

**WS**

中华人民共和国卫生行业标准

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

Method for enrichment and nucleic acid detection of SARS-CoV-2 in sewage

2022 - 03 - 24 发布

2022 - 03 - 24 实施

---

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

## 前 言

本标准由国家卫生健康委环境健康标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由中国疾病预防控制中心卫生标准处负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会疾控局负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：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、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本标准主要起草人：张岚、唐宋、黄霞、杨敏、张晓、张良、王园媛、刘艳臣、田哲、段招军。

# 污水中新型冠状病毒富集浓缩 和核酸检测方法标准

## 1 范围

本标准规定了污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法。  
本标准适用于生活污水、医疗机构污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测。

## 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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法  
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标准。

### 3.1

**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。

### 3.2

**Ct 值** *cycle threshold*

在实时荧光定量PCR中，每个反应体系中的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

### 3.3

**实时荧光反转录聚合酶链式反应** *real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction*

在反转录DNA聚合酶链式反应的扩增反应中加入荧光化学物质，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。

## 4 检出限

富集浓缩采用聚乙二醇沉淀法或铝盐混凝沉淀法时，方法检出限为10 copies/mL；富集浓缩采用离心超滤法时，方法检出限为100 copies/mL。

## 5 水样的采集、运输及保存

根据采样场所排水系统分布情况，重点选取污水排水口、内部管网汇集处等关键位置对未经消杀处理的污水进行采样。用无菌聚乙烯瓶采集污水样本，采样体积为300 mL。可根据现场条件和检测需求确定水样采集方式，如瞬时水样（采样点位某一时间随机采集的样本）或混合水样（同一采样点位不同时间所采集的瞬时水样混合后的样本）。样本采集后应在现场使用75%酒精对采样瓶外表面进行消毒，然后将采样瓶装入密封采样袋中，对密封采样袋外表面再次进行消毒，并尽快将样本送至实验室，运输过程中确保0℃~4℃条件下冷藏运输。到达实验室后样本同样应保存于0℃~4℃环境中，实验室应在接到样本后24 h内进行富集浓缩处理，并在富集浓缩后24 h内完成核酸提取及实时荧光反转录聚合酶链式反应（实时荧光RT-PCR）检测。

## 6 病毒灭活

将样本充分混匀后置于60℃水浴30 min。

注：水浴锅水位应高于样本液面，确保容器内样本达到目标温度。

## 7 病毒富集浓缩

注：本部分中三种新型冠状病毒富集浓缩方法适用条件相同，使用过程中可根据实验条件进行选择。

### 7.1 聚乙二醇沉淀法

#### 7.1.1 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实时荧光RT-PCR检测。

#### 7.1.2 试剂和材料

##### 7.1.2.1 试剂

7.1.2.1.1 聚乙二醇：分子生物学级，平均分子量 8 000。

7.1.2.1.2 氯化钠：分子生物学级。

7.1.2.1.3 无核酸酶水：分子生物学级。

##### 7.1.2.2 材料

7.1.2.2.1 无菌带盖离心管：1.5 mL，无核酸酶；50 mL 或 250 mL，可承受离心力 $\geq 12\ 000\ g$ 。

7.1.2.2.2 无菌移液器吸头：1 mL，带滤芯，无核酸酶。

7.1.2.2.3 无菌移液管：50 mL。

##### 7.1.3 仪器设备

7.1.3.1 高速冷冻离心机：4℃，50 mL 或 250 mL 转子，可承受离心力 $\geq 12\ 000\ g$ 。

7.1.3.2 电子天平：分辨力不低于 0.001 g。

7.1.3.3 生物安全柜：II 级或 II 级以上。

7.1.3.4 高压灭菌器。

7.1.3.5 移液器：1 mL。

7.1.3.6 大容量电动移液器。

##### 7.1.4 富集浓缩步骤

###### 7.1.4.1 预离心

用大容量电动移液器分别移取3份35 mL污水样本置于3个50 mL离心管中，在4℃、2 500 g条件下离心30 min，将上清液分别转移到另外3个50 mL离心管中备用。剩余污水样本作为备份。

注1：当污水样本悬浮物含量过高，可能影响病毒核酸提取和实时荧光RT-PCR检测时，应采用预离心弃除悬浮物后再进行后续操作。

注2：若选用250 mL离心管，可直接取105 mL污水样本于250 mL离心管中，在上述条件下离心后将上清液转移到另外1个250 mL离心管中备用。

###### 7.1.4.2 第二次离心

在3个装有35 mL污水样本或预离心后上清液的50 mL离心管中分别加入3.5 g $\pm$ 0.1 g聚乙二醇和0.79 g $\pm$ 0.01 g氯化钠，充分混合，直至试剂完全溶解，该溶解过程约需15 min。然后在4℃、12 000 g条件下离心120 min，离心机降速时不应使用制动力。离心机停止后倾倒并弃除离心管中的上清液，至上清液流出。

