

WS

中 华 人 民 共 和 国 卫 生 行 业 标 准

WS/T 10042—2025

污水中新型冠状病毒监测技术规范

Technical specification for surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater

2025-12-29 发布

2026-06-01 实施

国家疾病预防控制局 发 布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 监测方案制定	2
5 监测点位布设	2
5.1 基本原则	2
5.2 监测点分类	2
5.3 采样点设置	2
6 样本采集和运输	2
6.1 采样设备和器材	2
6.2 采样方式	2
6.3 采样频次	2
6.4 样本采集	2
6.5 样本运输	3
6.6 样本交接	3
7 实验室检测	3
7.1 病毒灭活	3
7.2 病毒富集浓缩和核酸检测	3
7.3 结果计算	3
7.4 实验室安全	3
8 数据管理与报告	4
8.1 数据采集	4
8.2 数据核查和处理	4
8.3 结果报告	4
8.4 数据安全	4
附录 A（规范性）病毒富集浓缩和核酸检测	5
附录 B（规范性）结果计算	13
参考文献	14

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家疾病预防控制标准委员会传染病标准专业委员会提出，由国家疾病预防控制局归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、清华大学、中国科学院生态环境研究中心、香港大学、深圳市疾病预防控制中心、广东省公共卫生研究院。

本文件主要起草人：张岚、唐宋、张晓、姚孝元、黄霞、杨敏、张彤、扈庆华、陆靖、韩嘉艺、李霞、邢方潇、田哲、许晨阳、李迎慧、邓好、阳海怡、张良、孙惠惠、邓富昌、杜琛、于丽娜、刘艳臣、郑夏婉、杨颖、徐晓庆。

污水中新型冠状病毒监测技术规范

1 范围

本文件规定了污水中新型冠状病毒监测方案制定、监测点位布设、样本采集和运输、实验室检测、数据管理与报告等内容。

本文件适用于污水中新型冠状病毒的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 8170 数据修约规则与极限数值的表示和判定
- GB 18466 医疗机构水污染物排放标准
- WS/T 697 新冠肺炎疫情期间特定人群个人防护指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

污水 wastewater

排入污水管网系统的污水的总称，主要来源包括居民区、学校、医疗机构、商业服务机构及各种公共设施等。

3.2

新型冠状病毒 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2

属于 β 属冠状病毒，基因组为线性单股正链的RNA病毒，全长约30 kb，有包膜，呈圆形或椭圆形颗粒状，直径为60 nm~140 nm。

注：简称新冠病毒。

3.3

瞬时污水样本 instantaneous wastewater sample

在采样点位某一时间点随机采集的污水样本。

3.4

混合污水样本 composite wastewater sample

将在同一采样点位不同时间点采集的瞬时污水样本混合后形成的污水样本。

3.5

实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 reverse transcription quantitative real-time PCR; RT-qPCR

使用逆转录酶以RNA为模板在引物作用下合成互补DNA（cDNA），随后以cDNA为模板进行聚合酶链式反应（PCR）扩增待检测片段，并通过实时采集扩增过程产生的荧光信号实现对模板中目标片段的定量检测。

3.6

辣椒轻斑驳病毒 pepper mild mottle virus; PMMoV

属于烟草花叶病毒属，基因组为线性单股正链的RNA病毒，全长约6.3 kb，无包膜，呈直杆状，长度约为300 nm，直径约为18 nm，是辣椒及相关制品中的常见病毒，普遍存在于人类粪便及生活污水中。

4 监测方案制定

监测方案的主要内容包括但不限于监测目的、监测点位、采样方式、采样频次、采样设备和器材、样本运输和交接、检测方法、数据管理与报告等。

5 监测点位布设

5.1 基本原则

5.1.1 监测点布设位置应根据监测需求确定，考虑监测点的代表性和空间分布的均衡性，避免布点过于集中或过于分散。

5.1.2 开展长期监测时，监测点宜保持相对稳定。

5.2 监测点分类

5.2.1 污水厂监测点：选择污水处理厂（再生水厂）作为监测点，反映其覆盖区域内总体的病毒载量。

5.2.2 重点场所监测点：选择大型居民社区、大型商超、农集贸市场、机场、医疗机构、学校、养老机构等人口密集区或流行病高风险区的污水排放点作为监测点，反映该场所的病毒载量。

