

ICS 号

中国标准文献分类号



# 团 体 标 准

T/CPMA × × × — × × × ×

## 水中新型冠状病毒检验

Qualitative detection of SARS-CoV-2 in water

(征求意见稿)

× × × × — × — × 发布

× × × × — × — × 实施

中 华 预 防 医 学 会 发 布

## 目 次

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 前 言 .....                      | 3  |
| 1. 范围 .....                    | 4  |
| 2. 规范性引用文件 .....               | 4  |
| 3. 检出限 .....                   | 5  |
| 4. 设备和材料 .....                 | 5  |
| 5. 试剂 .....                    | 6  |
| 6. 检测程序 .....                  | 7  |
| 7. 检测方法 .....                  | 7  |
| 8. 操作步骤 .....                  | 8  |
| 9. 结果报告 .....                  | 11 |
| 10. 水中新冠病毒的感染性滴度检测（选做项目） ..... | 11 |
| 附录 A 全过程质控病毒 .....             | 12 |
| 附录 B 水中新型冠状病毒的感染性滴度检测 .....    | 14 |
| 附录 C 试剂的配制 .....               | 16 |

## 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》的规则起草。

本文件由中华预防医学会提出并归口管理。

本文件起草单位：浙江省疾病预防控制中心、浙江大学医学院附属邵逸夫医院、杭州市拱墅区疾病预防控制中心、杭州市西溪医院、舟山市疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：张严峻、方磊、胡崇高、周晓红、戚建江、王虹玲、周建仓。

# 水中新型冠状病毒检验

## 1. 范围

本文件描述了水中新型冠状病毒的核酸检测方法。

本标准适用于新冠疫情爆发地区生活、医疗、环境、工业、商业等污水中新型冠状病毒的核酸检测以及病毒的感染性检测。

## 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。

GB19489—2019 实验室生物安全通用要求

GB18466 医疗机构水污染物排放标准

WS/T 697—2020 新冠肺炎疫情期间特定人群个人防护指南

病原微生物实验室生物安全管理条例 国务院令 第424号

医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法 卫办医政发【2010】194号

医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册（试行第二版）

危险品安全航空运输技术细则

危险品规则

可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

### **新型冠状病毒 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2**

新型冠状病毒是一种属于β冠状病毒属，有包膜，颗粒呈圆形或椭圆形，表面有刺突，基因组为长约30 kb的单股线性正链RNA，直径约为60 nm-140 nm的病毒。

[来源：WS/T 799-2022，有修改]

### **3.2**

#### **实时荧光 RT-PCR real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction**

在含有逆转录酶的聚合酶链式反应体系中加入含有荧光基团的底物，通过对扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测，实现对起始模板定量及定性的分析方法。

[来源：WS/T 799-2022，有修改]

### **3.3**

#### **疫源地 infectious focus**

现在存在或曾经存在传染源的场所和传染源可能播散病原体的范围。

[来源：GB 19193，3.1]

### **3.4**

#### **Ct 值 cycle threshold**

感染性物质指已知含有或有理由认为含有病原体的物质。

[来源：WS/T 799-2022]

### **3.5**

#### **超滤法 ultrafiltration**

超滤法是利用半透膜的微孔结构，以一定的外界压力(0.1 ~ 0.5 MPa)为推动力，实现对物质的选择性分离、回收的膜分离方法。在污水处理中主要用于分离分子量大于500、直径为0.005 ~ 10 μm的大分子和胶体，如酶、蛋白质、病毒等中低浓度的高分子溶解态及胶体态污染物的分离与回收。

## **3. 检出限**

采用离心超滤法富集浓缩，方法检出限为10 copies/mL。

## **4. 设备和材料**

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 4.1 实时荧光 RT-PCR 扩增仪。
- 4.2 冷冻离心机。
- 4.3 震荡混匀器。
- 4.4 水浴锅。
- 4.5 超低温冰箱：-80℃
- 4.6 普通冰箱：2℃-8℃。
- 4.7 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱。
- 4.8 高压灭菌锅。
- 4.9 水过滤系统。
- 4.10 玻璃纤维素过滤膜：孔径 0.7 μm。
- 4.11 超滤杯：截留分子量为 30 KDa。
- 4.12 无菌水样采集袋。
- 4.13 微量可调移液器：1 μL-10 μL、10 μL-100 μL、100 μL-1000 μL。
- 4.14 洗耳球或电动移液器。
- 4.15 96 孔板。
- 4.16 无核酸酶的离心管、无核酸酶的移液器吸头、无核酸酶的 PCR 薄壁管。
- 4.17 无核酸酶的一次性移液管：10 mL、25 mL。

## 5. 试剂

除特别说明外，所有实验用试剂均为分析纯；实验用水为无核酸酶的超纯水。

- 5.1 全过程质控病毒：制备培养见附录 A。由具有相关资质的单位提供。-80℃低温冰箱保存。
- 5.2 新型冠状病毒核酸提取试剂盒。
- 5.3 二巯基乙醇。
- 5.4 75%乙醇。
- 5.5 细胞生长液：见附录 C.4。
- 5.6 细胞维持液：见附录 C.5。

