)。				
评判标准: 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均 $\leq 5\%$ 。				

精密度结果统计表

批次	高值样品	定量(IU/mL)	对数值	低值样品	定量(IU/mL)	对数值
第一批	Rep1	1.15E+08	8.06	Rep1	7.24E+02	2.86
	Rep2	1.17E+08	8.07	Rep2	6.61E+02	2.82
	Rep3	1.17E+08	8.07	Rep3	6.76E+02	2.83
	Rep4	1.20E+08	8.08	Rep4	6.76E+02	2.83
第二批	Rep1	9.77E+07	7.99	Rep1	8.91E+02	2.95
	Rep2	9.33E+07	7.97	Rep2	9.12E+02	2.96
	Rep3	1.00E+08	8	Rep3	9.55E+02	2.98
	Rep4	9.91E+07	7.95	Rep4	7.08E+02	2.85
第三批	Rep1	9.08E+07	7.85	Rep1	6.92E+02	2.84
	Rep2	9.59E+07	7.88	Rep2	6.92E+02	2.84
	Rep3	8.71E+07	7.94	Rep3	7.76E+02	2.89
	Rep4	8.13E+07	7.91	Rep4	6.92E+02	2.84
第四批	Rep1	1.00E+08	8	Rep1	7.94E+02	2.9
	Rep2	9.71E+07	7.94	Rep2	7.41E+02	2.87
	Rep3	1.02E+08	8.01	Rep3	7.76E+02	2.89
	Rep4	9.55E+07	7.98	Rep4	6.17E+02	2.79
第五批	Rep1	9.33E+07	7.97	Rep1	7.94E+02	2.9
	Rep2	9.51E+07	7.93	Rep2	7.41E+02	2.87
	Rep3	9.55E+07	7.98	Rep3	7.76E+02	2.89
	Rep4	9.55E+07	7.98	Rep4	6.17E+02	2.79
批内标准差 (S _r)	9.69E+02			4.15E+00		
批间方差 (S _b ²)	1.97E+13			1.16E+03		
实验室内标准差 (S _i)	4.44E+06			3.42E+01		
批内精密度 (CV%)	0.001%			0.56%		
批间精密度 (CV%)	4.46%			4.56%		
实验室内精密度 (CV%)	4.46%			4.58%		

评估总结:

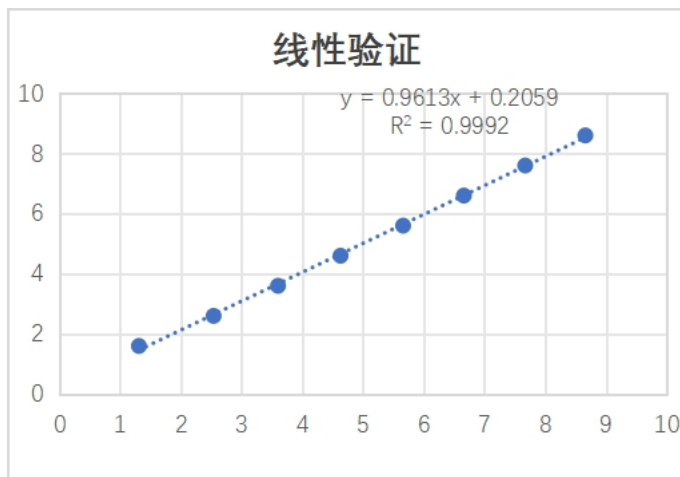
无论高值或低值的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室精密度(CV%)均≤5%，符合评判标准，验证通过。

3.3 线性验证

将高浓度样品 (4.57E+08 IU/mL) 用阴性血清样品依次向下 10 倍梯度稀释 7 个浓度，每个浓度样品重复检测 3 次，计算均值，将均值和理论值做线性回归分析 (y 为理论值，x 为实测均值)，得出线性回归 $y=a+bx$ 和相关系数 R^2 。

评判标准：实验结果 $R^2 \geq 0.995$ 。

	E8	E7	E6	E5	E4	E3	E2	E1
重复 1	4.73E+08	4.60E+07	4.06E+06	4.30E+05	4.34E+04	4.09E+03	3.38E+02	3.20E+01
重复 2	4.24E+08	4.86E+07	4.89E+06	5.00E+05	4.11E+04	3.73E+03	3.29E+02	2.52E+01
重复 3	4.75E+08	4.53E+07	4.73E+06	4.51E+05	4.49E+04	4.04E+03	3.66E+02	1.08E+01
均值	4.57E+08	4.66E+07	4.56E+06	4.60E+05	4.31E+04	3.95E+03	3.44E+02	2.27E+01
对数值	8.66	7.67	6.66	5.66	4.63	3.6	2.54	1.31
理论值	8.60	7.60	6.60	5.60	4.60	3.60	2.60	1.60
偏倚	0.70%	0.92%	0.91%	1.07%	0.65%	0.00%	-2.31%	-18.13%



评估总结：

检测乙肝病毒阳性样品在 $1 \times 10^2 \text{IU/mL} - 6.0 \times 10^8 \text{IU/mL}$ 范围内线性关系 $R^2 = 0.9992 \geq 0.995$ ，试剂性能良好。已满足试剂盒最低线性范围（100 IU/mL）下限，线性范围评价合格。由线性范围评价，结合厂家声明的技术参数，可将该项目的检测下线定为 100 IU/mL。线性范围验证通过。

4.总结

根据以上正确度、精密性及线性等验证结果，以此对乙肝病毒核酸定量检测作出方法性能评价，在此次评价过程中未发现性能不接受的状况，说明该检测方法的分析性能能被接受，满足临床标本检测要求。

6.2 定性检测系统性能验证

6.2.1 巨细胞病毒核酸定性检测系统验证

项目：巨细胞病毒核酸定性检测			
验证依据： 本技术规范			
1.检测系统概述：			
检测方法	PCR-荧光探针法	检测日期	2023.05.11
检测设备	ABI7500 实时荧光 PCR 仪(YQ-298-3)	设备厂家	赛默飞

检测试剂	人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法), 23001	试剂厂家	圣湘
2.性能验证指标			
2.1 符合性: 100%			
2.2 精密度: 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均≤5%			
2.3 检出限: 400 Copies/mL			
2.3 交叉反应: 与 EB 病毒 (EBV)、乙肝病毒 (HBV) 和丙肝病毒 (HCV) 无交叉反应			
2.4 抗干扰: 对总胆红素 (300μmol/L)、甘油三酯 (6mmol/L) 和血红蛋白 (20g/L) 无干扰			
3.验证方法及判断			
3.1 符合性验证			
使用圣湘和卫生部室间质评的 15 例样品, 我室用圣湘巨细胞病毒核酸检测试剂进行检测。			
评判标准: 符合率要求 100%。			
标本编号	预期结果	我室结果	是否接受 (Y/N)
ZQD-1	+	+	Y
ZQD-2	+	+	Y
ZQD-3	+	+	Y
ZQD-4	+	+	Y
ZQD-5	+	+	Y
202211	+	+	Y
202215	+	+	Y
202222	+	+	Y
202225	+	+	Y
202314	+	+	Y
202212	-	-	Y
202213	-	-	Y
202214	-	-	Y
202221	-	-	Y
202223	-	-	Y
评估总结:			
符合率为 100%, 符合评判标准, 验证通过。			
3.2 精密度验证			
使用巨细胞病毒样品弱阳性和阴性样品各 1 例, 共检测 5 个批次, 每个批次将这两个水平的样品各重复进行 4 次检测, 严格按试剂盒说明书操作进行, 共获得 20 个数据, 计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (S_l), 及对应的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)。			
评判标准: 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均≤5%。			

精密度结果统计表

批次	弱阳性样品	CT 值	低值样品	CT 值
第一批	Rep1	33.22	Rep1	-
	Rep2	34.68	Rep2	-
	Rep3	32.15	Rep3	-
	Rep4	33.18	Rep4	-
第二批	Rep1	33.45	Rep1	-
	Rep2	33.68	Rep2	-
	Rep3	34.25	Rep3	-
	Rep4	33.71	Rep4	-
第三批	Rep1	32.08	Rep1	-
	Rep2	32.35	Rep2	-
	Rep3	33.03	Rep3	-
	Rep4	33.92	Rep4	-
第四批	Rep1	33.54	Rep1	-
	Rep2	33.64	Rep2	-
	Rep3	34.35	Rep3	-
	Rep4	33.27	Rep4	-
第五批	Rep1	33.46	Rep1	-
	Rep2	33.59	Rep2	-
	Rep3	32.78	Rep3	-
	Rep4	34.04	Rep4	-
批内标准差 (S_r)	0.42		/	
批间方差 (S_b^2)	0.01		/	
实验室内标准差 (S_l)	0.38		/	
批内精密度 (CV%)	1.26%		/	
批间精密度 (CV%)	0.28%		/	
实验室内精密度 (CV%)	1.13%		/	

评估总结:

阴性结果重复检测 20 次, 仍为阴性, 弱阳性结果的 CT 值批内精密度 $CV \leq 5\%$, 批间精密度 $CV \leq 5\%$, 实验室精密度(CV%)均 $\leq 5\%$, 符合评判标准, 验证通过。

3.3 检出限验证

将圣湘标准品 (浓度为 $4.00E+04$ copies/mL) 稀释 100 倍至 400 copies/mL, 同一批次重复检测 5 次。

评判标准: 5 次检测, 必须 100%检出靶核酸。

重复次数	检测 CT 值	阴/阳性判断
1	35.35	阳性
2	35.06	阳性

3	35.94	阳性	
4	35.45	阳性	
5	35.93	阳性	
<p>评估总结： 将圣湘标准品（浓度为 4.00E+04copies/mL）稀释 100 倍至 400 copies/mL，同一批次重复检测 5 次，所有结果检测均为阳性，验证通过。</p>			
操作者：		日期：	2023.05.11
审核者：		日期：	2023.05.18
批准者：		日期：	2023.05.18
<p>3.4 交叉反应验证 分别取 EB 病毒（EBV）、乙肝病毒（HBV）、丙肝病毒（HCV）阳性样品各 1 例，用巨细胞病毒核酸检测试剂盒检测，每个样品重复检测三次。 评判标准：检测结果均为阴性。</p>			
验证病原体名称	检测结果		
	重复 1	重复 2	重复 3
EB 病毒（EBV）	阴性	阴性	阴性
乙肝病毒（HBV）	阴性	阴性	阴性
丙肝病毒（HCV）	阴性	阴性	阴性
<p>评估总结： 用 EB 病毒（EBV）、乙肝病毒（HBV）、丙肝病毒（HCV）阳性样品进行验证，每个样品的三次重复检测结果均为阴性，证明该检测方法与 EB 病毒（EBV）、乙肝病毒（HBV）、丙肝病毒（HCV）之间无交叉反应，验证通过。</p>			
<p>3.5 抗干扰能力验证 将巨细胞病毒检测结果为阳性的样品分为两组，一组为实验组，另一组为对照组。实验组分别加入总胆红素（300μmol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）对照组加入等体积的生理盐水，同时进行检测，每个样品重复检测 3 次。 评判标准：实验组 3 次检测结果均为阳性。</p>			
干扰物质名称	检测结果	检测 CT 值	阴/阳性判断
总胆红素 (300 μ mol/L)	重复 1	33.28	阳性
	重复 2	33.16	阳性
	重复 3	32.99	阳性
甘油三酯 (6mmol/L)	重复 1	33.29	阳性
	重复 2	33.53	阳性
	重复 3	33.02	阳性
血红蛋白 (20g/L)	重复 1	33.04	阳性
	重复 2	33.65	阳性
	重复 3	33.32	阳性
对照组	重复 1	33.06	阳性
	重复 2	33.12	阳性