5.3 采样点设置

5.3.1 污水厂监测点：采样点宜布设在污水处理厂（再生水厂）进水口。

5.3.2 重点场所监测点：采样点宜布设在监测区域下游距离重点场所最近的污水排水口或检查井。

6 样本采集和运输

6.1 采样设备和器材

6.1.1 自动采样器：应满足定时定量连续采样要求，宜具有冷藏功能（0℃~4℃）和冲洗功能。

6.1.2 采样容器：无菌采样瓶、一次性无菌采样袋或采样桶，可选用玻璃、聚乙烯等材质。采样容器内壁表面应光滑，易于清洗，并应具备合适的机械强度、良好的密封性。

6.1.3 其他用品：防水记号笔、标签、样本运输袋、医疗废物收集袋、消毒剂和消毒用具、样本转运冷藏箱、个人防护用品等。

6.2 采样方式

6.2.1 宜采集混合污水样本，也可根据需要采集瞬时污水样本。

6.2.2 采集混合污水样本时宜使用自动采样器，瞬时污水样本可使用自动采样器，也可人工直接采集。

6.2.3 采集混合污水样本时，宜在等时间间隔采集与污水流量等比例体积的污水形成混合样本，条件不具备时可在等时间间隔采集等体积的污水形成混合样本。

6.3 采样频次

6.3.1 根据监测数据及疾病流行实际情况确定采样频次。

6.3.2 采集污水处理厂（再生水厂）污水样本时，可采集24 h混合污水样本，每1 h采集一次，也可根据实际情况进行设定。

6.3.3 采集重点场所污水样本时，可选择人群排泄集中的时间段采集3 h或运营全时段的混合污水样本，每15 min或30 min采集一次，也可根据实际情况进行设定。

6.4 样本采集

6.4.1 混合污水样本采集

6.4.1.1 采样前应保证采样设备和采样容器的清洁。重复使用的采样容器在每次使用后都应对其进行消毒处理，具体参照《消毒剂使用指南》中对物体表面的消毒要求选择适宜的消毒剂及其使用方法，消毒处理后用纯水冲洗干净。

6.4.1.2 按照自动采样器说明书设定采样时间、采样体积等参数，启动采样程序，待程序内设定的全部污水样本采集结束后，将所有采样瓶中的污水样本倒入同一个采样容器中并混合均匀（如采样时污水样本已混合的可省略此步骤），然后移取不少于病毒富集浓缩所需体积的混合污水样本至另一个采样瓶（袋、桶）中。

6.4.1.3 自动采样器应进行定期维护和校准。

6.4.2 瞬时污水样本采集

6.4.2.1 采样前应保证采样容器的清洁。重复使用的采样容器消毒处理方法见 6.4.1.1。

6.4.2.2 直接采集不少于病毒富集浓缩所需体积的瞬时污水样本至采样容器中。

6.4.3 空白样本采集

在每批样本采集过程中应使用纯水制备空白样本，采集空白样本的容器、人员、时间和环境空间、流程应与污水样本的采集完全一致。

6.4.4 样本现场处理

6.4.4.1 应使用 75%酒精对采样瓶（袋、桶）的外表面进行消毒，然后将其装入密封采样袋中，使用 75%酒精对密封采样袋外表面再次进行消毒。

6.4.4.2 在采样瓶（袋、桶）上粘贴标签或用防水记号笔标记，注明采样点位、样本编号、采样日期和时间等。

6.5 样本运输

污水样本采集后应在 0℃~4℃冷藏条件下由专人运输至实验室，并在样本采集后的 24 h 内开始实验室检测。

6.6 样本交接

采样人员与实验室接样人员进行样本交接时，应清点和检查样本，并在交接记录上签字。交接记录内容包括但不限于交接日期和时间、样本数量和性状、保存和运输方式、交样人和接样人等信息。

7 实验室检测

7.1 病毒灭活

将污水样本、空白样本分别进行充分混匀，然后置于 60℃水浴中保持 30 min，水浴液面应高于样本液面。

7.2 病毒富集浓缩和核酸检测

按照附录A的要求进行。空白样本应与同批采集的污水样本采用相同的流程进行新冠病毒核酸同步检测。

7.3 结果计算

按照附录B的要求进行。

7.4 实验室安全

7.4.1 实验室管理

病毒灭活、富集浓缩和核酸检测等操作应在符合生物安全相关要求的实验室进行。

7.4.2 人员防护

按照 WS/T 697 的要求执行。

7.4.3 废弃物处置

采样和检测人员使用过的个人防护用品及检测过程产生的废物按照WS/T 697处理，检测完毕的剩余污水按照GB 18466的要求进行处理。

8 数据管理与报告

8.1 数据采集

8.1.1 数据的采集和报告应遵循准确、真实和客观的原则。

8.1.2 污水样本基本信息数据应包括但不限于：

- a) 地理信息：采样点地址、经纬度等；
- b) 时间信息：采样时间、运输时间、实验室接收时间、检测时间等；
- c) 样本信息：采样体积等。

8.1.3 污水样本特征参数数据包括污水流量，污水处理厂（再生水厂）和医疗机构监测点位宜同时收集 pH、悬浮物、化学需氧量、五日生化需氧量、氨氮及其他可反映污水样本特征的参数信息。

8.1.4 应及时记录数据信息，不应以回忆方式填写，应做到字迹端正、清晰，不应随意篡改。

8.2 数据核查和处理

8.2.1 应按 GB/T 8170 的规则对检测数据进行修约。

8.2.2 应对监测数据进行核查，核查内容应包括对数据源、采样设备、器皿及采样方法的一致性检查、检测方法的合规性检查，确保监测数据可追溯至源头，能客观反映污水中新冠病毒核酸的浓度水平及变化情况。应重点关注缺失值、重复值、离群值和异常值的识别与处理，必要时应借助统计方法进行判别。