6. 检测程序

新冠病毒检测程序见图 1。

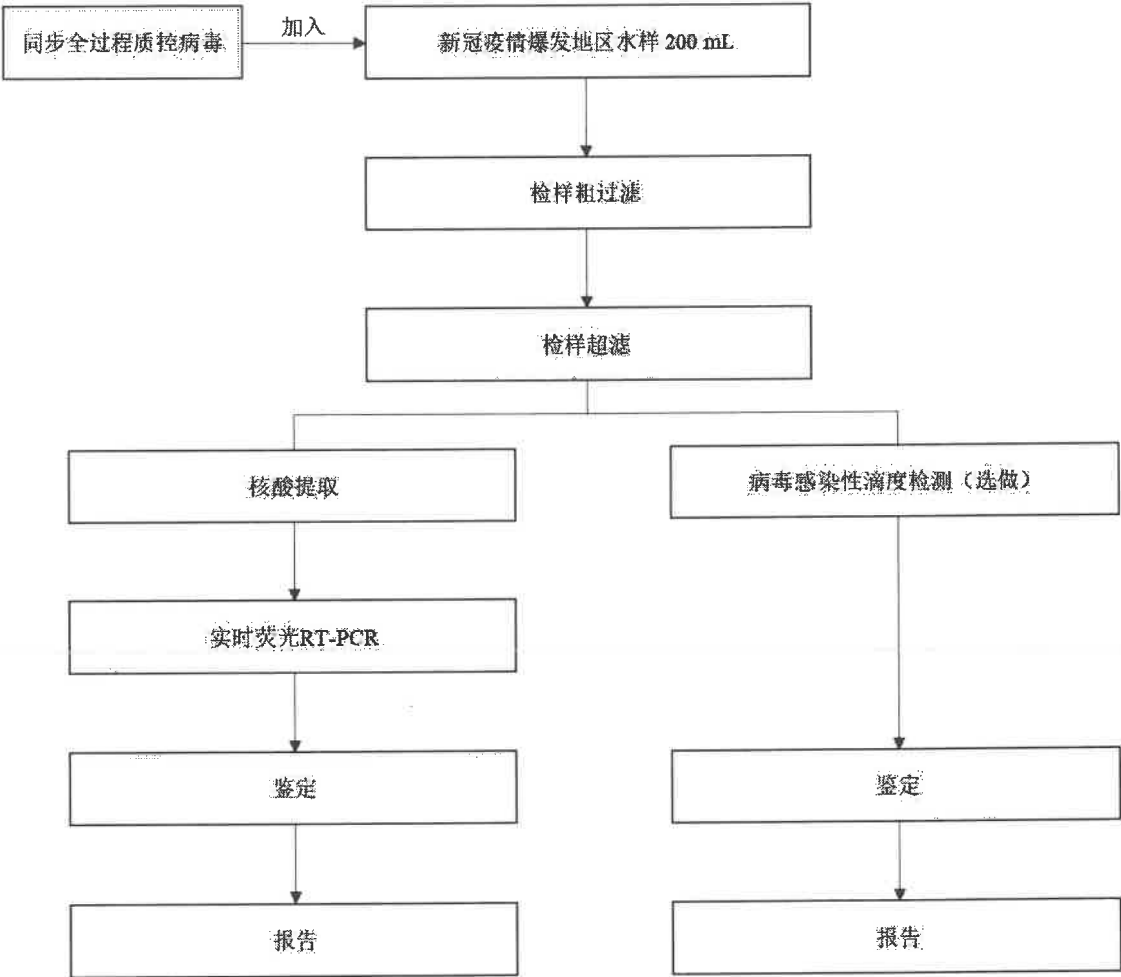


图 1 水中新冠病毒检测程序

7. 检测方法

7.1 实验室检测要求

实验室通用检测环境应符合《GB19489-2019 实验室生物安全通用要求》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》（国务院令 第 424 号）和《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发【2010】194 号）有关规定，具备经过卫生健康行政部门审核备案

的生物安全二级及以上实验条件。开展病毒感染性检测的实验室，应具备经过卫生健康行政部门审核备案的生物安全三级及以上实验条件。检测剩余水样和检测过程中产生的废液均视为感染性废液，需采用化学消毒（0.55%含氯消毒剂处理）或物理消毒（紫外照射 30 分钟以上）方式处理。按确认彻底消毒灭活后方可排入实验室水处理系统，经统一处理达标后进行排放。废液消毒处理效果须符合 GB18466《医疗机构水污染物排放标准》相关规定。

## 7.2 方法提要

疫源地疑似水样经粗过滤、超滤得到浓缩滤液，使用病毒核酸提取试剂盒对浓缩滤液进行核酸的提取和纯化，利用实时荧光 RT-PCR 进行检测，对核酸检测阳性的浓缩滤液可酌情开展病毒感染性滴度检测。

## 8. 操作步骤

### 8.1 水样的采集

8.1.1 对疫源地未消杀处理的污水进行采样。用大小适合的无菌液体采样袋采集污水样本，采样体积为 200 mL，每个采样点采集两份平行污水样本，一份用于水中新型冠状病毒核酸检测，另一份用于水中新型冠状病毒感染性检测（选做）。若只开展水中新型冠状病毒核酸检测，每个水样采集点只采集一份污水样本。

8.1.2 容器外注明水样编号、污水种类、采样地点和采样时间。须使用 75%酒精或 0.2%含氯消毒剂对采集密封后的容器表面进行消毒，之后放入大小适合的塑封袋内密封，每袋装一份污水样本。新冠病毒疑似污水样本应符合《危险品安全航空运输技术细则》、《危险品规则》中要求的 B 类 UN3373 进行包装。涉及外部样本运输的，应根据 B 类感染性物质进行三层包装。样本转运箱封闭前，须再次使用 75%酒精或 0.2%含氯消毒剂对样本包装袋表面进行消毒。

8.1.3 采集人员的个人防护装备应符合 WS/T 697-2020 新冠肺炎疫情期间特定人群个人防护指南，配置 N95 及以上防护口罩、护目镜、防护服、乳胶手套、防水靴套和双层乳胶手套。采样人员每采集一份污水样本应进行严格手消毒或更换手套。

### 8.2 水样的运输、保存



水样运输应遵照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》执行。运输过程中保持水样温度在 0℃–4℃。实验室接到水样后应于 4 h 内进行样本检测。如果暂时不能检测应将水样保存于 0℃–4℃冰箱中，须尽可能在 24 h 内完成检测。

### 8.3 水样处理和病毒富集

8.3.1 取其中一份水样，充分混匀，遵照《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册（试行第二版）》的要求，将采样袋置入 56℃水浴锅温浴 30 分钟，使水样灭活。温浴过程中可每隔 10 分钟将标本轻柔摇匀 1 次，以保证标本均匀灭活。温浴后标本须静置至室温 10–15 分钟使气溶胶沉降，随后再开盖进行后续病毒富集工作。

8.3.2 在生物安全柜内打开采样袋，用大容量电动移液器移取 50 mL 灭活后的水样进行粗过滤。采用正压或抽滤方法将水体滤过直径 47 mm、孔径 0.7 μm 的玻璃纤维素过滤膜，得到粗过滤液。

8.3.3 将粗过滤液转移至截留分子量为 30 kDa 的超滤杯中，在 4℃、4000 × g 的条件下，离心 15 分钟，收集超滤浓缩液。

8.3.4 水样可重复步骤 8.3.2 和 8.3.3 进行粗过滤、超滤，直至收集超滤浓缩液体积约为 0.8 mL–1.1 mL。

8.3.5 将超滤浓缩液转移至 1.5 mL 无核酸酶的离心管，并在 24 h 内完成病毒核酸提取和实时荧光 RT-PCR 检测。

### 8.4 病毒核酸的提取

8.4.1 使用国家食品药品监督管理总局注册批准的试剂盒或自动核酸提取仪进行核酸提取，须严格按照试剂盒说明书和/或自动核酸提取仪仪器使用说明进行操作。

8.4.2 须严格按照试剂盒说明书以及质量控制和安全防护要求操作。

### 8.5 实时荧光 RT-PCR

8.5.1 使用国家食品药品监督管理总局注册批准的新型冠状病毒核酸检测试剂盒（荧光

PCR 法)进行检测,须严格按照试剂盒说明书使用说明进行操作。每个样本设置 3 个平行。

8.5.2 须严格按照检测试剂盒说明书以及质量控制和安全防护要求操作。

## 8.6 质量控制和评价

### 8.6.1 应建立实验室内部质量控制制度

#### 8.6.1.1. 全过程阳性质量控制

以不与新型冠状病毒交叉反应的病毒(如:牛冠状病毒、新型冠状病毒假病毒、人类冠状病毒 OC43 等符合资质的病毒)作为全过程质控病毒(全过程阳性质控样)。将采集到的水样灭活后,在污水中加入全过程质控病毒,加标浓度为 1000 copies/mL。以全过程质控病毒的回收率表示水样中疑似新冠病毒的回收率,具体回收率的操作步骤和计算方法见附录 B。在每一批次检测中应至少做一个阳性质控样。