	重复 3	33.27	阳性
<p>评估总结： 将总胆红素（300μmol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）作为干扰物质对阳性样品进行验证，实验组 3 次重复检测结果均为阳性，验证通过。</p>			
<p>4.总结 根据以上符合性、精密度、检出限、交叉反应和抗干扰等验证结果，以此对巨细胞病毒核酸定性检测作出方法性能评价，在此次评价过程中未发现性能不接受的状况，说明该检测方法的分析性能能被接受，满足临床标本检测要求。</p>			

6.2.2 丙肝病毒核酸定性检测系统验证

项目：丙型肝炎病毒（HCV-RNA）定性检测			
验证依据： 本技术规范			
1.检测系统概述：			
检测方法	RT-PCR 荧光探针法	检测日期	2023.05.17
检测设备及编号	ABI7500 实时荧光 PCR 仪（JY113）	设备厂家	赛默飞
检测试剂及批号	HCV 丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒（PCR-荧光探针法），批号 23010	试剂厂家	圣湘
验证时机	<input checked="" type="checkbox"/> 新开展项目 <input type="checkbox"/> 检测系统变更：更换检测设备 <input type="checkbox"/> 影响检验程序分析性能情况发生 <input type="checkbox"/> 其它		
2.性能验证指标			
2.1 符合性： 100%			
2.2 精密度： 弱阳性标本 CT 值批内精密度 \leq 5%，批间精密度 \leq 5%			
2.3 检出限： 25 IU/mL			
2.4 交叉反应： 与 HBV、EB 病毒和 CMV 病毒无交叉反应			
2.5 抗干扰： 对甘油三酯（3200mg/dL）、血红蛋白（28g/dL）和粘蛋白（2mg/mL）无干扰			
3.验证方法及判断			
3.1 符合性验证			
使用济南金域的 15 例临床样品，我室用圣湘丙型肝炎病毒核酸检测试剂进行检测。			
评判标准：符合率要求 100%。			
标本编号	预期结果	我室结果	是否接受（Y/N）
1	+	+	Y
2	+	+	Y
3	+	+	Y
4	+	+	Y
5	+	+	Y
6	-	-	Y
7	+	+	Y
8	+	+	Y

9	+	+	Y
10	-	-	Y
11	+	+	Y
12	-	-	Y
13	-	-	Y
14	+	+	Y
15	-	-	Y

评估总结:

符合率为 100%，符合评判标准，验证通过。

3.2 精密度验证

选择高值、低值样品各 1 例，共检测 5 个批次，每个批次将这两个浓度的样品各重复进行 4 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 20 个数据，计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (SI)，及对应的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)。

评判标准：批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均 $\leq 5\%$ 。

精密度结果统计表

批次	高值样品	CT 值	低值样品	CT 值
第一批	Rep1	33.68	Rep1	-
	Rep2	34.72	Rep2	-
	Rep3	34.85	Rep3	-
	Rep4	35.18	Rep4	-
第二批	Rep1	35.65	Rep1	-
	Rep2	35.18	Rep2	-
	Rep3	34.65	Rep3	-
	Rep4	34.76	Rep4	-
第三批	Rep1	35.08	Rep1	-
	Rep2	34.55	Rep2	-
	Rep3	35.03	Rep3	-
	Rep4	34.98	Rep4	-
第四批	Rep1	34.59	Rep1	-
	Rep2	33.64	Rep2	-
	Rep3	35.35	Rep3	-
	Rep4	34.27	Rep4	-
第五批	Rep1	35.66	Rep1	-
	Rep2	35.59	Rep2	-
	Rep3	35.71	Rep3	-
	Rep4	34.94	Rep4	-
批内标准差 (S_r)	0.37		/	
批间方差 (S_b^2)	0.04		/	
实验室内标准	0.38		/	

	差 (S _i)		
	批内精密度 (CV%)	1.06%	/
	批间精密度 (CV%)	0.57%	/
	实验室内精密度 (CV%)	1.08%	/

评估总结:

阴性结果重复检测 20 次, 仍为阴性, 弱阳性结果的 CT 值批内精密度(CV%)、批间精密度 (CV%)、实验室精密度(CV%)均≤5%, 符合评判标准, 验证通过。

3.3 检出限验证

使用康彻思坦 HCV DNA 质控品 S5, 按浓度比例稀释后得到的检出限浓度的样品(25 IU/mL), 重复检测 5 次。

评判标准: 5 次检测, 必须 100%检出靶核酸。

重复次数	检测 CT 值	阴/阳性判断
1	36.57	阳性
2	37.21	阳性
3	37.12	阳性
4	36.84	阳性
5	37.45	阳性

评估总结:

同一批次重复检测 5 次, 所有结果检测均为阳性, 验证通过。

3.4 交叉反应验证

分别取 HBV、EB 病毒和 CMV 三个项目阳性的样品各 1 例, 用丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒检测, 每个样品重复检测三次。

评判标准: 检测结果均为阴性。

验证病原体名称	检测结果		
	重复 1	重复 2	重复 3
EB 病毒	阴性	阴性	阴性
HBV	阴性	阴性	阴性
CMV	阴性	阴性	阴性

评估总结:

用 EB 病毒、HBV 和 CMV 阳性样品进行验证, 每个样品的三次重复检测结果均为阴性, 证明该检测方法与 EB 病毒、HBV 和 CMV 之间无交叉反应, 验证通过。

3.5 抗干扰能力验证

将丙型肝炎病毒核酸检测结果为阳性的样品分为两组, 一组为实验组, 另一组为对照组。实验组分别加入甘油三酯 (3200mg/dL)、血红蛋白 (28g/dL) 和粘蛋白 (2mg/mL), 对照组加入等体积的生理盐水, 同时进行检测, 每个样品重复检测 3 次。

评判标准: 实验组 3 次检测结果均为阳性。

干扰物质名称	检测结果	检测 CT 值	阴/阳性判断

甘油三酯 (3200mg/dL)	重复 1	37.14	阳性
	重复 2	37.52	阳性
	重复 3	37.48	阳性
血红蛋白 (28g/dL)	重复 1	37.08	阳性
	重复 2	36.98	阳性
	重复 3	37.23	阳性
粘蛋白 (2mg/mL)	重复 1	37.51	阳性
	重复 2	37.16	阳性
	重复 3	37.68	阳性
对照组	重复 1	37.25	阳性
	重复 2	36.54	阳性
	重复 3	36.79	阳性

评估总结：

将甘油三酯 (3200mg/dL)、血红蛋白 (28g/dL) 和粘蛋白 (2mg/mL) 作为干扰物质对阳性样品进行验证，实验组 3 次重复检测结果均为阳性，验证通过。

4.总结

根据以上符合性、精密度、检出限、交叉反应和抗干扰等验证结果，以此对丙型肝炎病毒核酸定性检测作出方法性能评价，在此次评价过程中未发现性能不接受的状况，说明该检测方法的分析性能能被接受，满足临床标本检测要求。

6.2.3 诺如病毒核酸定性检测系统验证

项目：诺如病毒核酸定性检测			
验证依据： 本技术规范			
1.检测系统概述：			
检测方法	PCR-荧光探针法	检测日期	2023.05.08
检测设备	ABI7500 实时荧光 PCR 仪 (YQ-298-3)	设备厂家	赛默飞
检测试剂	诺如病毒核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)，202303002	试剂厂家	广州达安基因股份有限公司
验证时机	<input checked="" type="checkbox"/> 新开展项目 <input type="checkbox"/> 检测系统变更：更换检测设备 <input type="checkbox"/> 影响检验程序分析性能情况发生 <input type="checkbox"/> 其它		
2.性能验证指标			
2.1 符合性： 100%			
2.2 精密度： 批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均≤5%			
2.3 检出限： 1.00E+03 Copies/mL			
2.4 交叉反应： 与结核分枝杆菌、EB 病毒和 HPV 病毒无交叉反应			
2.5 抗干扰： 对甘油三酯 (3200mg/dL)、血红蛋白 (28g/dL) 和粘蛋白 (2mg/mL) 无干扰			

3.验证方法及判断

3.1 符合性验证

使用济南金域的 15 例临床样品，我室用达安诺如病毒试剂进行检测。

评判标准：符合率要求 100%。

标本编号	预期结果	我室结果	是否接受 (Y/N)
NV001	-	-	Y
NV002	+	+	Y
NV003	+	+	Y
NV004	+	+	Y
NV005	+	+	Y
NV006	+	+	Y
NV007	+	+	Y
NV008	+	+	Y
NV009	+	+	Y
NV010	+	+	Y
NV011	+	+	Y
NV012	-	-	Y
NV013	-	-	Y
NV014	-	-	Y
NV015	-	-	Y

评估总结：

符合率为 100%，符合评判标准，验证通过。

3.2 精密度验证

选择高值、低值样品各 1 例，共检测 5 个批次，每个批次将这两个浓度的样品各重复进行 4 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 20 个数据，计算批内标准差 (Sr)、批间方差 (Sb²)、实验室内标准差 (SI)，及对应的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)。

评判标准：批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室内精密度(CV%)均≤5%。。

精密度结果统计表

批次	高值样品	CT 值	低值样品	CT 值
第一批	Rep1	29.7	Rep1	37.34
	Rep2	29.55	Rep2	36.44
	Rep3	29.85	Rep3	36.77
	Rep4	29.92	Rep4	37.4
第二批	Rep1	29.3	Rep1	36.87
	Rep2	29.37	Rep2	37.18
	Rep3	29.21	Rep3	37.55
	Rep4	29.25	Rep4	37.01
第三批	Rep1	29.17	Rep1	36.37
	Rep2	29.01	Rep2	36.97
	Rep3	29.21	Rep3	36.72
	Rep4	29.15	Rep4	37.25