8.2.3 所有对缺失值、重复值、离群值和异常值的处理，包括补充、删除、修改或更正操作，都应记录详细过程，包括修改的理由、方法和结果，修改后应进行二次核验，确保其符合监测要求，同时应妥善保存修改记录。

8.2.4 监测数据的完整性和一致性应定期进行验证，确保数据在收集、存储、处理和传输过程中的准确性。

8.3 结果报告

8.3.1 检测报告内容应至少包括 8.1.2 中规定的污水样本基本信息、样本编号、检测方法、样本检测结果（污水样本中新冠病毒核酸浓度）、质量控制信息（空白样本检测结果、标准曲线扩增效率 E 和相关系数 R^2 、PMMoV 核酸回收率）等。

8.3.2 检测报告后应附原始记录，原始记录内容至少应包括标准曲线及制作过程、仪器型号及工作参数、核酸提取和检测试剂盒信息、病毒富集及核酸检测原始记录、病毒核酸浓度计算过程、质量控制记录等；原始记录应包含足够的信息，以便在可能情况下识别影响检测结果的因素，并使实验室检测工作可在最接近原来条件下复现。

8.4 数据安全

数据管理应由专人负责，数据安全管理人员应按照全面覆盖、分级保护、守法合规等原则，从物理安全、网络安全、运行安全、数据库安全等方面保证数据安全。

附 录 A
(规范性)
病毒富集浓缩和核酸检测

A.1 病毒富集浓缩

A.1.1 聚乙二醇沉淀法

A.1.1.1 原理

向污水中加入聚乙二醇,聚乙二醇在一定盐浓度条件下可使病毒颗粒形成多聚体,在一定离心力下将水溶液与病毒颗粒多聚体分开,收集病毒颗粒多聚体形成的沉淀,用于后续核酸提取和RT-qPCR检测。方法检出限为 10^0 copies/mL浓度水平。

A.1.1.2 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水为GB/T 6682规定的一级水。

A.1.1.2.1 聚乙二醇:平均相对分子质量为8 000。

A.1.1.2.2 氯化钠。

A.1.1.2.3 带盖离心管:1.5 mL、50 mL,无菌,无核酸酶,材质为聚丙烯。

A.1.1.2.4 移液器吸头:1 mL,带滤芯,无菌,无核酸酶,材质为聚丙烯。

A.1.1.2.5 移液管:50 mL,无菌,材质为聚丙烯。

A.1.1.3 仪器和设备

A.1.1.3.1 低温摇床:4 ℃。

A.1.1.3.2 冷冻离心机:4 ℃,50 mL 转子,可承受离心力 $\geq 5\,000\text{ g}$;4 ℃,1.5 mL 或 2 mL 转子,可承受离心力 $\geq 20\,000\text{ g}$ 。

A.1.1.3.3 微型瞬时离心机:配备1.5 mL 或 2 mL 转子,可承受离心力 $\geq 2\,000\text{ g}$ 。

A.1.1.3.4 电子天平:感量不低于0.001 g。

A.1.1.3.5 生物安全柜:II级。

A.1.1.3.6 高压蒸汽灭菌器。

A.1.1.3.7 移液器:1 mL、50 mL。

A.1.1.3.8 涡旋混匀器。

A.1.1.4 富集浓缩步骤

A.1.1.4.1 预离心

如果污水样本悬浮物含量过高,可采用低速离心去除较大的悬浮物后再进行后续富集。预离心会造成病毒损失,故在悬浮固体质量浓度 $\leq 400\text{ mg/L}$ 的情况下不宜进行预离心处理,操作时可根据污水摇匀后是否有明显可见的大粒径颗粒物作为是否需要预离心的判定标准。预离心操作为:取适量污水样本在4 ℃ $2\,000\text{ g}$ 条件下离心2 min,留取上清液备用。离心机停止转动后应立即转移上清液,防止沉淀再次悬浮。剩余污水样本作为备份。

A.1.1.4.2 第二次离心

分别称取 $4.0\text{ g}\pm 0.1\text{ g}$ 聚乙二醇和 $0.80\text{ g}\pm 0.01\text{ g}$ 氯化钠,放入1个新的50 mL离心管中,用移液器将40 mL污水样本或预离心后的上清液转移至上述离心管中,充分混匀至聚乙二醇完全溶解后置于低温摇床中,在4 ℃ 150 r/min条件下振荡120 min。将振荡后样本在4 ℃ $4\,800\text{ g}$ 条件下离心45 min,弃除上清液,保留1 mL液体反复吹吸沉淀,瞬时离心,将所有液体转移至1.5 mL离心管中。倾倒上清液时,动作应缓慢,避免因发生振动导致沉淀再次悬浮。

A.1.1.4.3 第二次浓缩

将A.1.1.4.2中的1.5 mL离心管在4 ℃ 20 000 g条件下离心8 min, 弃除上清液至剩余500 μL, 充分涡旋混匀, 得到病毒浓缩液。于0 ℃~4 ℃条件下保存, 并于24 h内完成核酸提取和RT-qPCR检测。