#### 8.6.1.2. 全过程阴性质量控制

以无核酸酶水作为全过程阴性质控样。在每一批次检测中应至少做一个阴性质控样。

#### 8.6.1.3. 应制定实验室质量保证计划

## 8.7 结果与报告

### 8.7.1 检测有效性判定

质控系统需同时满足所有质控要求,检测结果方视为有效:所有阴性对照阴性,所有阳性对照阳性,全过程控制病毒需满足:回收率 $\geq 1\%$ 。如任何一种对照出现非上述正常结果,应重做实验,同时排除污染因素。

### 8.7.2 结果判定

在质控系统正常的情况下,根据新型冠状病毒核酸检测试剂盒说明书要求判定检测结果。水样核酸检测结果阳性:三组平行样本中出现一个及以上阳性检测结果;水样核酸检测结果

阴性：三组平行样本中未出现任何阳性检测结果。

## **9. 结果报告**

### **9.1 阴性结果报告方式**

若水样核酸检测结果为阴性，则结果报告为 200 mL 水样未检出新型冠状病毒核酸。

### **9.2 阳性结果报告方式**

若水样核酸检测结果为阳性，则结果报告为 200 mL 水样检出新型冠状病毒核酸。

## **10. 水中新冠病毒的感染性滴度检测（选做项目）**

若结果判定为水样核酸阳性，核酸检测 Ct 值  $\leq 25$  且有 S 形扩增曲线，可进行病毒感染性滴度检测，具体见附录 B。

## 附录 A 全过程质控病毒

### A.1 概要

本标准使用全过程质控病毒进行质量控制,可使用人类冠状病毒 (HCoV-OC43) 或其他符合资质、不与新型冠状病毒交叉反应的病毒。冠状病毒 (Coronaviruses) 属于套式病毒目冠状病毒科冠状病毒属, 圆形或近似圆形, 直径为 100 ~ 160 nm。冠状病毒的基因组为单股正链的 RNA, 大小为 27 ~ 32 kb, 是已知所有 RNA 病毒中基因组最大的。HCoV-OC43 是已知能感染人的冠状病毒中的一种, 与 HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 同属于  $\beta$  群。HCoV-OC43 可以作为一种不依赖生物安全三级 (Biological safety level-3, BSL-3) 实验室的替代病毒。如果检测实验室无 HCoV-OC43 病毒, 可以使用其他符合资质的全过程质控病毒。

### A.2 培养试剂和仪器

#### A.2.1 Vero 细胞

推荐使用 Gibco 最低必需培养液 (Gibco' s minimum essential medium, MEM) 培养, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 1 × 链霉素/青霉素液, 100 mL/L (生长) 或 20 mL/L (维持) 胎牛血清。

#### A.2.2 仪器

为确保细胞培养和病毒生长, 需细胞培养所需的 CO<sub>2</sub> 浓度可调培养箱。

### A.3 培养过程

HCoV-OC43 培养在铺满 80%~90% 单层 Vero 细胞中, 置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中, 直至 75% 出现细胞病理效应。细胞培养器皿经过一个冻融循环, 将培养物 3000 r/min 离心 10 min。将细胞培养物离心上清留存用于过程控制。

### A.4 引物、探针

全过程质控病毒 (HCoV-OC43 病毒) 实时荧光 RT-PCR 的引物、探针见表 A.1。采用其他等效的过程控制病毒, 需对应调整引物探针。

表 A.1 全过程质控病毒(HCoV-OC43 病毒)实时荧光 RT-PCR 的引物、探针

| 检测靶标        | 序列 (5' -3' )                                 |
|-------------|--|
| N 基因正向引物(F) | AGCAACCAGGCTGATGTCAATACC                     |
| N 基因反向引物(R) | AGCAGACCTTCCTGAGCCTTCAAT                     |
| N 基因荧光探针(P) | 5' -FAM-TGACATTGTCTGATCGGGACCCAAGTA-TAMAR-3' |

#### A.5 全过程质控病毒的回收效率计算

**A.5.1** 将全过程质控病毒按步骤 8.4 提取核酸。可大量提取，分装为 10  $\mu$  L 全过程质控病毒的核酸量，-80℃保存，每次检测时取出使用。

**A.5.2** 将 10  $\mu$  L 全过程质控病毒的核酸进行数次 10 倍梯度稀释，加入过程控制病毒引物、探针，采用与新冠病毒实时荧光 RT-PCR 反应相同的反应条件确定未稀释和梯度稀释全过程质控病毒核酸的 Ct 值。

**A.5.3** 以未稀释和梯度稀释全过程质控病毒核酸的浓度 lg 值为 X 轴，以其 Ct 值为 Y 轴，建立标准曲线；标准曲线  $R^2$  应  $\geq 0.98$ 。未稀释过程控制病毒核酸浓度为 1000 copies/mL，梯度稀释过程控制核酸浓度分别为 100 copies/mL、10 copies/mL、1 copy/mL 等。

**A.5.4** 加入全过程质控病毒的水样按 8.3.2 和 8.3.3 步骤粗滤、超过滤、核酸提取。加入全过程质控病毒引物、探针，采用新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 反应相同的反应体系和参数，进行实时荧光 RT-PCR 反应，确定 Ct 值，代入标准曲线，计算经过病毒粗滤、超过滤、核酸提取等步骤后的全过程质控病毒核酸浓度。

**A.5.5** 计算回收率，回收率=（富集后的体积×病毒核酸浓度×100%）/（检测水样体积×病毒核酸浓度）

## 附录 B

### ( 资质性 )

#### 水中新型冠状病毒的感染性滴度检测

##### B.1 操作步骤

B.1.1 若结果判定为水样核酸阳性,核酸检测 Ct 值 $\leq$  25 且有 S 形扩增曲线,可进行病毒感染性滴度检测。所有操作步骤均在生物安全三级及以上条件的实验室进行。检测人员的防护装置应不低于生物安全三级实验室个人防护的要求。

B.1.2 在生物安全柜内打开另一份未经灭活处理的采样袋,按照 N 步骤进行水样的富集浓缩,收集超滤浓缩液 0.1 mL-0.2 mL。

B.1.3 将超滤浓缩液 0.1 mL 加入 Vero E6 细胞或 Huh7 细胞瓶中,待样本与细胞表面充分接触后,将培养瓶放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中,每隔 15 min 轻轻摇晃一次。