第四批	Rep1	29.21	Rep1	36.75	
	Rep2	29.3	Rep2	36.84	
	Rep3	29.28	Rep3	36.65	
	Rep4	29.32	Rep4	37.11	
	第五批	Rep1	28.85	Rep1	36.4
		Rep2	28.75	Rep2	36.32
		Rep3	29.08	Rep3	36.42
		Rep4	28.98	Rep4	36.11
批内标准差 (S_r)		0.16	0.30		
批间方差 (S_b^2)		0.02	0.02		
实验室内标准差 (S_i)		0.20	0.30		
批内精密度 (CV%)		0.535%	0.81%		
批间精密度 (CV%)		0.51%	0.43%		
实验室内精密度 (CV%)		0.69%	0.82%		

评估总结：

无论高值或低值样品的批内精密度(CV%)、批间精密度(CV%)、实验室精密度(CV%)均 $\leq 5\%$ ，符合评判标准，验证通过。

3.3 检出限验证

将达安基因性能验证试剂包中的 NV 阳性质控品(浓度为 $1.00E+05$ copies/mL)稀释 100 倍至 1000 copies/mL，同一批次重复检测 5 次。

评判标准：5 次检测，必须 100%检出靶核酸。

重复次数	检测 CT 值	阴/阳性判断
1	37.37	阳性
2	36.71	阳性
3	37.12	阳性
4	37.14	阳性
5	37.18	阳性

评估总结：

将达安基因性能验证试剂包中的 NV 阳性质控品(浓度为 $1.00E+05$ copies/mL)稀释 100 倍至 1000 copies/mL，同一批次重复检测 5 次，所有结果检测均为阳性，验证通过。

操作者： 日期： 2023.05.08

审核者： 日期： 2023.05.08

批准者： 日期： 2023.05.08

3.4 交叉反应验证

分别取结核分枝杆菌、EB 病毒和新型冠状病毒核酸检测三个项目阳性的样品各 1 例，用诺如病毒核酸检测试剂盒检测，每个样品重复检测三次。

评判标准：检测结果均为阴性。

验证病原体名称	检测结果		
	重复 1	重复 2	重复 3
EB 病毒	阴性	阴性	阴性
结核分枝杆菌	阴性	阴性	阴性
人乳头瘤病毒	阴性	阴性	阴性

评估总结：

用 EB 病毒、结核分枝杆菌和人乳头瘤病毒阳性样品进行验证，每个样品的三次重复检测结果均为阴性，证明该检测方法与 EB 病毒、结核分枝杆菌和人乳头瘤病毒之间无交叉反应，验证通过。

3.5 抗干扰能力验证

将诺如检测结果为阳性的样品分为两组，一组为实验组，另一组为对照组。实验组分别加入甘油三酯（3200mg/dL）、血红蛋白（28g/dL）和粘蛋白（2mg/mL），对照组加入等体积的生理盐水，同时进行检测，每个样品重复检测 3 次。

评判标准：实验组 3 次检测结果均为阳性。

干扰物质名称	检测结果	检测 CT 值	阴/阳性判断
甘油三酯 (3200mg/dL)	重复 1	37.14	阳性
	重复 2	37.52	阳性
	重复 3	37.48	阳性
血红蛋白 (28g/dL)	重复 1	37.08	阳性
	重复 2	36.98	阳性
	重复 3	37.23	阳性
粘蛋白 (2mg/mL)	重复 1	37.51	阳性
	重复 2	37.16	阳性
	重复 3	37.68	阳性
对照组	重复 1	37.25	阳性
	重复 2	36.54	阳性
	重复 3	36.79	阳性

评估总结：

将甘油三酯（3200mg/dL）、血红蛋白（28g/dL）和粘蛋白（2mg/mL）作为干扰物质对阳性样品进行验证，实验组 3 次重复检测结果均为阳性，验证通过。

4. 总结

根据以上符合性、精密性、检出限、交叉反应和抗干扰等验证结果，以此对诺如病毒核酸检测作出方法性能评价，在此次评价过程中未发现性能不接受的状况，说明该检测方法的分析性能能被接受，满足临床标本检测要求。

6.3 定量检测系统性能确认

6.3.1 HIV 定量检测系统确认

项目：HIV 病毒定量检测试剂盒				
确认依据：《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》				
1.检测系统概述：				
检测方法	PCR-荧光探针法	检测日期	2024.01.23	
检测设备	ABI7500 荧光定量 PCR 仪			
检测试剂	HIV 病毒定量检测试剂盒			
2. 性能确认指标				
2.1 正确度				
2.1.1 偏倚评估				
2.1.2 回收试验				
2.2 精密度				
2.3 测量不确定度				
2.4 分析特异性				
2.5 分析灵敏度				
2.6 线性范围				
2.7 检出限 LOD				
2.8 定量限				
3.性能确认方法及判断				
3.1 正确度确认				
(1) 偏倚评估				
使用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品, 批号: 220021-20160101 (浓度: 130,000 IU/mL), 制作高值样品 (浓度: 1.00E+05 IU/mL) 和低值样品 (1.00E+02 IU/mL), 每批重复测定 2 次, 连续测定 5 天, 记录检测结果, 计算全部检测结果的均值, 比较检测均值与参考值的偏倚。				
评判标准: 绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级。				
样品	样品 A (高值)		样品 B (低值)	
天数	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2
1	1.07E+05	9.30E+04	9.44E+01	1.02E+02

2	9.18E+04	9.71E+04	1.07E+02	8.56E+01
3	1.10E+05	9.61E+04	8.89E+01	1.03E+02
4	9.72E+04	1.02E+05	9.14E+01	1.05E+02
5	9.60E+04	9.21E+04	9.09E+01	8.88E+01
均值	9.82E+04		9.57E+01	
LOG (均值)	4.99		1.98	
参考值	1.00E+05		1.00E+02	
LOG (参考值)	5.00		2.00	
偏倚	0.01		0.02	

(2) 回收试验

在 200 μ L 的天然 HIV 阳性样品 (测定浓度为 5.00E+03 IU/mL) 中加入 18 μ L 人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品 (批号: 220021-20160101, 浓度: 130,000 IU/mL) 制成高值水平样品 1, 在 200 μ L 的天然 HIV 阳性样品 (测定浓度为 5.00E+03 IU/mL) 中加入 2 μ L 的人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品 (批号: 220021-20160101, 浓度: 130,000 IU/mL) 制成低值水平样品 2, 每个样品重复测定 3 次, 计算结果的均值和回收率。

评判标准: 回收率在 85%~115%

样品	样品 1 (高值)	样品 2 (低值)
重复 1	1.51E+04	6.47E+03
重复 2	1.58E+04	6.32E+03
重复 3	1.57E+04	6.13E+03
均值	1.51E+04	6.13E+03
R (回收率)	98.24%	91.56%

确认结论:

正确度确认: 用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品, 批号: 220021-20160101 (浓度: 130,000 IU/mL), 制作高值样品 (浓度: 1.00E+05 IU/mL) 和低值样品 (1.00E+02 IU/mL), 每批重复测定 2 次, 连续测定 5 天, 共 10 个数据的均值与参考值的绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级, 符合评判标准, 确认通过。回收试验: 高值水平样品回收率为 98.24%, 低值水平样品回收率为 91.56%, 均在 85%~115% 范围之内, 符合评判标准, 确认通过。

3.2 精密度确认:

使用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品, 批号: 220021-20160101 (浓度: 130,000 IU/mL), 制备成高值样品 (浓度: 1.00E+05 IU/mL) 和低值样品 (1.00E+02 IU/mL) 两个浓度水平,

共检测 5 个批次，每个批次将这两个浓度的样品各重复进行 5 次检测，严格按试剂盒说明书操作进行，共获得 25 个数据，计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_b^2)、实验室内标准差 (S_l) 及对应的批内精密度 (CV%)、批间精密度 (CV%)、实验室内精密度 (CV%)。

评判标准：批内精密度、批间精密度、实验室内精密度(CV%)均 < 5%。

精密度结果统计表						
	高值样品	浓度	浓度对数值	低值样品	浓度	浓度对数值
第 1 天	重复 1	1.85E+05	5.27	重复 1	9.30E+01	1.97
	重复 2	9.10E+04	4.96	重复 2	9.50E+01	1.98
	重复 3	9.90E+04	5.00	重复 3	1.02E+02	2.01
	重复 4	1.00E+05	5.00	重复 4	1.03E+02	2.01
	重复 5	8.20E+04	4.91	重复 5	8.80E+01	1.94
第 2 天	重复 1	1.09E+05	5.04	重复 1	8.20E+01	1.91
	重复 2	8.60E+04	4.93	重复 2	9.80E+01	1.99
	重复 3	8.80E+04	4.94	重复 3	9.50E+01	1.98
	重复 4	1.01E+05	5.00	重复 4	9.00E+01	1.95
	重复 5	9.80E+04	4.99	重复 5	9.50E+01	1.98
第 3 天	重复 1	8.30E+04	4.92	重复 1	9.30E+01	1.97
	重复 2	9.40E+04	4.97	重复 2	9.90E+01	2.00
	重复 3	1.03E+05	5.01	重复 3	1.03E+02	2.01
	重复 4	9.70E+04	4.99	重复 4	1.02E+02	2.01
	重复 5	9.70E+04	4.99	重复 5	9.00E+01	1.95
第 4 天	重复 1	9.10E+04	4.96	重复 1	1.09E+02	2.04
	重复 2	1.07E+05	5.03	重复 2	9.40E+01	1.97
	重复 3	9.00E+04	4.95	重复 3	9.70E+01	1.99
	重复 4	1.07E+05	5.03	重复 4	9.80E+01	1.99
	重复 5	1.03E+05	5.01	重复 5	9.30E+01	1.97
第 5 天	重复 1	1.04E+05	5.02	重复 1	9.30E+01	1.97
	重复 2	9.60E+04	4.98	重复 2	1.08E+02	2.03
	重复 3	9.20E+04	4.96	重复 3	9.50E+01	1.98
	重复 4	1.05E+05	5.02	重复 4	9.80E+01	1.99
	重复 5	1.03E+05	5.01	重复 5	1.09E+02	2.04
批内标准差 (S_r)	6.03E+01			1.27E+00		
批间方差 (S_b^2)	8.46E+06			2.01E+00		
实验室内标准差 (S_l)	2.91E+03			1.81E+00		
批内精密度 (CV%)	0.06%			1.31%		

批间精密度 (CV%)	2.90%	1.46%
实验室内精密度 (CV%)	2.90%	1.87%

确认结论:

高值样品批内标准差 (S_r) 为 $1.40E+02$ IU/mL, 批间方差 (S_b^2) 为 $2.54E+08$ IU/mL、实验室内标准差 (S_l) 为 $1.59E+04$ IU/mL; 低值样品批内标准差 (S_r) 为 $4.11E+00$ IU/mL, 批间方差 (S_b^2) 为 $4.60E+02$ IU/mL、实验室内标准差 (S_l) 为 $2.18E+01$ IU/mL, 且所有精密度 CV 值均 $<5\%$ 。