A.1.2 铝盐混凝沉淀法

A.1.2.1 原理

向污水中加入铝盐混凝剂, 铝盐水解产生的氢氧化铝胶体可吸附和包裹病毒颗粒, 通过离心作用收集含病毒的胶体, 然后通过化学溶解释放出包裹的病毒颗粒, 用于后续核酸提取和RT-qPCR检测。方法检出限为 10^0 copies/mL浓度水平。

A.1.2.2 试剂和材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 试验用水为GB/T 6682规定的一级水。

A.1.2.2.1 氯化铝溶液[$c(\text{AlCl}_3)=0.3 \text{ mol/L}$]: 称取4 g 无水氯化铝, 置于烧杯中, 加入100 mL 水, 搅拌溶解后转移至试剂瓶中。

A.1.2.2.2 氢氧化钠溶液[$c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$]: 称取4 g 氢氧化钠, 置于烧杯中, 加入100 mL 水, 搅拌溶解后转移至试剂瓶中。

A.1.2.2.3 盐酸溶液[$c(\text{HCl})=1 \text{ mol/L}$]: 移取43 mL 浓盐酸($\rho_{20}=1.19 \text{ g/mL}$)于烧杯中, 加入适量水, 用玻璃棒搅拌混匀后转移至500 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。

A.1.2.2.4 乙二胺四乙酸二钠二水合物($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 纯度 $\geq 98\%$ 。

A.1.2.2.5 螺口锥形瓶: 100 mL, 无菌。

A.1.2.2.6 带盖离心管: 10 mL、50 mL, 无菌, 无核酸酶, 材质为聚丙烯。

A.1.2.2.7 移液器吸头: 200 μL、1 mL, 带滤芯, 无菌, 无核酸酶, 材质为聚丙烯。

A.1.2.2.8 移液管: 50 mL, 无菌, 材质为聚丙烯。

A.1.2.3 仪器和设备

A.1.2.3.1 冷冻离心机: 4 ℃, 50 mL 转子, 可承受离心力 $\geq 2\,000 \text{ g}$ 。

A.1.2.3.2 恒温振荡培养箱。

A.1.2.3.3 电子天平: 感量不低于0.001 g。

A.1.2.3.4 pH 计: 精度 ≥ 0.01 。

A.1.2.3.5 水浴锅。

A.1.2.3.6 生物安全柜: II 级。

A.1.2.3.7 高压蒸汽灭菌器。

A.1.2.3.8 移液器: 200 μL、1 mL、50 mL。

A.1.2.4 富集浓缩步骤

A.1.2.4.1 预离心

如果污水样本悬浮物含量过高, 可采用低速离心去除较大的悬浮物后再进行后续富集。预离心会造成病毒损失, 故在悬浮固体质量浓度 $\leq 400 \text{ mg/L}$ 的情况下不宜进行预离心处理, 操作时可根据污水摇匀后是否有明显可见的大粒径颗粒物作为是否需要进行预离心的判定标准。预离心操作为: 取适量污水样本在4 ℃ 2 000 g条件下离心2 min, 留取上清液备用。离心机停止转动后应立即转移上清液, 防止沉淀再次悬浮。剩余污水样本作为备份。

A.1.2.4.2 絮凝处理

用移液器将50 mL污水样本或预离心后的上清液转移至100 mL螺口锥形瓶中, 加入0.5 mL 0.3 mol/L 的氯化铝溶液, 用1 mol/L氢氧化钠溶液或1 mol/L盐酸溶液调节水样pH为 6.0 ± 0.1 。将螺口锥形瓶瓶盖拧紧, 置于恒温振荡培养箱中, 以150 r/min的速度在室温下振荡15 min。

A. 1. 2. 4. 3 离心分离

将水样转移至50 mL离心管中，在4 ℃、1 900 g条件下离心5 min。

A. 1. 2. 4. 4 络合溶解

倾倒弃除离心管中的上清液，在剩余胶体中加入 $0.10\text{ g} \pm 0.01\text{ g}$ 乙二胺四乙酸二钠二水合物，摇晃数十次至胶体变为液态，转移至10 mL离心管中。将10 mL离心管置于水浴锅中，60 ℃水浴10 min。水浴后离心管中的液体即为该水样的病毒浓缩液，体积约为1 mL，于0 ℃~4 ℃条件下保存，并于24 h内完成核酸提取和RT-qPCR检测。

A. 1. 3 超滤法

A. 1. 3. 1 原理

使用一定截留分子量的超滤膜对污水进行过滤，过滤过程中污水中的病毒颗粒会被超滤膜截留并富集于超滤膜表面的膜污染层中，刮取膜污染层对病毒进行回收，重新定容，用于后续核酸提取和RT-qPCR检测。方法检出限为 10^0 copies/mL浓度水平。