B.1.4 待细胞吸附超滤浓缩液 1.5 小时左右后,从培养箱中取出,倒掉培养管中的液体,用 PBS 清洗 3 次,加入 1.5 mL 的细胞生长液,将培养瓶放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,每天观察并记录。

B.1.5 若 7 天后如无细胞病变现象,则进行盲传。盲传 3 代仍无细胞病变现象,则判定为水样中新型冠状病毒无感染性。

B.1.6 若 7 天后有细胞病变现象,则判定为水样中新型冠状病毒具有感染性。可将毒液进行数次 10 倍梯度稀释。在 96 孔板上的单层 Vero E6 细胞或 Huh7 细胞中每孔依次加入 0.1 mL 毒液原液和 10 倍梯度稀释毒液,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 1.5 小时。每个梯度毒液可根据实际情况做 6 孔-10 孔平行。

B.1.7 待细胞吸附病毒 1.5 小时左右后,从培养箱中取出,吸附上清液,加入新的细胞生长液,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。

B.1.8 在培养箱中放置 5-7 天后观察结果,计算半数组织培养感染剂量 (TCID<sub>50</sub>) 值。可根据 Reed-Muench 公式半数组织培养感染剂量 (TCID<sub>50</sub>) 值计算= 50%感染的高临界稀释度倒

数的对数+距离比×稀释系数的对数式中：距离比=（50%的临界感染率-50%）/（50%的临界感染率-50%的低临界感染率）。

## **B.2 结果报告**

### **B.2.1 阴性结果报告方式**

若水样中新型冠状病毒无感染性，则结果报告为 200 mL 水样未检出具有感染性新型冠状病毒。

### **B.2.2 阳性结果报告方式**

若水样中新型冠状病毒具有感染性，则结果报告为 200 mL 水样检出具有感染性新型冠状病毒。

**附录 C**  
**( 规范性 )**

**试剂的配制**

**C.1** 除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯。

**C.2** 无核酸酶溶液的配制：配制溶液用的液体和固体应采用未开封的新品。配制溶液所用的超纯水、玻璃容器、移液器吸头、药匙等用具应无核酸酶。操作过程中应始终佩戴乳胶手套，并经常更换，以避免皮肤上的细菌和真菌及人体自身分泌的核酸酶污染用具或带入溶液。玻璃容器应在 240℃ 烘烤 4 h 以去除核酸酶。离心管、移液器吸头、药匙等用具可购买无核酸酶级别的，或用 0.1% 的焦炭酸二乙酯 ( DEPC ) 水溶液室温浸泡过夜，然后高压灭菌并烘干。

**C.3 无核酸酶的超纯水**

**C.3.1 成分**

|                 |         |
|-----------------|---------|
| 超纯水             | 1000 mL |
| 焦炭酸二乙酯 ( DEPC ) | 1.0 mL  |

**C.3.2 制法**

避光，室温搅拌过夜，121℃ 高压灭菌 15 min，备用，或直接购买无核酸酶超纯水。

**C.4 细胞生长液**

**C.4.1 成分**

|              |     |
|--------------|-----|
| MEM 培养液      | 88% |
| 胎牛血清         | 10% |
| L-谷氨酰胺       | 1%  |
| 1 × 链霉素/青霉素液 | 1%  |

**C.4.2 制法**

将上述组分混匀。



## C.5 细胞维持液

### C.5.1 成分

|            |     |
|------------|-----|
| MEM 培养液    | 96% |
| 胎牛血清       | 2%  |
| L-谷氨酰胺     | 1%  |
| 1×链霉素/青霉素液 | 1%  |

### C.5.2 制法

将上述组分混匀。

# 《水中新型冠状病毒检验》

## (征求意见稿) 编制说明



### 一、工作简况 (包括任务来源、协作单位、主要工作过程、起草组成 员及其所做的主要工作等)

#### 1、任务来源

本项目由中华预防医学会审评委员会负责。本标准为 2020 年 9 月中华预防医学会下达的《关于公布 2020 年度第一次团体标准立项项目的通知》。

为了建立适用于水中新型冠状病毒核酸检测和病毒感染性检测的方法,提高我国应急检测的准确性和及时性,浙江省疾病预防控制中心联合浙江大学医学院附属邵逸夫医院、杭州市拱墅疾病预防控制中心、杭州市西溪医院、舟山市疾病预防控制中心联合起草了《水中新型冠状病毒检验》,并申报中华预防医学会新冠肺炎疫情防控相关团体标准,于 2020 年 9 月正式获批立项。

#### 2、标准起草单位、协作单位、主要起草人

标准起草单位:浙江省疾病预防控制中心、浙江大学医学院附属邵逸夫医院、杭州市拱墅区疾病预防控制中心、杭州市西溪医院、舟山市疾病预防控制中心

主要起草人:张严峻、方磊、胡崇高、周晓红、戚建江、王虹玲、周建仓。

浙江省疾病预防控制中心组建了标准起草小组,起草小组成员及分工见下表。

| 序号 | 姓名  | 单 位            | 工作内容   |
|----|-----|----------------|--|
| 1  | 张严峻 | 浙江省疾病预防控制中心    | 本标准总结构框架制订、整体规划、专业工作细则指导、标准草案审核以及外部联络。                   |
| 2  | 方 磊 | 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 | 标准各制订阶段质控、内容核定工作，负责标准草案、征求意见稿、送审稿、报批稿的制订和标准解读、编制说明的文本起草。 |
| 3  | 胡崇高 | 浙江省疾病预防控制中心    | 整体规划与工作流程指导。   |
| 4  | 周晓红 | 杭州市拱墅区疾病预防控制中心 | 环境检验专业技术指导。  |
| 5  | 戚建江 | 杭州市西溪医院        | 临床病原微生物检验专业技术指导。   |
| 6  | 王虹玲 | 舟山市疾病预防控制中心    | 实验室标准研制、参数优化和文本起草。                                       |
| 7  | 周建仓 | 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 | 实验室标准研制、参数优化和文本修订  |