3.3 测量不确定度确认:

采用企业定量参考品 S (标定浓度 $5.00E+03$ IU/mL), 重复检测 5 次, 计算实验室内复现性引入的测量不确定度 $u_{rel}(Rw)$ 。采用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品, 批号: 220021-20160101 (浓度: 130,000 IU/mL), 重复检测 5 次, 计算偏倚引入的测量不确定度 $u_{rel}(bias)$ 。

实验室内复现性引入的测量不确定度评定

	样品				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5
测量浓度	4.93E+03	5.02E+03	4.96E+03	4.90E+03	4.81E+03
测量平均值	4.92E+03				
$u(R_w)$	7.97E+01				
$u_{rel}(R_w)$ (%)	1.62				

偏倚引入的测量不确定度评定

样品	有证标准物质				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5
测量浓度	1.07E+05	1.23E+05	1.14E+05	1.11E+05	9.71E+04
测量平均值	1.11E+05				
偏倚量值 b	-8.89E+03				
相对偏倚量值 b_{rel} (%)	0.89				
$u(R_w)$	9.66E+03				
$u_{rel}(R_w)$ (%)	8.74				
$u(C_{ref})$	1				
$u_{rel}(C_{ref})$ (%)	1.00E-06				
$u_{c}(bias)$ 不确定度	4.32E+03				
$u_{c,rel}(bias)$ 不确定度分量 (%)	3.91				

合成标准不确定度 u_c 和扩展不确定度 U 的评定结果

统计量名称	数值
u_c 合成标准不确定度	1.06E+04
$u_{c,rel}$ 相对合成标准不确定度 (%)	9.57
包含因子 k	2
U 扩展不确定度	2.12E+04

确认结论：检测试剂检测样品浓度为 5.00E+03 IU/mL 时，相对不确定度为 1.62%。在测试有证标准物质（浓度为 130,000 IU/mL）时，相对偏倚量值为 0.89%， $u_{c,rel}(bias)$ 不确定度分量为 3.91； u_c 合成标准不确定度为 1.06E+04 IU/mL，扩展不确定度 U ($k=2$) 为 2.12 E+04 IU/mL。

3.4 分析特异性确认：

3.4.1 交叉反应：

使用不含目标序列的核酸样品、分析物的结构类似物、具有同源性序列的核酸片段、检测范围外的型别等物质对交叉反应进行确认，制备 3×LoD 浓度水平阳性样品以及阴性样品，加入相应浓度的交叉，重复测试 3 次，对交叉情况进行确认。

评判标准：阴性样品的检测结果为阴性，3×LoD 阳性样品全部检出，即为无交叉反应发生。

3.4.2 干扰实验：

选择相应的干扰物质，确定干扰物质研究浓度。制备 3×LoD 浓度水平阳性样品，每个样品实验组和对照组均重复测试 3 次。采用配对比对的方式，比较添加（实验组）与未添加（对照组）相应浓度干扰物质的样品检测结果的差异。

评判标准：实验组和对照组的偏倚值 < 10%，即为干扰物质不影响试剂检测性能。

交叉反应结果统计表

交叉物质名称	样品类型	终浓度	检测结果（阳性检出次数/总检测次数）		交叉情况
			阴性样品	3×LoD 阳性样品	
肺炎链球菌	ATCC 菌株	1.0×10 ⁶ CFU/mL	0/3	3/3	无
白色念珠菌	ATCC 菌株	1.0×10 ⁶ CFU/mL	0/3	3/3	无
甲型肝炎病毒	ATCC 菌株	1.0×10 ⁵ PFU/mL	0/3	3/3	无
风疹病毒	ATCC 菌株	1.0×10 ⁵ PFU/mL	0/3	3/3	无

干扰试验结果统计表

样品类型	样品浓度	干扰物质浓度	对照组	实验组	偏倚	是否在接收范围
			Log 平均值	Log 平均值		
人基因组 DNA	1.50E+04	2.5ng/uL	4.18	4.18	0.57%	是
胆红素	1.50E+04	342μmol/L	4.16	4.18	2.02%	是
人白蛋白	1.50E+04	1.0g/L	4.17	4.17	0.11%	是
血红蛋白	1.50E+04	60mg/L	4.17	4.17	-0.46%	是

确认结论：选取的交叉物质和干扰物质在一定浓度下均不会干扰检测试剂性能。

3.5 灵敏度确认:

采用 PCR 检测系统同批次分析二个已知浓度水平的样品 C1 (高值)、C2 (低值), 每个样品测量 3 次, 3 次测定响应信号值代表该物质的响应值, 样品 C1、C2 的响应值差 (ΔCT) 除以 C1、C2 浓度差即为检测系统的灵敏度。

样品	样品 1 (浓度 C1)	样品 2 (浓度 C2)
重复 1	5.01E+09	1.50E+04
重复 2	4.99E+09	1.50E+04
重复 3	4.91E+09	1.46E+04
C1、C2 的响应值差 (ΔCT)	4.97E+09	
灵敏度	99.39%	

确认结论: 检测系统灵敏度为 99.39%

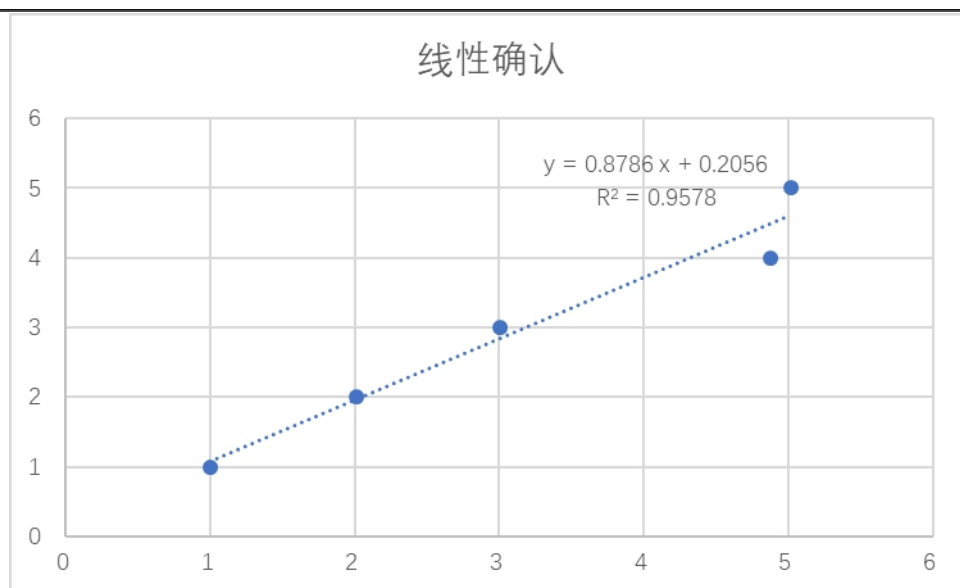
3.6 线性范围确认:

使用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品, 批号: 220021-20160101 (浓度: 130,000 IU/mL), 制作样品 (浓度: 1.00E+05 IU/mL), 进行 10 倍系列稀释得到 5 个梯度浓度的参考品, 每个样品重复 3 次, 计算均值, 将均值和理论值做线性回归分析 (y 为理论值, x 为实测均值), 得出线性回归 $y=a+bx$ 和相关系数 R^2 。

评判标准: 标准曲线的 r^2 值大于 0.98。

样品梯度	梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 4	梯度 5
重复 1	9.98E+00	1.01E+02	9.70E+02	1.08E+04	9.17E+04
重复 2	1.08E+01	1.05E+02	1.09E+03	1.04E+04	9.75E+04
重复 3	9.56E+00	9.26E+01	9.30E+02	9.63E+03	9.25E+04
均值	1.01E+01	1.01E+02	9.97E+02	1.90E+04	1.03E+05
对数值	1.00	2.01	3.00	4.28	5.01
理论值	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00

线性 r^2 值



确认结论：标准物质在 $1.01\text{E}+01$ IU/mL 至 $1.03\text{E}+05$ IU/mL 范围内线性关系 $R^2=0.9952 \geq 0.98$ 。

3.7 检出限确认：

使用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品，批号：220021-20160101 (浓度： $130,000$ IU/mL)，制作样品 (浓度： $5.00\text{E}+04$ IU/mL)，梯度稀释 5 个浓度梯度，每个浓度重复检测 3 次，记录 3 次重复均能检出的最低浓度为 C_y 。再将 10 倍 C_y 浓度 (标记为 $10C_y$) 的样品分别稀释至浓度 $10C_y$ 、 $3.16C_y$ 、 C_y 、 $C_y/3.16$ 、 $C_y/10$ ，每个浓度重复检测 10 次，将得到的数据进行 Probit 分析，95% 阳性检出率对应的测量浓度即为 LoD。

检出限确认统计分析结果

样品浓度	检测阳性数 (n)	总数 (N)	阳性检出率 (%)
$5.00\text{E}+04$	3	3	100%
$5.00\text{E}+03$	3	3	100%
$5.00\text{E}+02$	3	3	100%
$5.00\text{E}+01$	3	3	100%
$5.00\text{E}+00$	1	3	33%
初步得出检出限为 $5.00\text{E}+01$ IU/mL			
$5.00\text{E}+02$	10	10	100%
$1.58\text{E}+02$	10	10	100%
$5.00\text{E}+01$	10	10	100%
$1.58\text{E}+01$	10	10	100%
$5.00\text{E}+00$	1	10	10%

使用 SPSS 对结果进行 Probit 分析，得出在 95% 置信区间内 95% 阳性检出率对应的测量浓度为 12.622 IU/mL，即检出限为 13 IU/mL。

确认结论：检测试剂检出限为 13 IU/mL。

3.8 定量限确认：

使用人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) RNA 标准品，批号：220021-20160101 (浓度：130,000 IU/mL)，制作样品 (浓度：5.00E+04 IU/mL)，梯度稀释 5 个浓度，每个浓度重复检测 20 次。统计分析每个浓度水平在 20 次重复检测中的阳性检出率及定量检测结果与理论浓度对数的绝对偏差，将多次测量结果的绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级的浓度水平作为定量限。

定量限的统计分析结果

样品编号	浓度	重复检测数	阳性数	阳性率	Log 值 ($\bar{X} \pm S$)	最大绝对偏差
1	5.00E+04	20	20	100%	4.70	0.00
2	5.00E+03	20	20	100%	3.70	0.00
3	5.00E+02	20	20	100%	2.70	0.00
4	5.00E+01	20	20	100%	1.60	0.10
5	5.00E+00	20	3	15%	-0.29	0.99