A. 1. 3. 2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，试验用水为GB/T 6682规定的一级水。

A. 1. 3. 2. 1 氨丁三醇-乙二胺四乙酸缓冲液：pH=8.0，其中氨丁三醇（Tris）浓度为0.01 mol/L，乙二胺四乙酸（EDTA）浓度为0.001 mol/L，无菌，无核酸酶。

A. 1. 3. 2. 2 75%酒精。

A. 1. 3. 2. 3 超滤膜：直径为90 mm、100 mm或142 mm，材质为聚醚砜或聚砜，切割分子质量不大于100 kDa，应具有致密的表面分离层。

A. 1. 3. 2. 4 刮刀：材质为聚四氟乙烯，尺寸应可放入1.5 mL或2 mL离心管，使用前用75%酒精进行浸泡消毒。

A. 1. 3. 2. 5 镊子：材质为不锈钢。

A. 1. 3. 2. 6 带盖离心管：1.5 mL或2 mL，无菌，无核酸酶，材质为聚丙烯。

A. 1. 3. 2. 7 移液器吸头：1 mL，带滤芯，无菌，无核酸酶，材质为聚丙烯。

A. 1. 3. 2. 8 移液管：50 mL，无菌，材质为聚丙烯。

A. 1. 3. 2. 9 烧杯：200 mL。

A. 1. 3. 3 仪器和设备

A. 1. 3. 3. 1 正压过滤器：有效过滤区域直径为90 mm、100 mm或142 mm，耐压 ≥ 0.25 MPa。

A. 1. 3. 3. 2 蠕动泵：最大转速 ≥ 250 r/min。

A. 1. 3. 3. 3 气泵：可提供最大压力 ≥ 0.3 MPa。

A. 1. 3. 3. 4 微型瞬时离心机：配备1.5 mL或2 mL转子，可承受离心力 $\geq 2\,000$ g。

A. 1. 3. 3. 5 生物安全柜：II级。

A. 1. 3. 3. 6 高压蒸汽灭菌器。

A. 1. 3. 3. 7 移液器：1 mL、50 mL。

A. 1. 3. 3. 8 冷冻离心机：4 ℃，50 mL角转子，可承受离心力 $\geq 2\,000$ g。

A. 1. 3. 4 富集浓缩步骤

A. 1. 3. 4. 1 超滤膜预处理

将超滤膜置于密封容器内，使用75%酒精浸泡活化过夜，经活化的超滤膜可于75%酒精内保存直至使用。

A. 1. 3. 4. 2 预离心

如果污水样本悬浮物含量过高,可采用低速离心去除较大的悬浮物后再进行后续富集。预离心会造成病毒损失,故在悬浮固体质量浓度 ≤ 400 mg/L的情况下不宜进行预离心处理,操作时可根据污水摇匀后是否有明显可见的大粒径颗粒物作为是否需要预离心的判定标准。预离心操作为:取适量污水样本在4℃ 2 000 g条件下离心2 min,留取上清液备用。离心机停止转动后应立即转移上清液,防止沉淀再次悬浮。剩余污水样本作为备份。

A.1.3.4.3 超滤浓缩

将A.1.3.4.1中活化的超滤膜光滑面朝上放置于正压过滤器内,确保超滤膜与过滤器紧密贴合并对正压过滤器进行密封固定,随后将正压过滤器与蠕动泵(或气泵)进行连接,应确保连接紧密。使用移液器将100 mL污水样本或预离心后的上清液转移至过滤器储液罐或200 mL烧杯内,启动蠕动泵并调节转速为200 r/min(或打开气泵,调节输出压力为0.2 MPa),直至观察到所有污水滤过超滤膜或等待15 min。由于超滤压力较大,为防止漏水漏气,连接过滤设备时应选择快插接头,并对软管连接处使用喉箍或扎带固定。

A.1.3.4.4 膜污染层回收

待超滤完成后,打开正压过滤器并取出超滤膜,使用刮刀收集超滤膜表面膜污染层,并用刮刀将其转移至事先装有0.8 mL氨丁三醇-乙二醇四乙酸缓冲液的1.5 mL或2 mL离心管内,用手振荡数次后瞬时离心,用镊子将刮刀从离心管中取出。此时离心管内液体即为该水样的病毒浓缩液,体积约为1 mL,于0℃~4℃条件下保存,并于24 h内完成核酸提取和RT-qPCR检测。离心管内分装的缓冲液体积可根据富集倍数的需要调整。

A.1.4 病毒核酸磁珠富集法

A.1.4.1 原理

向污水中加入经不同官能团修饰的磁珠,经修饰的磁珠通过电荷作用富集污水中经裂解后的病毒核酸片段,然后富集有病毒核酸的磁珠在外加磁场的作用下实现磁珠的定向迁移,从而完成污水中病毒核酸的快速富集。方法检出限为 10^1 copies/mL浓度水平。

A.1.4.2 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分子生物学级,配制试剂时使用无核酸酶的超纯水。

A.1.4.2.1 磁珠:表面经过修饰的羟基磁珠悬于缓冲液(50%异丙醇)。

A.1.4.2.2 裂解液:主要成分包括硫氰酸胍(6 mol/L)、缓冲剂[Tris(50 mmol/L)以及EDTA(50 mmol/L)]、曲拉通 X-100(Triton X-100)(1% 体积分数),pH=6.5 \pm 0.1。