### 3、简要起草过程

- (1) 2020 年 6 月上旬，标准主要起草人员开展关于国内外水中新型冠状病毒检验标准制定、研究文献、行业现状的调研准备工作。
- (2) 2020 年 6 月中旬，标准主要起草人员对标准起草原则、技术要求和实施细则等进行了学习讨论。
- (3) 2020 年 6 月下旬，浙江省疾控中心微生物检验所召开参与该标准制定的相关技术人员工作研讨会议，商讨水中新型冠状病毒标准检测方法的课题设计，并制定课题研究计划，对实验中所用的试剂耗材进行订购，对关键影响因素如富集方法、水样种类、各种试剂浓度等分别进行比对考察。
- (4) 2020 年 6 月~2020 年 10 月，浙江省疾控中心微生物检验所开展水中新型冠状病毒标准检测方法研究，对各实验步骤、所用仪器设备、试剂及浓度、实验技术参数进行优化，并组织 3 家专业技术机构对该方法进行验证。2020 年 10 月底完成实验方法的建立、验证和实验数据的汇总。
- (5) 2020 年 10 月底，将标准征求意见稿下发给相关同行评审专家征求意见。2020 年 11 月中旬收回全部专家意见并汇总。
- (6) 2020 年 10 月、11 月、12 月三次召开工作组会，标准主要起草人员对前期研究实验结果进行优化、归纳、总结及分析，对标准制订草案进行讨论、修改。
- (7) 2021 年 1 月，召开标准征求意见会，邀请卫生健康行政部门、医疗卫生机构、相关行业协会讨论标准草案，根据会议讨论意见，进一步修改标准征求意见稿，形成标准检测方法的编制说明，汇总了同行专家评审意见。
- (8) 2021 年 3 月，提交《水中新型冠状病毒检验》（征求意见稿）、《编制说明》和《征求意见汇总表》供中华预防医学会审评委员会审议。
- (9) 2022 年 4 月，中华预防医学会评审委员会初审。根据会议讨论意见，进一步修改标准征求意见稿、标准解读稿以及编制说明，汇总同行专家评审意见。

## 二、标准编制原则和确定标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的论据

### 1、编制原则

按照 GB/T1.1-2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编

写》和 GB 19489《实验室生物安全通用要求》的要求和规定编写本标准内容。水中新型冠状病毒检验标准充分考虑到现阶段我国新冠肺炎疫情防控与应急管理工作的需求，使其具有可操作性。

## 2、标准主要内容与确定论据

### (1) 标准的适用范围

本标准是公共卫生应急处置管理标准体系的标准之一。为建立适用于新型冠状病毒（以下简称“新冠”）水中应急检测的方法，制定本标准。本标准规定了水中新型冠状病毒的核酸检测方法。本标准适用于新冠疫情爆发地区生活、医疗、环境、工业、商业等污水中新型冠状病毒的核酸检测以及病毒的感染性检测。

### (2) 标准的主要内容

标准的内容是在参考 GB 4789.42《食品安全国家标准食品微生物学检验诺如病毒检验》、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》、SO/TS 5798:2022《体外诊断检测系统-核酸扩增法检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的要求及建议》、GB/T 27403《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》、DBS13/001-2015《食品安全地方标准 食品中诺如病毒检测》的基础上，结合本次疫情实际防控工作确定的，主要包括前言、引言、范围、规范性文件引用、术语和定义、检出限、设备和材料、试剂、检测程序、检测方法、操作步骤、质量控制和评价、结果报告、水中新冠病毒的感染性滴度检测（选做项目）以及附录。附录 A 为全过程质控病毒。附录 B 为资质性附录，水中新型冠状病毒的感染性滴度检测。附录 C 规范性附录，试剂的配制。

### (3) 制订的主要依据

- 1) La Rosa, G.; Bonadonna, L.; Lucentini, L.; Kenmoe, S.; Suffredini, E., Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. Water Res 2020, 179, 115899.
- 2) Gonçalves, J.; Koritnik, T.; Mioč, V.; Trkov, M.; Bolješić, M.; Berginc, N.; Prosenc, K.; Kotar, T.; Paragi, M., Detection of SARS-CoV-2 RNA in hospital wastewater from a low COVID-19 disease prevalence area. Sci Total Environ 2021, 755 (Pt 2), 143226.
- 3) Ahmed, W.; Bertsch, P. M.; Angel, N.; Bibby, K.; Bivins, A.; Dierens, L.; Edson, J.; Ehret, J.; Gyawali, P.; Hamilton, K. A.; Hosegood, I.; Hugenholtz, P.; Jiang, G.; Kitajima, M.; Sichani, H. T.; Shi, J.; Shimko, K. M.; Simpson, S. L.; Smith, W. J. M.; Symonds, E. M.; Thomas, K. V.; Verhagen, R.; Zaugg, J.; Mueller, J. F., Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance

tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers. *J Travel Med* 2020, 27 (5).

4) Saguti, F.; Magnil, E.; Enache, L.; Churqui, M. P.; Johansson, A.; Lumley, D.; Davidsson, F.; Dotevall, L.; Mattsson, A.; Trybala, E.; Lagging, M.; Lindh, M.; Gisslén, M.; Brezicka, T.; Nyström, K.; Norder, H., Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water Res* 2021, 189, 116620.

5) Kitajima, M.; Ahmed, W.; Bibby, K.; Carducci, A.; Gerba, C. P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Rose, J. B., SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ* 2020, 739, 139076.

6) Ahmed, W.; Bertsch, P. M.; Bibby, K.; Haramoto, E.; Hewitt, J.; Huygens, F.; Gyawali, P.; Korajkic, A.; Riddell, S.; Sherchan, S. P.; Simpson, S. L.; Sirikanchana, K.; Symonds, E. M.; Verhagen, R.; Vasan, S. S.; Kitajima, M.; Bivins, A., Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environ Res* 2020, 191, 110092.

7) Aguiar-Oliveira, M. L.; Campos, A.; R Matos, A.; Rigotto, C.; Sotero-Martins, A.; Teixeira, P. F. P.; Siqueira, M. M., Wastewater-Based Epidemiology (WBE) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for COVID-19 Surveillance-A Brief Review. *Int J Environ Res Public Health* 2020, 17 (24).

8) Ahmed, W.; Angel, N.; Edson, J.; Bibby, K.; Bivins, A.; O'Brien, J. W.; Choi, P. M.; Kitajima, M.; Simpson, S. L.; Li, J.; Tschärke, B.; Verhagen, R.; Smith, W. J. M.; Zaugg, J.; Dierens, L.; Hugenholtz, P.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F., First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 2020, 728, 138764.

### 三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

#### 1、主要试验分析

为建立适用于水中新冠病毒检测和病毒活性检测的方法，为新冠肺炎疫情防控工作提供重要的科学支撑，标准编制团队在2020年6月至2021年2月期间，评估了不同富集方法对水中新冠病毒的富集效果及检测灵敏度的影响。通过文献查阅、大量的实验室研究以及多家专业机构的权威验证，筛选出目前最适用于水中新型冠状病毒核酸检测和病毒感染性检测的方法。该标准操作简单、材料价格实惠、易于购买、对仪器要求低、病毒回收率及灵敏度高，适用于在基层一线