确认结论：检测试剂定量限为 5.00E+01 IU/mL。

4.总结

综合以上指标的确认结果可知，所有性能确认均满足要求，说明该检测试剂可以进入验证阶段。

6.3.2 HBV 定量检测系统确认

项目：HBV 病毒定量检测试剂				
确认依据：《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》				
1.检测系统概述：				
检测方法	PCR-荧光探针法		检测日期	2024.01.23
检测设备	ABI7500 荧光定量 PCR 仪			
检测试剂	病毒定量检测试剂盒			
2. 性能确认指标				
2.1 正确度				
2.1.1 偏倚评估				
2.1.2 回收试验				
2.2 精密度				
2.3 测量不确定度				
2.4 分析特异性				
2.5 分析灵敏度				
2.6 线性范围				
2.7 检出限 LOD				
2.8 定量限				
3. 性能确认方法及判断				
3.1 正确度确认				
(1) 偏倚评估				
使用乙肝病毒核酸国家标准品（批号 300022-201601，浓度 1.0 E+08 IU/mL）制备成样品 A（高值，1.0 E+06 IU/mL）和样品 B（低值，1.0 E+03 IU/mL）两个浓度水平，每天对每个浓度水平的标准物质重复测定 2 次，连续测定 5 天，记录检测结果，计算全部检测结果的均值，并按公式（1）计算偏倚。绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级。				
偏倚 = 结果均值 - 标准值 (1)				
样品	样品 A（高值）		样品 B（低值）	
天数	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2
1	1.18E+06	1.17E+06	7.21E+02	8.00E+02
2	1.01E+06	9.94E+05	8.47E+02	9.97E+02
3	1.04E+06	1.13E+06	9.02E+02	1.08E+03
4	1.01E+06	1.19E+06	7.24E+02	9.45E+02
5	1.19E+06	1.11E+06	9.22E+02	1.00E+03
均值	1.10E+06		8.94E+02	
LOG（均值）	6.0422		2.9515	

参考值	1.00E+06	1.00E+03
LOG (参考值)	6.0000	3.0000
偏倚	0.0422	-0.0485

(2) 回收试验

在 100 μ L 的天然乙肝阳性样品（浓度为 1.00E+03 IU/mL）中加入 9 μ L 乙肝病毒核酸国家标准品（批号 300022-201601，浓度 1.0 E+05 IU/mL）制成高值水平样品 1，在 100 μ L 的天然乙肝阳性样品（浓度为 1.00E+03 IU/mL）中加入 2 μ L 的乙肝病毒核酸国家标准品（批号 300022-201601，浓度 1.0 E+05 IU/mL）制成低值水平样品 2。每个样品重复测定 3 次，计算结果的均值和回收率。回收率在 85%~115% 范围内确认为该检测系统可用于正常检测。

评判标准：回收率在 85%~115%

样品	样品 1 (高值)	样品 2 (低值)
重复 1	9.07E+03	2.54E+03
重复 2	1.01E+04	2.53E+03
重复 3	1.04E+04	2.69E+03
均值	9.08E+03	2.76E+03
R (回收率)	98.91%	90.67%

确认结论：

正确度确认：高值水平样品回收率为 98.91%，低值水平样品回收率为 90.67%，均在 85%~115% 范围之内，符合评判标准，确认通过。

3.2 精密度确认：

在重复性条件下，采用核酸标准物质（一般包括高、低两个浓度，其中之一接近决定性水平），连续测定 5 天，每天一个分析批，每批两个浓度水平，每个浓度水平重复测定 5 次。根据相应公式计算批内标准差 (S_r)、批间方差 (S_{b2})、实验室内标准差 (S₁) 及对应的批内精密度 (CV%)、批间精密度 (CV%)、实验室内精密度 (CV%)。评判标准：批内精密度、批间精密度、实验室内精密度 (CV%) 均 < 5%。

精密度结果统计表

	高值样品	浓度	浓度对数值	低值样品	浓度	浓度对数值
第 1 天	重复 1	4.85E+06	6.69	重复 1	4.93E+03	3.69
	重复 2	4.91E+06	6.69	重复 2	4.95E+03	3.69
	重复 3	4.99E+06	6.70	重复 3	5.02E+03	3.70
	重复 4	5.00E+06	6.70	重复 4	5.03E+03	3.70
	重复 5	4.82E+06	6.68	重复 5	4.88E+03	3.69
第 2 天	重复 1	5.09E+06	6.71	重复 1	4.82E+03	3.68
	重复 2	4.86E+06	6.69	重复 2	4.98E+03	3.70
	重复 3	4.88E+06	6.69	重复 3	4.95E+03	3.69
	重复 4	5.01E+06	6.70	重复 4	4.80E+03	3.68
	重复 5	4.98E+06	6.70	重复 5	4.85E+03	3.69
第 3 天	重复 1	4.83E+06	6.68	重复 1	4.93E+03	3.69
	重复 2	4.94E+06	6.69	重复 2	4.99E+03	3.70
	重复 3	5.03E+06	6.70	重复 3	5.03E+03	3.70
	重复 4	4.97E+06	6.70	重复 4	5.02E+03	3.70
	重复 5	4.97E+06	6.70	重复 5	4.90E+03	3.69
第 4 天	重复 1	4.91E+06	6.69	重复 1	5.09E+03	3.71
	重复 2	5.07E+06	6.71	重复 2	4.94E+03	3.69
	重复 3	4.90E+06	6.69	重复 3	4.97E+03	3.70
	重复 4	5.07E+06	6.71	重复 4	4.98E+03	3.70
	重复 5	5.03E+06	6.70	重复 5	4.93E+03	3.69
第 5 天	重复 1	5.04E+06	6.70	重复 1	4.93E+03	3.69
	重复 2	4.96E+06	6.70	重复 2	5.08E+03	3.71
	重复 3	4.92E+06	6.69	重复 3	4.95E+03	3.69
	重复 4	5.05E+06	6.70	重复 4	4.98E+03	3.70
	重复 5	5.03E+06	6.70	重复 5	5.09E+03	3.71
批内标准差	1.40E+02			4.11E+00		
批间方差	2.54E+08			4.60E+02		
实验室内标准差	1.59E+04			2.18E+01		
批内精密度 (CV%)	0.00%			0.08%		
批间精密度 (CV%)	0.32%			0.43%		
实验室内精密度 (CV%)	0.32%			0.44%		

确认结论:

高值和低值标准物质的批内、批间精密度以及实验室内精密度 (CV%) ≤5%, 符合评判标准, 确认通过。

3.3 测量不确定度确认:

采用企业定量参考品 S (标定浓度 1.00E+03 IU/mL), 重复检测 5 次, 计算实验室内复现性引入的测量不确定度 $u_{rel}(R_w)$ 。采用有证标准物质 (标定浓度 1.00E+06 IU/mL), 重复检测 5 次, 计算偏倚引入的测量不确定度 $uc_{rel}(bias)$ 。

实验室内复现性引入的测量不确定度评定

	样品				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5
测量浓度	1.03E+03	9.97E+02	1.03E+03	1.01E+03	1.03E+03
测量平均值	1.02E+03				
$u(R_w)$	1.55E+01				
$u_{rel}(R_w)$ (%)	1.52				

偏倚引入的测量不确定度评定

样品	有证标准物质				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5
测量浓度	9.97E+05	1.04E+06	1.04E+06	1.03E+06	1.04E+06
测量平均值	1.03E+06				
偏倚量值 b	2.86E+04				
相对偏倚量值 b_{rel} (%)	2.86				
$u(R_w)$	1.91E+04				
$u_{rel}(R_w)$ (%)	1.86				
$u(C_{ref})$	1				
$u_{rel}(C_{ref})$ (%)	1.00E-06				
$uc(bias)$ 不确定度	8.54E+03				
$uc_{rel}(bias)$ 不确定度分量 (%)	0.83				

合成标准不确定度 uc 和扩展不确定度 U 的评定结果

统计量名称	数值
uc 合成标准不确定度	2.09E+04
uc_{rel} 相对合成标准不确定度 (%)	2.03
包含因子 k	2
U 扩展不确定度	4.19E+04

确认结论：实验室内测量复现性引入的相对测量不确定度分量 $u_{rel}(R_w)$ 为 1.52%；在测试有证标准物质（浓度为 1.00E+06 IU/mL）时，相对偏倚量值为 2.86%， $uc_{rel}(bias)$ 不确定度分量为 0.83%； uc 合成标准不确定度为 2.09E+04 IU/mL，扩展不确定度 $U(k=2)$ 为 4.19E+04 IU/mL。

3.4 分析特异性确认：

3.4.1 交叉反应：

使用不含目标序列的核酸样品、分析物的结构类似物、具有同源性序列的核酸片段、检测范围外的型别等物质对交叉反应进行确认，制备 3×LoD 浓度水平阳性样品以及阴性样品，加入相应浓度的交叉物质，重复测试 3 次，对交叉情况进行确认。

评判标准：阴性样品的检测结果为阴性，3×LoD 阳性样品全部检出，即为无交叉反应发生。

3.4.2 干扰实验：

选择相应的干扰物质，确定干扰物质研究浓度。制备 3×LoD 浓度水平阳性样品，每个样品实验组和对照组均重复测试 3 次。采用配对比对的方式，比较添加（实验组）与未添加（对照组）相应浓度干扰物质的样品检测结果的差异。

评判标准：实验组和对照组的偏倚值 < 10%，即为干扰物质不影响试剂检测性能。

交叉反应结果统计表

交叉物质名称	样本类型	终浓度	检测结果（阳性检出次数/总检测次数）		交叉情况
			阴性样品	3×LoD 阳性样品	
梅毒螺旋体	ATCC 菌株	1.0×10 ⁵ CFU/mL	0/3	3/3	无
金黄色葡萄球菌	ATCC 菌株	1.0×10 ⁶ CFU/mL	0/3	3/3	无
人巨细胞病毒	ATCC 菌株	1.0×10 ⁵ PFU/mL	0/3	3/3	无
白色念珠菌	ATCC 菌株	1.0×10 ⁶ PFU/mL	0/3	3/3	无

干扰试验结果统计表

样品类型	样品浓度	干扰物质浓度	对照组	实验组	偏倚	是否在接收范围
			Log 平均值	Log 平均值		
人基因组 DNA	1.50E+04	2.5ng/uL	1.47	1.48	0.17%	是
甘油三酯	1.50E+04	3000mg/dL	1.48	1.47	-0.87%	是
红细胞	1.50E+04	2.0g/dL	1.48	1.48	0.65%	是
胆红素	1.50E+04	30mg/L	1.47	1.48	0.16%	是

确认结论：选取的交叉物质和干扰物质在一定浓度下均不会干扰检测试剂性能。

3.5 灵敏度确认:

采用 PCR 检测系统同批次分析二个已知浓度水平的样品 C1 (高值)、C2 (低值), 每个样品测量 3 次, 3 次测定响应信号值代表该物质的响应值, 样品 C1、C2 的响应值差 (ΔCT) 除以 C1、C2 浓度差即为检测系统的灵敏度。