A.1.4.2.3 增强液:蛋白酶 K(20 mg/mL)、PBS 缓冲液[NaCl(137 mmol/L) KCl(2.7 mmol/L)Na₂HPO₄(4.3 mmol/L) KH₂PO₄(1.4 mmol/L)],pH=7.3 \pm 0.1。

A.1.4.2.4 洗涤液:乙醇(80% 体积分数)、水。

A.1.4.2.5 洗脱液:Tris(10 mmol/L)、EDTA(1 mmol/L)、水,pH=8.0。

A.1.4.2.6 离心管:50 mL,无菌,材质为聚丙烯,可承受离心力 $\geq 2\,000$ g;1.5 mL、15 mL,无菌,无核酸酶,材质为聚丙烯。

A.1.4.2.7 移液器吸头:200 μ L,1 mL,带滤芯,无菌,无核酸酶,材质为聚丙烯。

A.1.4.2.8 移液管:50 mL,无菌,材质为聚丙烯。

A.1.4.3 仪器和设备

A.1.4.3.1 冷冻离心机:4℃,50 mL 角转子,离心力 $\geq 3\,000$ g。

A.1.4.3.2 生物安全柜:II 级。

A.1.4.3.3 移液器:200 μ L、1 mL、50 mL。

A.1.4.3.4 磁力架:规格为15 mL 离心管。

A.1.4.3.5 振荡混匀仪。

A. 1. 4. 3. 6 水浴锅。

A. 1. 4. 4 富集浓缩步骤

A. 1. 4. 4. 1 预离心

用移液器移取适量污水样本置于50 mL离心管中，在4 ℃ 2 000 g条件下离心2 min，留取上清液备用。剩余污水样本作为备份。

A. 1. 4. 4. 2 样本准备

用移液器转移8 mL上清液至15 mL离心管中，加入2 mL裂解液与100 μL增强液，将管盖拧紧，置于水浴锅中56 ℃孵育15 min。

A. 1. 4. 4. 3 磁珠添加

加入400 μL 20 mg/mL的磁珠（使用前充分重悬磁珠），通过反复倒置或者置于振荡混匀仪让磁珠在污水中充分混匀，转速为90 r/min，时长10 min。

A. 1. 4. 4. 4 结合和分离

磁珠与核酸结合后，将15 mL离心管放置在磁力架上，静置3 min，直至上清液澄清，使用移液器从离心管中吸出并弃除上清液。

A. 1. 4. 4. 5 洗涤

向离心管中加入1 mL洗涤液，轻轻吹打混匀，将磁珠悬液转移至1.5 mL离心管中，振荡混匀30 s。将1.5 mL离心管转移至磁力架上，静置2 min，弃除上清液。加入1 mL洗涤液，振荡混匀30 s，静置2 min，弃除上清液，室温下开盖静置5 min。

A. 1. 4. 4. 6 核酸洗脱

依据后续检测需求加入80 μL~200 μL洗脱液，振荡混匀30 s，置于水浴锅中65 ℃孵育6 min，将离心管放置在磁力架上，静置2 min，移取上清液至新的离心管中，得到病毒核酸浓缩液。于0 ℃~4 ℃条件下保存，并于24 h内完成RT-qPCR检测。

A. 2 新冠病毒核酸检测

A. 2. 1 核酸提取

A. 2. 1. 1 试剂和材料

A. 2. 1. 1. 1 病毒核酸提取试剂盒。实验室在首次使用和更换核酸提取试剂盒时应进行方法验证。

A. 2. 1. 1. 2 无核酸酶水：分子生物学级。

A. 2. 1. 1. 3 带盖离心管：1.5 mL，无菌，无核酸酶，材质为聚丙烯。

A. 2. 1. 1. 4 移液器吸头：10 μL、100 μL、1 mL，带滤芯，无菌，无核酸酶，材质为聚丙烯。

A. 2. 1. 1. 5 其他材料：参照所用病毒核酸提取试剂盒说明书。

A. 2. 1. 2 仪器和设备

A. 2. 1. 2. 1 生物安全柜：II级。

A. 2. 1. 2. 2 高压蒸汽灭菌器。

A. 2. 1. 2. 3 移液器：10 μL、100 μL、1 mL。

A. 2. 1. 2. 4 其他仪器和设备：参照所用病毒核酸提取试剂盒说明书。

A. 2. 1. 3 核酸提取步骤

在生物安全柜中打开装有污水样本或病毒浓缩液的离心管，按照病毒核酸提取试剂盒说明书规定的步骤，取适量污水样本或病毒浓缩液，采用手工或自动核酸提取仪进行核酸提取，提取完成后应立即封盖并马上进行RT-qPCR检测。应优先选择适用于污水等环境样本的核酸提取试剂盒；当病毒浓缩液中存