推广使用。

## 2、综述报告

新冠肺炎疫情肆虐全球，形势严峻。新冠病毒传染能力强，比 SARS-CoV 和 MERS-CoV 更具传染性，容易在聚餐、集会或家庭共同生活时接触传播。接触传播和呼吸道传播是目前公认的主要传播途径，然而人类对新冠病毒传播规律的认知依旧不足。越来越多的证据证实，新冠病毒感染者，可能症状并不明显，甚至没有任何症状，也会传播病毒。赵金存团队研究发现患者的粪便和尿液中存在有感染性的活 SARS-CoV-2，被世界卫生组织写入了调研报告，揭示了 SARS-CoV-2 潜在传播新途径。意大利在 2020 年 12 月份的废水样本中，检测出了新冠病毒的遗传物质。之后，荷兰、美国、法国、澳大利亚、西班牙、日本等国家相继报告从污水中检测出了新型冠状病毒基因，表明新冠病毒可能存在介水传播的风险和大规模污水监控的必要性。2020 年 6 月中旬，广州市疾控中心首次发现粪水污染环境引发居民感染新冠，引发社会高度关注。回顾 2003 年，SARS-CoV 通过污水管道传播导致 SARS 疫情暴发，最终造成香港淘大花园 300 多人感染，42 人死亡的悲剧。鉴于新冠病毒感染后的严重性以及对其认知的局限性，不能排除新冠病毒可能存在介水传播的风险。然而，迄今国际上未有任何关于新冠病毒在水样中检测及病毒活性检测的标准。

饮用水安全是人类健康的基本需求。不洁的饮用水会引发严重的公共安全事件。据世界卫生组织报道，在发展中国家，80%的疾病是由不安全的饮用水和恶劣的卫生条件造成的。污水中病毒的含量非常高，并且不同地区不同季节污水中的病毒含量变化也很大，主要受当地社会经济发展水平和卫生水平以及疾病流行情况等因素影响。水中新冠病毒的准确检测能为疫情暴发原因的确定起关键作用。然而，由于水标本样本量大、病毒含量低，需要经病毒富集才能进行检测。目前国内外尚无新冠病毒在水中应急检测的有效方法。

本项标准通过研究常见几种富集浓缩技术在水中新冠病毒检测中的有效性和灵敏度，优化关键技术参数，建立了适用于水样中新冠病毒检测及病毒感染性检测的实验室方法。我们通过实验论证得出，在同等实验条件下，水中新型冠状病毒的富集效率为：超滤离心法>吸附洗脱法>PEG 沉淀法；核酸提取效率为硅胶过柱法>磁珠提取法。相关实验数据见附件。考虑到标准实际应用中实用性、规范性、经济性、可操作性等原则，我们最终标准在制定时选用超滤离心法作为水中新型冠状病毒浓缩富集的手段，后续核酸提取和核酸检测方法采用国家食品药品监督管理总局注册批准的新型冠状病毒核酸提取试剂盒和检测试剂盒。同时，我们将标准草案在三家权威检测机构进行了验证，效果良好（相关材料见附件）。



### 3、技术经济论证与预期的经济效果

国家自然科学基金新冠疫情防控专项“重大突发公共卫生事件中的公共服务体系建设”(72042005)、浙江省重点研发计划“高灵敏度快速诊断试剂及设备研发-新冠等主要呼吸道病毒自动化检测仪器和试剂集成研究”(2021C03044)、中国博士后科学基金“新型冠状病毒在污水检测中的关键技术研究及风险评估”(2020T130104ZX)、浙江省博士后基金“新型冠状病毒在污水检测中的关键技术开发及应用”、省部共建重大项目“基于人工神经网络新冠肺炎患者器官功能不全早期预警及分层精准治疗的研究”(WKJ-ZJ-2112)为本标准的编制提供了强大的研究团队和充足的经费保障。

本标准作为一项实验室检测类标准,不产生直接的经济效益。但是通过本标准的应用,可对新冠病毒介水传播的可能性进行风险评估,研究成果将为全面认识新冠病毒的传播途径提供重要的科学依据,为健全国家疫情防控相关措施奠定扎实的理论基础,为有效减少社会、政府在疫情应对过程中不必要的损失提供关键的技术支撑,具有巨大的间接经济效益。

### 四、采用国际标准的程度与水平的简要说明

目前,国际上尚无统一的水中新型冠状病毒的鉴定技术。2022年3月,国家卫生健康委刚刚颁布了《污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准》(WS/T 799-2022),该项标准是我国首次对水中新型冠状病毒核酸检测的鉴定规范。本项团标是对WS/T 799-2022的进一步优化,完善了标准适用范围、病毒浓缩富集方法、核酸提取、核酸检测、质控系统等内容,尤其是对质量控制的病毒回收率提出了检测要求,同时新增了水中新型冠状病毒感染性检测(选做部分)并进行了详细描述,为本标准的一个亮点。

### 五、标准涉及的相关知识产权说明

本标准的制定是依托国家自然科学基金新冠疫情防控专项“重大突发公共卫生事件中的公共服务体系建设”(72042005)、浙江省重点研发计划“高灵敏度快速诊断试剂及设备研发-新冠等主要呼吸道病毒自动化检测仪器和试剂集成研究”(2021C03044)、中国博士后科学基金“新型冠状病毒在污水检测中的关键技术研究及风险评估”(2020T130104ZX)、浙江省博士后基金“新型冠状病毒在污水检测中的关键技术开发及应用”(ZJ2020027)、省部共建重大项目“基于人工神经网络新冠肺炎患者器官功能不全早期预警及分层精准治疗的研究”(WKJ-ZJ-2112)的主要成果,属于自主知识产权。部分制订依