样品	样品 1 (浓度 C1)	样品 2 (浓度 C2)
重复 1	9.71E+08	1.04E+01
重复 2	9.89E+08	1.08E+01
重复 3	9.55E+08	1.04E+01
C1、C2 的响应值差 (ΔCT)	9.72E+08	
灵敏度	97.17%	

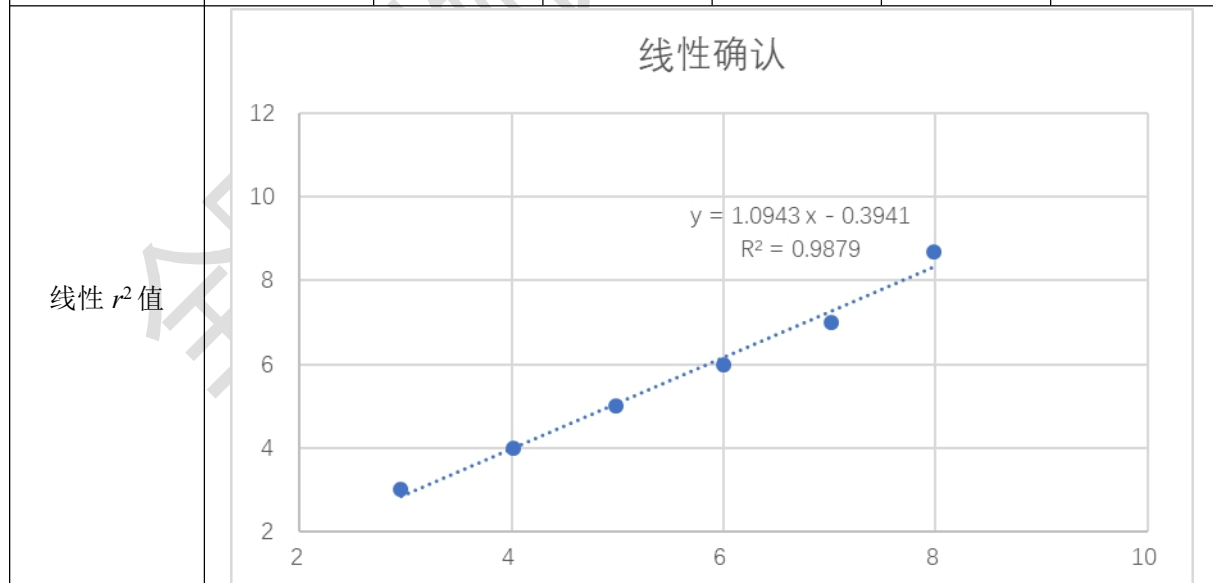
确认结论: 检测系统灵敏度为 97.17%

3.6 线性范围确认:

使用已知浓度的企业参考品 (浓度 1.00E+08 IU/mL), 进行 10 倍系列稀释得到 6 个梯度浓度的参考品, 每个样品重复 3 次, 计算均值, 将均值和理论值做线性回归分析 (y 为理论值, x 为实测均值), 得出线性回归 $y=a+bx$ 和相关系数 R^2 。

评判标准: 标准曲线的 r^2 值大于 0.98。

样品梯度	梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 4	梯度 5	梯度 6
重复 1	9.60E+02	1.07E+04	1.03E+05	9.13E+05	9.51E+06	9.13E+07
重复 2	9.48E+02	9.52E+03	9.59E+04	1.05E+06	1.01E+07	9.80E+07
重复 3	9.23E+02	1.05E+04	9.21E+04	1.01E+06	1.06E+07	1.09E+08
均值	9.44E+02	1.02E+04	9.69E+04	9.92E+05	1.01E+07	9.94E+07
对数值	2.97	4.01	4.99	6.00	7.00	8.00
理论值	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.70



确认结论: 标准物质在 9.44E+02 IU/mL 至 9.94E+07IU/mL 范围内线性关系 $R^2=0.98888 \geq 0.98$ 。

3.7 检出限确认:

将乙肝病毒核酸国家标准品 (批号 300022-201601, 浓度 1.0 E+08 IU/mL) 梯度稀释成 5 个浓度梯度 (如下表所示), 每个浓度重复检测 3 次, 记录 3 次重复均能检出的最低浓度为 C_y 。再将 10 倍 C_y 浓度 (标

记为 10Cy) 的样品分别稀释至浓度 10Cy、3.16Cy、Cy、Cy/3.16、Cy/10，每个浓度重复检测 10 次，将得到的数据进行 Probit 分析，95%阳性检出率对应的测量浓度即为 LoD。

检出限确认统计分析结果

样品浓度	检测阳性数 (n)	总数 (N)	阳性检出率 (%)
1.00E+04	3	3	100%
1.00E+03	3	3	100%
1.00E+02	3	3	100%
1.00E+01	3	3	100%
1.00E+00	0	3	0
初步得出检出限为 1.00E+01 IU/mL			
1.00E+02	10	10	100%
3.16E+01	10	10	100%
1.00E+01	10	10	100%
3.17E+00	5	10	50%
1.00E+00	0	10	0%

使用 SPSS 对结果进行 Probit 分析，得出在 95%置信区间内 95%阳性检出率对应的测量浓度为 4.466 IU/mL，即检出限为 5 IU/mL。

确认结论：检测试剂检出限为 5 IU/mL。

3.8 定量限确认：

将乙肝病毒核酸国家标准品（批号 300022-201601，浓度 1.0 E+08 IU/mL）梯度稀释成 5 个浓度（如下表所示），每个浓度重复检测 20 次。统计分析每个浓度水平在 20 次重复检测中的阳性检出率及定量检测结果与理论浓度对数的绝对偏差，将多次测量结果的绝对偏差不超过 0.5 个对数数量级的浓度水平作为定量限。

定量限的统计分析结果

样品编号	浓度	重复检测数	阳性数	阳性率	Log 值 ($\bar{X} \pm S$)	最大绝对偏差
1	1.00E+04	20	20	100%	4.01	0.01
2	1.00E+03	20	20	100%	3.02	0.02
3	1.00E+02	20	20	100%	1.98	-0.02
4	1.00E+01	20	20	100%	1.08	0.08
5	1.00E+00	20	3	100%	0.84	0.84

确认结论：检测试剂定量限为 1.00E+01 IU/mL。

4.总结

综合以上指标的确认结果可知，以上所有性能指标均满足要求，说明该检测试剂可以进入验证阶段。

6.4 定性检测系统性能确认

6.4.1 博卡病毒定性检测系统性能确认

项目：博卡病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）			
确认依据： 本技术规范			
1. 检测系统概述：			
检测方法	PCR-荧光探针法	检测日期	2024.01.24
检测设备	ABI7500 实时荧光 PCR 仪		
检测试剂	博卡病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）		
2. 性能确认指标			
2.1 准确度： 敏感性（SE）和特异性（SP）均为 100%。			
2.2 精密度： 批内、批间和实验室内检出结果 CT 值的变异系数 CV 值均 \leq 5%；阳性检出率均为 100%；阴性符合率为 100%。			
2.3 分析特异性			
2.3.1 交叉反应： 与甲型流感病毒（FluA）、乙型流感病毒病毒（FluB）和呼吸道合胞病毒（RSV）无交叉且无干扰反应。			
2.3.2 抗干扰能力： 对总胆红素（300 μ mol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）无干扰。			
2.4 检出限（LoD）： 891 Copies/mL			
3. 性能确认方法和结果判断			
3.1 准确度确认			
检测如下标品，确认本试剂盒的准确度即敏感性（SE）和特异性（SP）。			
标品编号	预期结果	验证结果	是否接受（Y/N）
S16	+	+	Y
S17	+	+	Y
S18	+	+	Y
S19	+	+	Y
S20	+	+	Y
S21	+	+	Y
S22	+	+	Y
S23	+	+	Y
S24	+	+	Y
S25	-	-	Y
S26	-	-	Y
S27	-	-	Y
S28	-	-	Y
S29	-	-	Y
S30	-	-	Y
确认结论：通过对 15 例标品检测确认本试剂盒的敏感性（SE）和特异性（SP）均为 100%。			

3.2 精密度确认:

不同操作者分别用相同样品在不同的实验室，使用不同批次的试剂，在不同的仪器上分别每天进行一轮检测，每个浓度重复检测 2 次，持续检测 20 天；且样品应至少包含 3 个浓度水平：阴性样品、弱阳性样品和阳性样品。

精密度确认结果统计

检测天数	重复	中阳样品	弱阳样品	阴性样品
第 1 天-1	重复 1	28.74	35.20	/
	重复 2	28.42	34.39	/
第 1 天-2	重复 1	28.16	35.25	/
	重复 2	28.62	34.30	/
第 2 天-1	重复 1	28.39	33.94	/
	重复 2	28.93	34.45	/
第 2 天-2	重复 1	28.73	34.28	/
	重复 2	28.86	34.47	/
第 3 天-1	重复 1	28.71	35.00	/
	重复 2	28.56	35.34	/
第 3 天-2	重复 1	28.94	35.27	/
	重复 2	28.73	35.49	/
第 4 天-1	重复 1	29.07	35.40	/
	重复 2	29.23	35.75	/
第 4 天-2	重复 1	28.57	34.11	/
	重复 2	28.65	34.64	/
第 5 天-1	重复 1	28.73	34.26	/
	重复 2	28.72	34.53	/
第 5 天-2	重复 1	28.23	34.61	/
	重复 2	28.26	34.91	/
第 6 天-1	重复 1	29.01	34.42	/
	重复 2	28.33	35.62	/
第 6 天-2	重复 1	28.54	35.49	/
	重复 2	29.22	34.55	/
第 7 天-1	重复 1	29.21	34.64	/
	重复 2	28.68	34.56	/
第 7 天-2	重复 1	28.30	33.95	/
	重复 2	28.09	34.88	/
第 8 天-1	重复 1	28.62	34.66	/
	重复 2	28.66	34.95	/
第 8 天-2	重复 1	29.21	35.18	/
	重复 2	28.64	34.42	/
第 9 天-1	重复 1	28.01	34.44	/
	重复 2	28.47	35.44	/