在大量杂质或浓缩液较黏稠时，应适当增加杂质漂洗次数。剩余的病毒浓缩液和核酸样本应于-80℃条件下冻存。

A.2.2 RT-qPCR检测

A.2.2.1 试剂和材料

A.2.2.1.1 新冠病毒核酸检测试剂盒（荧光PCR法）：应选择新冠病毒通用或特定变异株适用的核酸检测试剂盒，试剂盒检出限宜小于500 copies/mL。实验室在首次使用和更换核酸检测试剂盒时应进行方法验证。

A.2.2.1.2 新冠病毒核酸基因组标准品：有证标准物质。

A.2.2.1.3 标准品稀释液。

A.2.2.1.4 无核酸酶水：分子生物学级。

A.2.2.1.5 移液器吸头：10 μL、100 μL、200 μL、1 mL，带滤芯，无菌，无核酸酶，材质为聚丙烯。

A.2.2.1.6 PCR管或PCR板：无菌，无核酸酶，材质为聚丙烯。

A.2.2.2 仪器和设备

A.2.2.2.1 实时荧光PCR仪。

A.2.2.2.2 混匀器。

A.2.2.2.3 生物安全柜：II级。

A.2.2.2.4 移液器：10 μL、100 μL、200 μL、1 mL。

A.2.2.2.5 其他仪器和设备：参照所用新冠病毒核酸检测试剂盒说明书。

A.2.2.3 检测步骤

A.2.2.3.1 新冠病毒核酸标准曲线绘制

A.2.2.3.1.1 新冠病毒核酸标准物质选择：使用新冠病毒核酸基因组有证标准物质制备标准曲线，标准物质中开放读码框*lab*基因（*ORF1ab*）和核壳蛋白基因（*N*）序列范围应覆盖RT-qPCR检测试剂盒扩增序列。

A.2.2.3.1.2 标准曲线浓度梯度选择：标准曲线应至少设置5个点，将标准物质原溶液依次进行梯度稀释，标准曲线最低点浓度应临近RT-qPCR检测试剂盒检出限，标准曲线浓度范围应覆盖所有样本核酸浓度水平。

A.2.2.3.1.3 标准曲线PCR扩增反应体系配制：按照RT-qPCR检测试剂盒说明书配制反应体系，每个浓度水平核酸样本应取3份用于扩增检测，即做3个平行样本。

A.2.2.3.1.4 标准曲线绘制：将分装好的PCR扩增反应体系按RT-qPCR检测试剂盒说明书中的反应程序对不同浓度的标准物质进行扩增反应，获得Ct值，以同一浓度标准物质的Ct值为纵坐标、浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线，同时获得扩增效率*E*和相关系数*R*²。

A.2.2.3.2 RT-qPCR检测

采用双靶标基因检测，针对*ORF1ab*基因和*N*基因，必要时可根据检测需求和相关规定进行调整。将提取得到的核酸样本按照RT-qPCR试剂盒说明书进行扩增反应体系配制和扩增检测，每个核酸样本应取3份用于扩增检测，即做3个平行样本。

A.3 内标物检测

A.3.1 原理

以污水样本中存在的辣椒轻斑驳病毒（pepper mild mottle virus, PMMoV）为内标物，分别定量检测污水原液和经富集浓缩处理的污水样本中PMMoV核酸浓度，其RT-qPCR检测与新冠病毒核酸

RT-qPCR检测同批次进行，并做PMMoV核酸标准曲线定量，将核酸浓度换算为污水样本PMMoV核酸浓度，通过计算获得PMMoV核酸回收率。

A.3.2 试剂和材料

PMMoV核酸引物和探针如下。

正向引物（F）：5'-GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA-3'。

反向引物（R）：5'-TTGTCGGTTGCAATGCAAGT-3'。

荧光探针（P）：5'-FAM-CCTACCGAAGCAAATG-MGB-3'。

其他所需试剂和材料同A.1和A.2。

A.3.3 仪器和设备

仪器和设备同A.1和A.2。

A.3.4 检测步骤

A.3.4.1 富集浓缩

PMMoV核酸与新冠病毒核酸应同步进行富集浓缩，按照A.1的要求进行。

A.3.4.2 核酸提取

分别提取污水原液和污水富集浓缩液中的PMMoV核酸。提取污水原液（未经过富集浓缩的污水）用于测定PMMoV核酸浓度的试剂盒应含有微量助沉剂，或在提取时额外加入微量助沉剂（如捕获RNA、线性聚丙烯酰胺等）。应优先选择适用于污水等环境样本的核酸提取试剂盒；当浓缩液中存在大量杂质或浓缩液较黏稠时，应适当增加杂质漂洗次数。污水富集浓缩液中的PMMoV和新冠病毒同步进行核酸提取，提取操作参照核酸提取试剂盒说明书。

A.3.4.3 PMMoV 核酸标准曲线绘制

应使用有证的PMMoV核酸标准物质，按照A.2.2.3.1制备PMMoV核酸标准曲线。

A.3.4.4 RT-qPCR 检测

针对复制蛋白基因（*R*）采用单靶标基因检测。对污水原液和经富集浓缩处理的污水样本中PMMoV核酸分别按照RT-qPCR检测试剂盒说明书进行扩增反应体系配制和扩增检测，每个核酸样本应取3份用于扩增检测，即做3个平行样本。