据参考了国内外权威机构公开发布的文献资料，不涉及知识产权问题。

## **六、重大意见分歧的处理经过和依据**

本标准在制定过程中未出现重大分歧意见。

## **七、其他应予说明的事项。**

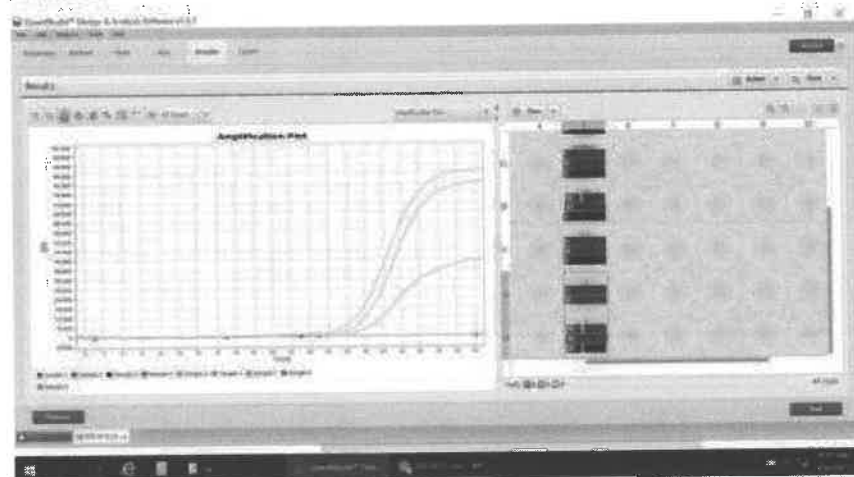
无。

## 附录

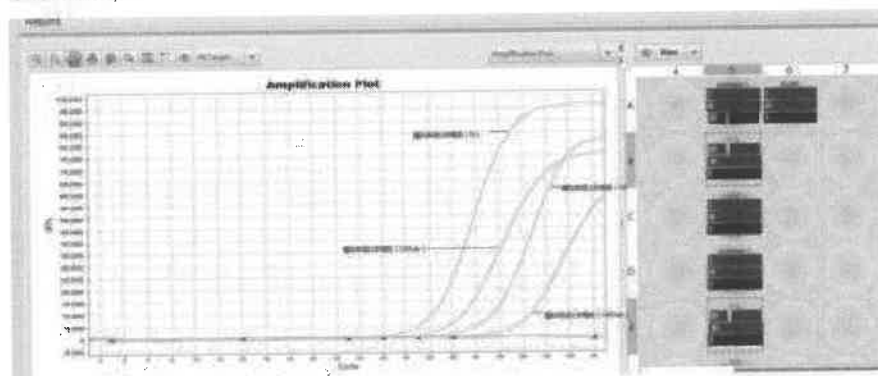
### 1、三家权威机构的验证结果

#### i. 湖州市疾病预防控制中心

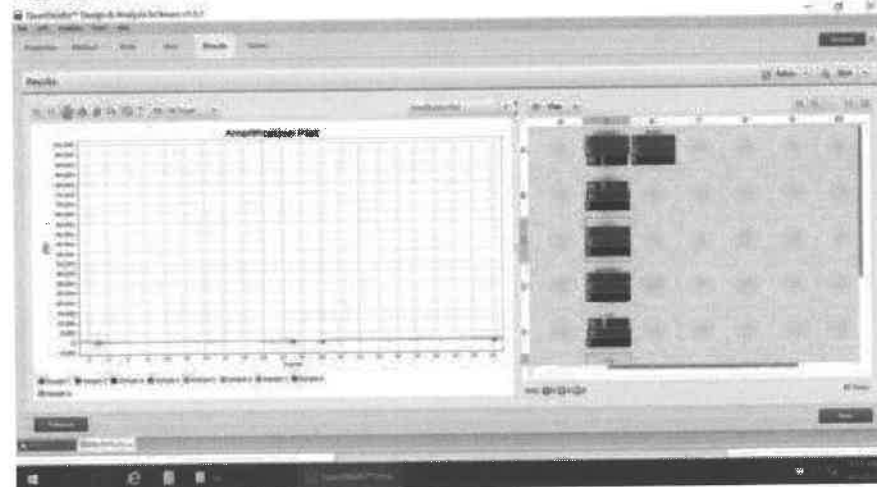
阳性对照



模拟样品 1



模拟样品 2

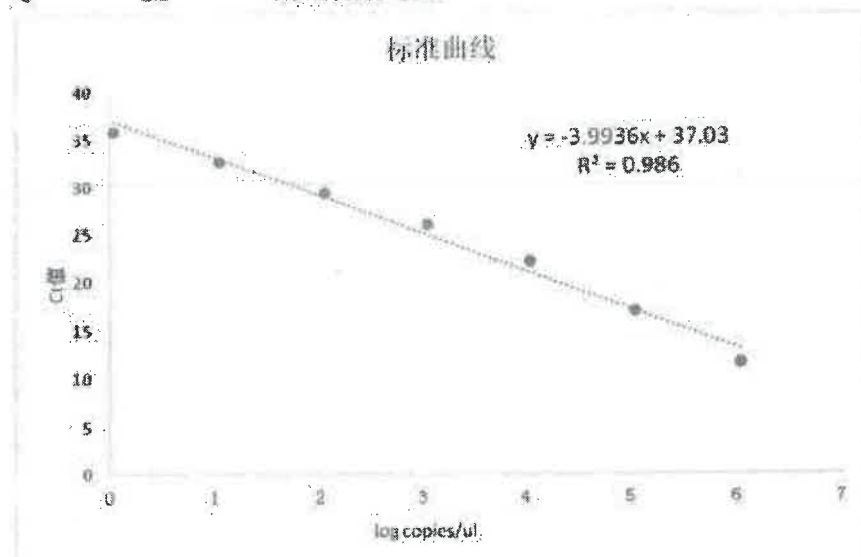


ii. 嘉兴市疾病预防控制中心

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| 模拟水样①                          | 判定结果 |
| 浓缩前 Ct 值 32.05(ORF1ab)30.51(N) | 阳性   |
| 浓缩后 Ct 值 25.70(ORF1ab)25.01(N) | 阳性   |

|             |      |
|-------------|------|
| 模拟水样②       | 判定结果 |
| 浓缩前 Ct 值 阴性 | 阴性   |
| 浓缩后 Ct 值 阴性 | 阴性   |

| 稀释梯度 | 核酸浓度    | log         | Ct    |
|------|---------|-------------|-------|
| 0    | 1100000 | 6.041392685 | 11.43 |
| -1   | 110000  | 5.041392685 | 16.88 |
| -2   | 11000   | 4.041392685 | 22.1  |
| -3   | 1100    | 3.041392685 | 26.02 |
| -4   | 110     | 2.041392685 | 29.35 |
| -5   | 11      | 1.041392685 | 32.61 |
| -6   | 1.1     | 0.041392685 | 35.8  |



| 浓缩前 Ct 值 | log   | 核酸浓度        | 浓缩前体积 (mL) |
|----------|-------|-------------|------------|
| 29.79    | 1.813 | 65.01296903 | 88         |

| 浓缩后 Ct 值 | log   | 核酸浓度        | 浓缩后体积 (mL) |
|----------|-------|-------------|------------|
| 24.52    | 3.133 | 1358.313447 | 1.5        |