第 9 天-2	重复 1	29.21	34.92	/
	重复 2	29.23	33.99	/
第 10 天-1	重复 1	28.36	35.03	/
	重复 2	28.51	34.70	/
第 10 天-2	重复 1	28.05	34.25	/
	重复 2	29.27	35.25	/
第 11 天-1	重复 1	28.82	34.66	/
	重复 2	28.70	35.07	/
第 11 天-2	重复 1	28.97	35.62	/
	重复 2	28.38	35.22	/
第 12 天-1	重复 1	28.23	34.67	/
	重复 2	28.49	35.60	/
第 12 天-2	重复 1	28.90	33.99	/
	重复 2	28.32	34.85	/
第 13 天-1	重复 1	29.30	34.39	/
	重复 2	28.06	33.97	/
第 13 天-2	重复 1	29.12	34.32	/
	重复 2	29.04	34.98	/
第 14 天-1	重复 1	28.09	35.54	/
	重复 2	28.94	34.51	/
第 14 天-2	重复 1	29.03	35.21	/
	重复 2	28.88	34.25	/
第 15 天-1	重复 1	28.46	34.93	/
	重复 2	28.39	34.90	/
第 15 天-2	重复 1	28.62	34.85	/
	重复 2	28.31	33.98	/
第 16 天-1	重复 1	29.12	33.97	/
	重复 2	28.78	35.50	/
第 16 天-2	重复 1	28.96	33.89	/
	重复 2	28.01	33.98	/
第 17 天-1	重复 1	28.82	34.18	/
	重复 2	28.05	33.87	/
第 17 天-2	重复 1	29.06	35.24	/
	重复 2	29.06	34.86	/
第 18 天-1	重复 1	28.91	35.26	/
	重复 2	28.15	33.81	/
第 18 天-2	重复 1	28.37	34.16	/
	重复 2	28.15	35.08	/
第 19 天-1	重复 1	28.73	35.35	/
	重复 2	28.37	34.75	/
第 19 天-2	重复 1	28.72	34.66	/
	重复 2	28.21	34.46	/
第 20 天-1	重复 1	28.74	35.48	/

	重复 2	28.52	35.51	/
第 20 天-2	重复 1	29.25	35.42	/
	重复 2	28.22	34.55	/
检出率	/	100%	100%	/
均值	/	28.65	34.76	/
批内标准差 (S_r)	/	1.912E-01	2.300E-01	/
批间方差 (S_b^2)	/	1.72E-04	9.19E-04	/
实验室内标准差 (S_l)	/	1.71E-01	2.08E-01	/
批内精密度 (CV%)	/	0.67%	0.66%	/
批间精密度 (CV%)	/	0.05%	0.09%	/
实验室内精密度 (CV%)	/	0.49%	0.60%	/

确认结论：两个浓度水平的阳性样品的批内、批间和实验室内检测结果 CT 值的变异系数 CV 值均 $\leq 5\%$ ，且阳性检出率 100%；阴性样本的阴性符合率 100%，符合要求，确认通过。

3.3 分析特异性确认：

3.3.1 交叉反应确认

分别用博卡病毒核酸检测试剂盒检测经数字 PCR 定量甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 强阳样品各 1 例，每个样品重复检测三次；分别用强阳甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 与博卡病毒进行混合，混合后甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 终浓度为强阳，博卡病毒为 3LoD。

3.3.2 抗干扰能力确认

将病毒检测结果为中强阳性、临界阳性 (3LoD) 和阴性的样品分为两组，一组为实验组，另一组为对照组。实验组分别加入总胆红素 (300 $\mu\text{mol/L}$)、甘油三酯 (6mmol/L) 和血红蛋白 (20g/L)；对照组加入等体积的生理盐水，同时用 3 批试剂进行检测，每个样品重复检测 3 次。

交叉反应结果统计表

样品名称	样品类型	终浓度	检测结果 (阳性检出次数/总检测次数)		交叉情况
			阴性样品	3 \times LoD 阳性样品	
博卡病毒	临床样品	3 $\times 10^3$ copies/mL	0/3	3/3(100%)	/
甲型流感病毒	病毒培养液	1 $\times 10^7$ copies/mL	0/3	3/3(100%)	不存在交叉
乙型流感病毒	病毒培养液	1 $\times 10^7$ copies/mL	0/3	3/3(100%)	不存在交叉
呼吸道合胞病毒	病毒培养液	1 $\times 10^7$ copies/mL	0/3	3/3(100%)	不存在交叉

干扰试验结果统计表

样品类型	样品浓度	干扰物质浓度	批次 1			批次 2			批次 3		
			CT 值平均值	平均值绝对偏差	是否抑制在接受	CT 值平均值	平均值绝对偏差	是否在接受范围	CT 值平均值	平均值绝对偏差	是否在接受范围

					范围						
博卡病毒	中强阳	生理盐水	28.24	/	/	28.10	/	/	28.03	/	/
博卡病毒	中强阳	总胆红素 (300 μ mol/L)	28.21	0.02	是	27.91	0.19	是	28.38	0.36	是
博卡病毒	中强阳	甘油三酯 (6mmol/L)	28.61	0.37	是	27.74	0.37	是	28.25	0.23	是
博卡病毒	中强阳	血红蛋白 (20g/L)	28.21	0.02	是	27.89	0.22	是	28.16	0.14	是
博卡病毒	临界阳	生理盐水	35.30	/	/	34.68	/	/	35.46	/	/
博卡病毒	临界阳	总胆红素 (300 μ mol/L)	34.73	0.58	是	34.59	0.09	是	34.92	0.55	是
博卡病毒	临界阳	甘油三酯 (6mmol/L)	34.59	0.72	是	34.95	0.27	是	34.65	0.81	是
博卡病毒	临界阳	血红蛋白 (20g/L)	34.52	0.78	是	34.70	0.02	是	34.83	0.63	是
阴性样品	/	生理盐水	/	/	/	/	/	/	/	/	/
阴性样品	/	总胆红素 (300 μ mol/L)	/	/	是	/	/	是	/	/	是
阴性样品	/	甘油三酯 (6mmol/L)	/	/	是	/	/	是	/	/	是
阴性样品	/	血红蛋白 (20g/L)	/	/	是	/	/	是	/	/	是

确认结论:

交叉反应确认标准: 博卡病毒核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 检测 FluA、FluB 和 RSV 强阳性样品阴性符合率为 100%, 检测 FluA、FluB 和 RSV 强阳性与博卡病毒阳性混合样品时阳性检出率为 100%; 确认上述病原体与该试剂盒不存在交叉且无干扰。

抗干扰能力确认标准: 中强阳样品实验组和对照组阳性检出率为 100%, 且实验组和对照组检测结果 CT 值平均值绝对偏差 ≤ 1 ; 弱阳实验组和对照组阳性检出率均为 100%; 实验组和对照组阴性符合率均为 100%。

3.4 检出限确认

将标准品稀释至 100000 copies/mL、10000 copies/mL、1000 copies/mL、500 copies/mL 和 250 copies/mL, 用同一批次重复检测 3 次。确定 3 次重复均能检出的最低浓度为 C_y , 再将 10 倍 C_y 浓度 (标记为 10 C_y) 的样品分别稀释至浓度 10 C_y 、3.16 C_y 、 C_y 、 $C_y/3.16$ 、 $C_y/10$, 每个浓度重复检测 10 次, 将得到的数据进行 Probit 分析, 95%阳性检出率对应的测量浓度即为 LoD。

检出限确认统计分析结果

样品浓度	检测阳性数 (n)	总数 (N)	阳性检出率 (%)
1×10 ⁵ copies/mL	3	3	100%
1×10 ⁴ copies/mL	3	3	100%
1×10 ³ copies/mL	3	3	100%
5×10 ² copies/mL	2	3	66.7%
2.5×10 ² copies/mL	2	3	66.7%
1×10 ² copies/mL	1	3	33.3%

样品浓度	检测阳性数 (n)	总数 (N)	阳性检出率 (%)
1×10 ⁴ copies/mL	10	10	100%
3.16×10 ³ copies/mL	10	10	100%
1×10 ³ copies/mL	10	10	100%
3.16×10 ² copies/mL	1	10	10%
1×10 ² copies/mL	1	10	10%

经 Probit 方法分析知 95%置信水平对应的浓度为 890.54 copies/mL，因此博卡病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）的 LoD 确认为 891 copies/mL。

确认结论：根据 Probit 分析结果表明最低检出限为 891 copies/mL。

4. 总结

准确度：本试剂盒敏感性（SE）和特异性（SP）均为 100%。

精密性：本试剂盒检测两个浓度水平的阳性样品的批内、批间和实验室内检测结果 CT 值的变异系数 CV 值均 ≤5%，且阳性检出率 100%；阴性样本的阴性符合率 100%。

交叉反应：本试剂盒与甲型流感病毒（FluA）、乙型流感病毒（FluB）和呼吸道合胞病毒（RSV）无交叉且无干扰反应。

抗干扰：对总胆红素（300μmol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）无干扰。

检出限（LoD）：本试剂盒的最低检出限为 891 Copies/mL

6.4.2 人偏肺病毒定性检测系统性能确认

项目：人偏肺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

确认依据：

本技术规范

1. 检测系统概述：

检测方法	PCR-荧光探针法	检测日期	2024.01.24
检测设备	ABI7500 实时荧光 PCR 仪		
检测试剂	人偏肺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）		

2. 性能确认指标

2.1 准确度：敏感性（SE）和特异性（SP）均为 100%。

2.2 精密度: 批内、批间和实验室内检出结果 CT 值的变异系数 CV 值均 $\leq 5\%$; 阳性检出率均为 100%; 阴性符合率为 100%。

2.3 分析特异性

2.3.1 交叉反应: 与甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 无交叉且无干扰反应。

2.3.2 抗干扰: 对总胆红素 (300 $\mu\text{mol/L}$)、甘油三酯 (6 mmol/L) 和血红蛋白 (20 g/L) 无干扰。

2.4 检出限 (LoD): 510 Copies/mL

3. 性能确认方法和结果判断

3.1 准确度确认

用待评估检测系统检测已知标品, 确认本的准确度即敏感性 (SE) 和特异性 (SP)。

标品编号	预期结果	验证结果	是否接受 (Y/N)
S1	+	+	Y
S2	+	+	Y
S3	+	+	Y
S4	-	-	Y
S5	-	-	Y
S6	-	-	Y
S7	-	-	Y
S8	+	+	Y
S9	+	+	Y
S10	+	+	Y
S11	+	+	Y
S12	+	+	Y
S13	+	+	Y
S14	+	+	Y
S15	+	+	Y

确认结论: 通过上述检测确认该试剂盒敏感性 (SE) 和特异性 (SP) 均为 100%。

3.2 精密度确认:

不同操作者分别用相同样品在不同的实验室, 使用不同批次的试剂, 在不同的仪器上分别每天进行一轮检测, 每个浓度重复检测 2 次, 持续检测 20 天; 且样品应至少包含 3 个浓度水平: 阴性样品、弱阳性样品和阳性样品。

精密度确认结果统计

检测天数	重复	中阳样品	弱阳样品	阴性样品
第 1 天-1	重复 1	29.77	35.16	/
	重复 2	29.96	34.36	/
第 1 天-2	重复 1	29.13	34.51	/
	重复 2	29.26	35.49	/
第 2 天-1	重复 1	30.16	34.60	/
	重复 2	29.97	36.12	/