A.3.4.5 PMMoV 核酸回收率计算

A.3.4.5.1 PMMoV 核酸浓度计算

将污水原液和污水富集浓缩液获得的核酸样本PMMoV核酸Ct值的平均值分别代入PMMoV核酸标准曲线，计算核酸样本中PMMoV核酸浓度。按式（A.1）计算污水原液中PMMoV核酸的浓度，按式（A.2）计算用污水富集浓缩液推算得到的污水样本中PMMoV核酸的浓度。

$$C_0 = \frac{C' \times V'}{V_0'} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

C_0 ——污水原液中PMMoV核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；

C' ——经PMMoV核酸标准曲线计算得到的污水原液核酸样本中PMMoV核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；

V' ——污水原液提取得到的核酸样本体积，单位为毫升（mL）；

V_0' ——污水原液体积，单位为毫升（mL）。

$$C_1 = \frac{C_3 \times V_4 \times V_2}{V_3 \times V_1} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

C_1 ——用富集浓缩液推算得到的污水样本中PMMoV核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；
 C_3 ——经PMMoV核酸标准曲线计算得到的富集浓缩液核酸样本中PMMoV核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；
 V_4 ——提取核酸得到的核酸样本体积，单位为毫升（mL）；
 V_2 ——富集浓缩液体积，单位为毫升（mL）；
 V_3 ——提取核酸时所用的浓缩液体积，单位为毫升（mL）；
 V_1 ——经富集浓缩处理的污水样本体积，单位为毫升（mL）。

A. 3. 4. 5. 2 PMMoV 核酸回收率计算

按式（A.3）计算污水样本PMMoV核酸回收率。

$$H = \frac{C_1}{C_0} \times 100 \dots\dots\dots (A. 3)$$

式中：
 H ——PMMoV核酸回收率，%；
 C_1 ——用富集浓缩液推算得到的污水样本中PMMoV核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；
 C_0 ——污水原液中PMMoV核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）。

A. 4 质量控制要求

A. 4. 1 空白样本

空白样本检测结果为阴性，监测过程有效。

A. 4. 2 RT-qPCR反应

标准曲线的扩增效率 E 在90%~110%且相关系数 $R^2 \geq 0.99$ 时，标准曲线有效。

A. 4. 3 PMMoV核酸回收率

PMMoV核酸回收率 $H \geq 5\%$ 时，检测过程有效。

附 录 B (规范性) 结果计算

B.1 RT-qPCR 结果判定

B.1.1 靶标结果判定

当Ct值小于或等于新冠病毒核酸检测试剂盒说明书规定阈值且有S形扩增曲线时，靶标结果判定为阳性；当Ct值大于新冠病毒核酸检测试剂盒说明书规定阈值或无S形扩增曲线时，靶标结果判定为阴性。或参考产品说明书中结果判定相关要求。

B.1.2 污水样本结果判定

当同一份污水样本中新冠病毒2个靶标（*ORF1ab*和*N*）RT-qPCR检测均出现阳性检测结果，即2个靶标的3个平行样本各出现至少1个阳性检测结果，污水样本判定为阳性，例如：*ORF1ab* +/+/-，*N* -/+/-。当同一份污水样本中新冠病毒单靶标（*ORF1ab*或*N*）RT-qPCR检测至少2个平行样本出现阳性检测结果，污水样本判定为阳性，例如：*ORF1ab* +/+/-，*N* -/+/-或*ORF1ab* -/+/-，*N* +/+/-；当出现单个靶标只有1个平行样本为阳性检测结果时，应对该污水样本重新进行富集浓缩和核酸提取，并进行RT-qPCR检测，若仍出现阳性检测结果，则污水样本判定为阳性。对阳性污水样本进行新冠病毒核酸浓度计算。

B.2 新冠病毒核酸浓度计算

将核酸样本的新冠病毒核酸Ct值平均值代入新冠病毒核酸标准曲线中，计算核酸样本中新冠病毒的核酸浓度，并根据式（B.1）将核酸样本中新冠病毒核酸浓度换算成污水样本中新冠病毒核酸浓度*C*。

$$C = \frac{C_2 \times V_4 \times V_2}{V_3 \times V_1 \times H} \quad (\text{B.1})$$

式中：

C——污水样本中新冠病毒核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；

*C*₂——经新冠病毒核酸标准曲线计算得到的核酸样本中新冠病毒核酸浓度，单位为拷贝每毫升（copies/mL）；

*V*₄——提取核酸得到的核酸样本体积，单位为毫升（mL）；

*V*₂——富集浓缩液体积，单位为毫升（mL）；

*V*₃——提取核酸时所用的浓缩液体积，单位为毫升（mL）；

*V*₁——经富集浓缩处理的污水样本体积，单位为毫升（mL）；

H——PMMoV核酸回收率，%。

参 考 文 献

- [1] 消毒剂使用指南（国卫办监督函〔2020〕147号）
-