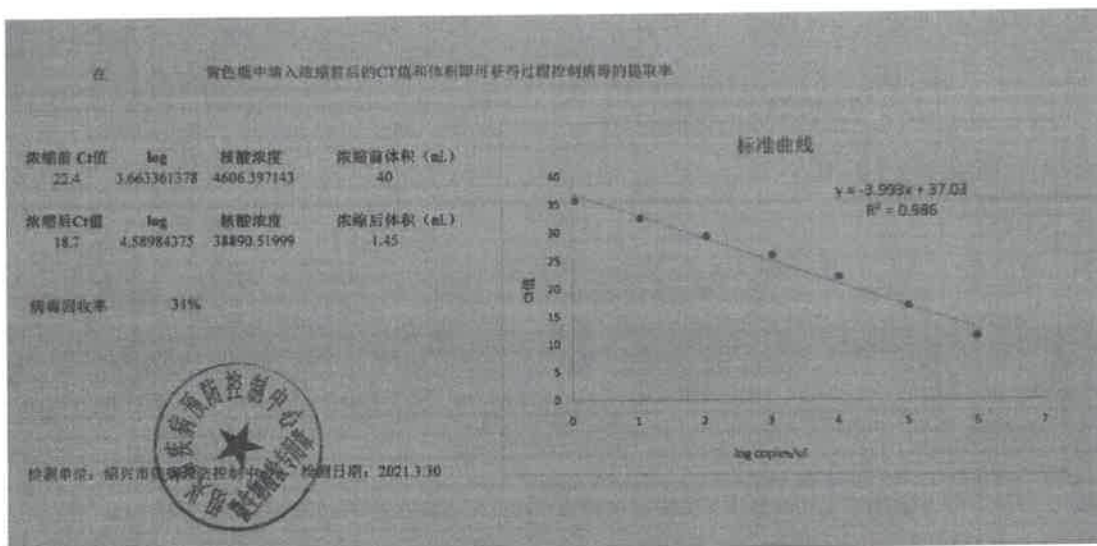
病毒回收率 36%

检测单位: 嘉兴市疾病预防控制中心

检测日期: 2021.3.31



### iii. 绍兴市疾病预防控制中心

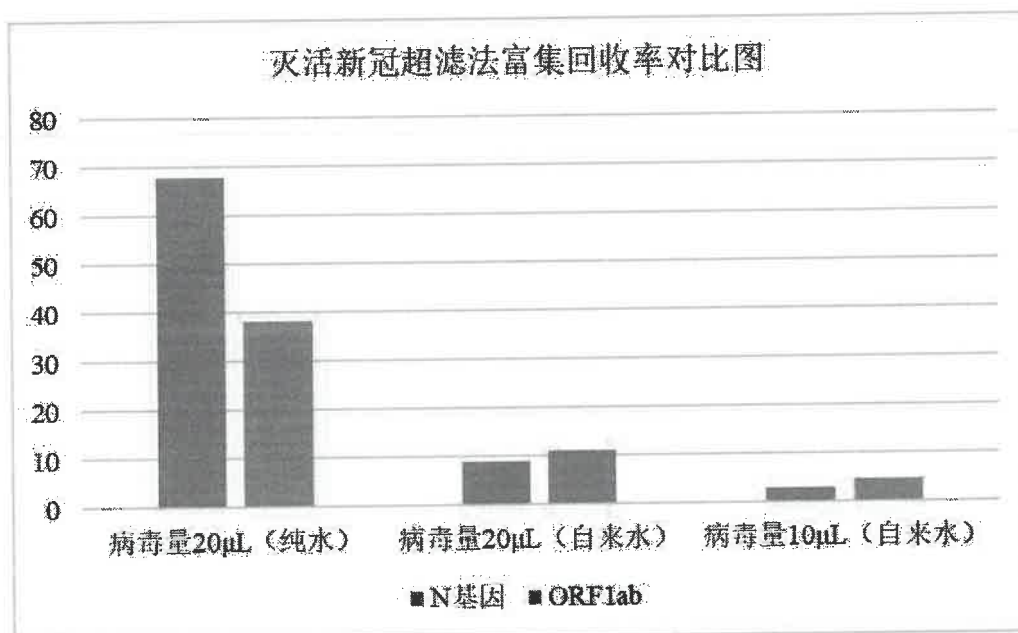
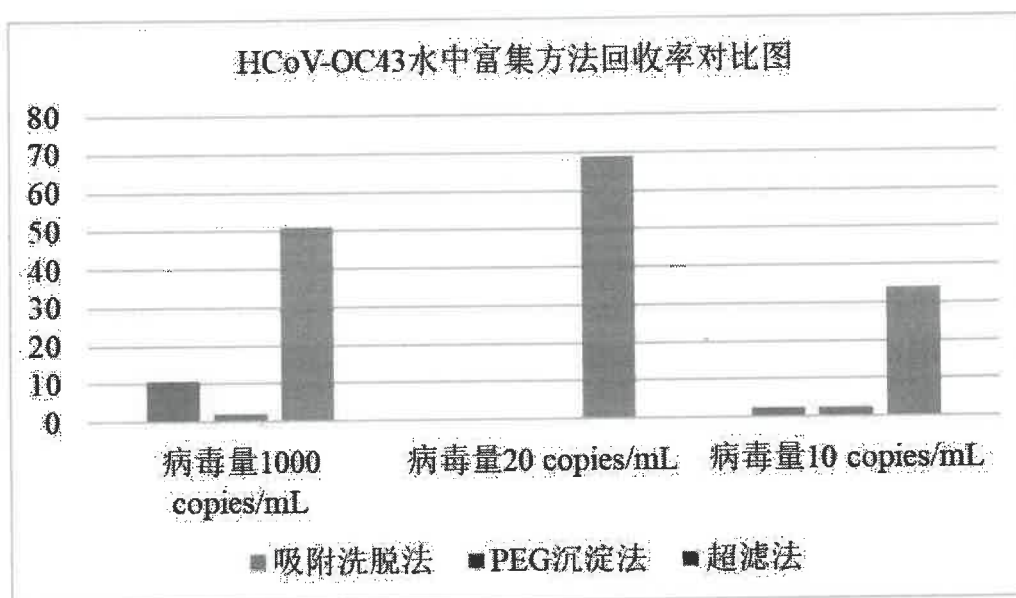


在表格中填入CT值

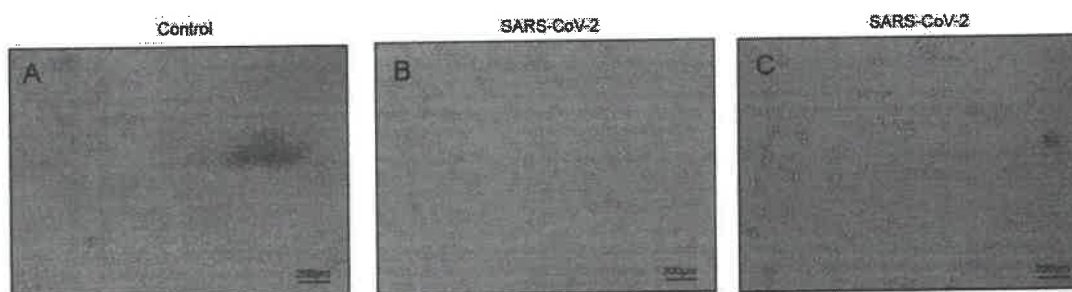
|       |             |                           |                 |
|-------|-------------|---------------------------|-----------------|
| 模拟水样① | 浓缩后CT值      | 23.6(N基因); 24.3(ORF1ab基因) | 结果判定            |
|       |             |                           | 阳性              |
| 模拟水样② | 浓缩后CT值      |                           | 阴性              |
| 检测单位  | 绍兴市疾病预防控制中心 |                           | 检测日期: 2021.3.30 |

微生物检验专用章

## 2、部分浓缩富集实验数据



## 3、水中模拟新型冠状病毒感染性检测



#### 4、 标准研制实验室工作照片