第 2 天-2	重复 1	29.75	34.57	/
	重复 2	29.12	35.88	/
第 3 天-1	重复 1	29.13	35.91	/
	重复 2	28.92	34.71	/
第 3 天-2	重复 1	29.04	35.67	/
	重复 2	29.16	34.55	/
第 4 天-1	重复 1	29.94	35.44	/
	重复 2	29.02	35.46	/
第 4 天-2	重复 1	29.29	34.67	/
	重复 2	29.32	34.97	/
第 5 天-1	重复 1	29.08	36.11	/
	重复 2	28.79	35.35	/
第 5 天-2	重复 1	29.35	34.49	/
	重复 2	29.95	35.24	/
第 6 天-1	重复 1	29.64	36.06	/
	重复 2	29.74	36.16	/
第 6 天-2	重复 1	29.57	35.94	/
	重复 2	29.29	35.34	/
第 7 天-1	重复 1	28.86	35.14	/
	重复 2	29.49	34.99	/
第 7 天-2	重复 1	30.04	34.98	/
	重复 2	29.99	34.93	/
第 8 天-1	重复 1	29.39	35.45	/
	重复 2	29.83	35.54	/
第 8 天-2	重复 1	29.24	34.81	/
	重复 2	30.09	34.81	/
第 9 天-1	重复 1	29.28	34.64	/
	重复 2	29.25	35.69	/
第 9 天-2	重复 1	29.63	36.04	/
	重复 2	29.67	36.25	/
第 10 天-1	重复 1	29.51	36.10	/
	重复 2	29.00	34.44	/
第 10 天-2	重复 1	29.03	36.14	/
	重复 2	29.63	35.82	/
第 11 天-1	重复 1	29.11	34.63	/
	重复 2	29.17	35.84	/
第 11 天-2	重复 1	30.20	34.67	/
	重复 2	29.82	35.86	/
第 12 天-1	重复 1	29.94	36.16	/
	重复 2	28.72	34.87	/
第 12 天-2	重复 1	29.47	34.60	/
	重复 2	29.04	35.06	/
第 13 天-1	重复 1	30.08	36.04	/

	重复 2	30.19	35.70	/
第 13 天-2	重复 1	29.91	34.34	/
	重复 2	30.06	35.47	/
第 14 天-1	重复 1	29.13	36.02	/
	重复 2	28.71	35.72	/
第 14 天-2	重复 1	30.16	35.84	/
	重复 2	29.19	35.46	/
第 15 天-1	重复 1	29.35	34.78	/
	重复 2	29.89	35.08	/
第 15 天-2	重复 1	28.74	35.12	/
	重复 2	30.07	34.43	/
第 16 天-1	重复 1	28.72	35.37	/
	重复 2	29.52	35.90	/
第 16 天-2	重复 1	30.08	35.42	/
	重复 2	29.99	35.81	/
第 17 天-1	重复 1	29.38	35.54	/
	重复 2	29.32	34.31	/
第 17 天-2	重复 1	30.10	35.48	/
	重复 2	30.06	35.86	/
第 18 天-1	重复 1	28.90	35.06	/
	重复 2	29.28	36.21	/
第 18 天-2	重复 1	29.00	35.70	/
	重复 2	28.99	35.00	/
第 19 天-1	重复 1	28.81	34.83	/
	重复 2	28.91	36.10	/
第 19 天-2	重复 1	29.48	35.76	/
	重复 2	30.01	34.59	/
第 20 天-1	重复 1	30.11	34.53	/
	重复 2	30.13	35.02	/
第 20 天-2	重复 1	29.40	36.02	/
	重复 2	28.80	34.74	/
检出率	/	100%	100%	/
均值	/	29.48	35.32	/
批内标准差 (S_r)	/	2.128E-01	2.415E-01	/
批间方差 (S_b^2)	/	1.42E-03	9.04E-04	/
实验室内标准差 (S_l)	/	1.94E-01	2.18E-01	/
批内精密度的 CV (%)	/	0.72%	0.68%	/
批间精密度的 CV (%)	/	0.13%	0.09%	/
实验室内精密度的 CV (%)	/	0.55%	0.62%	/

确认结论：两个浓度水平的阳性样品的批内、批间和实验室内检测结果 CT 值的变异系数 CV 值均 $\leq 5\%$ ，且阳性检出率 100%；阴性样本的阴性符合率 100%。

3.3 分析特异性确认:

3.3.1 交叉反应确认

分别用人偏肺病毒核酸检测试剂盒检测甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 强阳样品各 1 例, 每个样品重复检测三次; 分别用强阳甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 与人偏肺病毒进行混合, 混合后甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒病毒 (FluB) 和呼吸道合胞病毒 (RSV) 终浓度为强阳, 人偏肺病毒为 3LoD。

3.3.2 抗干扰能力确认

将病毒检测结果为中强阳性、临界阳性 (3LoD) 和阴性的样品分为两组, 一组为实验组, 另一组为对照组。实验组分别加入总胆红素 (300 μ mol/L)、甘油三酯 (6mmol/L) 和血红蛋白 (20g/L); 对照组加入等体积的生理盐水, 同时用 3 批试剂进行检测, 每个样品重复检测 3 次。

交叉反应结果统计表

样品名称	样品类型	终浓度	检测结果 (阳性检出次数/总检测次数)		交叉情况
			阴性样品	3 \times LoD 阳性样品	
人偏肺病毒	临床样品	3 \times 10 ³ copies/mL	0/3	3/3(100%)	/
甲型流感病毒	病毒培养液	1 \times 10 ⁷ copies/mL	0/3	3/3(100%)	不存在交叉
乙型流感病毒	病毒培养液	1 \times 10 ⁷ copies/mL	0/3	3/3(100%)	不存在交叉
呼吸道合胞病毒	病毒培养液	1 \times 10 ⁷ copies/mL	0/3	3/3(100%)	不存在交叉

干扰试验结果统计表

样品类型	样品浓度	干扰物质浓度	批次 1			批次 2			批次 3		
			CT 值平均值	平均值绝对偏差	是否抑制在接受范围	CT 值平均值	平均值绝对偏差	是否在接受范围	CT 值平均值	平均值绝对偏差	是否在接受范围
人偏肺病毒	中强阳	生理盐水	29.51	/	/	29.44	/	/	29.67	/	/
人偏肺病毒	中强阳	总胆红素 (300 μ mol/L)	29.49	0.02	是	29.35	0.09	是	29.58	0.09	是
人偏肺病毒	中强阳	甘油三酯 (6mmol/L)	29.15	0.36	是	29.39	0.05	是	29.56	0.12	是
人偏肺病毒	中强阳	血红蛋白 (20g/L)	29.55	0.03	是	29.43	0.01	是	29.55	0.12	是
人偏肺病毒	临界阳	生理盐水	35.30	/	/	35.20	/	/	34.78	/	/
人偏肺病毒	临界阳	总胆红素 (300 μ mol/L)	35.45	0.15	是	34.73	0.47	是	35.48	0.70	是
人偏肺病毒	临界阳	甘油三酯 (6mmol/L)	34.97	0.33	是	35.83	0.63	是	35.70	0.92	是
人偏肺病毒	临界阳	血红蛋白 (20g/L)	34.82	0.49	是	35.10	0.10	是	35.22	0.45	是

人偏肺病毒	阴性	生理盐水	/	/	/	/	/	/	/	/	/
人偏肺病毒	阴性	总胆红素 (300 μ mol/L)	/	/	是	/	/	是	/	/	是
人偏肺病毒	阴性	甘油三酯 (6mmol/L)	/	/	是	/	/	是	/	/	是
人偏肺病毒	阴性	血红蛋白 (20g/L)	/	/	是	/	/	是	/	/	是

确认结论：

交叉反应确认标准：人偏肺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）检测 FluA、FluB 和 RSV 强阳性样品阴性符合率为 100%，检测 FluA、FluB 和 RSV 强阳性与人偏肺病毒阳性混合样品时阳性检出率为 100%；确认上述病原体与该试剂盒不存在交叉且无干扰。

抗干扰能力确认标准：中强阳样品实验组和对照组阳性检出率为 100%，且实验组和对照组检测结果 CT 值平均值绝对偏差 ≤ 1 ；弱阳实验组和对照组阳性检出率均为 100%；实验组和对照组阴性符合率均为 100%。

3.4 检出限确认

将标准品稀释至 100000 copies/mL、10000 copies/mL、1000 copies/mL、500 copies/mL 和 250 copies/mL，用同一批次重复检测 3 次。确定 3 次重复均能检出的最低浓度为 C_y ，再将 10 倍 C_y 浓度（标记为 10 C_y ）的样品分别稀释至浓度 10 C_y 、3.16 C_y 、 C_y 、 $C_y/3.16$ 、 $C_y/10$ ，每个浓度重复检测 10 次，将得到的数据进行 Probit 分析，95%阳性检出率对应的测量浓度即为 LoD。

检出限确认统计分析结果

样品浓度	检测阳性数 (n)	总数 (N)	阳性检出率 (%)
1×10 ⁵ copies/mL	3	3	100%
1×10 ⁴ copies/mL	3	3	100%
1×10 ³ copies/mL	3	3	100%
5×10 ² copies/mL	3	3	100%
2.5×10 ² copies/mL	2	3	66.7%
1×10 ² copies/mL	1	3	33.3%

样品浓度	检测阳性数 (n)	总数 (N)	阳性检出率 (%)
5×10 ³ copies/mL	10	10	100%
1.58×10 ³ copies/mL	10	10	100%
5×10 ² copies/mL	9	10	90%
1.58×10 ² copies/mL	7	10	70%
5×10 ¹ copies/mL	0	10	0

经 Probit 方法分析知 95%置信水平对应的浓度为 509.865copies/mL，因此该试剂盒的 LoD 确认为 510 copies/mL。

确认结论：根据 Probit 分析结果表明最低检出限为 510 copies/mL。

4. 总结

准确度：本试剂盒敏感性（SE）和特异性（SP）均为 100%。

精密性：本试剂盒检测两个浓度水平的阳性样品的批内、批间和实验室内检测结果 CT 值的变异系数 CV 值均 ≤5%，且阳性检出率 100%；阴性样本的阴性符合率 100%。

交叉反应：本试剂盒与甲型流感病毒（FluA）、乙型流感病毒（FluB）和呼吸道合胞病毒（RSV）无交叉且无干扰反应。

抗干扰：对总胆红素（300μmol/L）、甘油三酯（6mmol/L）和血红蛋白（20g/L）无干扰。

检出限（LoD）：本试剂盒的最低检出限为 510 Copies/mL

七、 实验结论

根据在不同检测系统的性能验证和确认实验结论，本技术规范所规定的性能验证和确认技术指标科学合理，可以有效反应 PCR 检测系统的性能，并通过有效的验证和确认确保该检测系统的结果准确可靠。因此《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》适用于对 PCR 核酸检测系统的性能验证和确认。