注：若选用250 mL离心管，在装有105 mL污水样本或预离心后上清液的250 mL离心管中操作时，聚乙二醇和氯化钠用量应等比例增加，其他操作相同。

###### 7.1.4.3 富集浓缩

7.1.4.3.1 在4℃、12 000 g条件下将第二次离心后剩余的样本再次离心5 min，离心机降速时不应使

用制动力。离心机停止后用移液器从离心管中吸出并弃除剩余的上清液。

7.1.4.3.2 吸取 0.4 mL 无核酸酶水加入到其中的一个离心管中，反复吹吸沉淀，瞬时离心，使所有液体聚集在管底，将混悬液吸出并加入到第二个离心管中。

7.1.4.3.3 重复吹吸沉淀和瞬时离心的操作后，再次将混悬液吸出并加入到第三个离心管中。

7.1.4.3.4 继续重复吹吸沉淀和瞬时离心的操作，最终形成的混悬液即为该水样的浓缩液，体积约为 0.6 mL。将浓缩液转移至 1.5 mL 离心管中，于 0 °C~4 °C 条件下保存，并于 24 h 内完成核酸提取和实时荧光 RT-PCR 检测。

注：若选用 250 mL 离心管，按照 7.1.4.3.1 条件再次离心并弃除剩余的上清液后，在离心管中加入 0.4 mL 无核酸酶水，反复吹吸沉淀，并瞬时离心后即得到浓缩液。

## 7.2 铝盐混凝沉淀法

### 7.2.1 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实时荧光 RT-PCR 检测。

### 7.2.2 试剂和材料

#### 7.2.2.1 试剂

7.2.2.1.1 实验用水：GB/T 6682 规定的一级水。

7.2.2.1.2 氯化铝溶液 [ $c(\text{AlCl}_3) = 0.3 \text{ mol/L}$ ]：称取 4 g 无水氯化铝（纯度  $\geq 99\%$ ），置于烧杯中，加入 100 mL 水，搅拌溶解后转移至试剂瓶中。

7.2.2.1.3 氢氧化钠溶液 [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ ]：称取 4 g 氢氧化钠（纯度  $\geq 96\%$ ），置于烧杯中，加入 100 mL 水，搅拌溶解后转移至试剂瓶中。

7.2.2.1.4 盐酸溶液 [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$ ]：移取 43 mL 盐酸（分析纯， $\rho_{20} = 1.19 \text{ g/mL}$ ）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，并定容至刻度。

7.2.2.1.5 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  $\geq 98\%$ 。

#### 7.2.2.2 材料

7.2.2.2.1 无菌螺口锥形瓶：100 mL。

7.2.2.2.2 无菌带盖离心管：10 mL、50 mL。

7.2.2.2.3 无菌移液器吸头：200  $\mu\text{L}$ 、1 mL，带滤芯，无核酸酶。

7.2.2.2.4 无菌移液管：50 mL。

### 7.2.3 仪器设备

7.2.3.1 冷冻离心机：4 °C，50 mL 转子，可承受离心力  $\geq 2\ 500 g$ 。

7.2.3.2 恒温振荡培养箱。

7.2.3.3 电子天平：分辨力不低于 0.001 g。

7.2.3.4 pH 计：精度  $\geq 0.01$ 。

7.2.3.5 水浴锅。

7.2.3.6 生物安全柜：II 级或 II 级以上。

7.2.3.7 高压灭菌器。

7.2.3.8 移液器：200  $\mu\text{L}$ 、1 mL。

7.2.3.9 大容量电动移液器。

### 7.2.4 富集浓缩步骤

#### 7.2.4.1 预离心

取大于 50 mL 的污水样本在 4 °C、2 500 g 条件下离心 30 min，留取上清液备用。剩余污水样本作为备份。

注：当污水样本悬浮物含量过高，可能影响病毒核酸提取和实时荧光 RT-PCR 检测时，应采用预离心弃除悬浮物后再进行后续操作。

#### 7.2.4.2 富集浓缩

##### 7.2.4.2.1 絮凝处理

用大容量电动移液器将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=6.0±0.1。将螺口锥形瓶盖拧紧，置于恒温振荡培养箱中，以150 r/min的速度在室温下混合15 min。

##### 7.2.4.2.2 离心分离

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

##### 7.2.4.2.3 络合溶解

倾倒弃除离心管中的上清液，在剩余胶体中加入0.20 g±0.01 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 °C水浴10 min。水浴后离心管中的液体即为该水样的浓缩液，体积约为1 mL，于0 °C~4 °C条件下保存，并于24 h内完成核酸提取和实时荧光RT-PCR检测。

### 7.3 离心超滤法

#### 7.3.1 原理

选用嵌有超滤膜的超滤杯，通过离心作用将分子量大于超滤膜截留分子量的病毒颗粒截留在超滤杯内，收集超滤杯中的病毒浓缩液，用于后续核酸提取和实时荧光RT-PCR检测。

#### 7.3.2 材料

7.3.2.1 一次性超滤杯：截留分子量为30 kDa，体积为70 mL，可倒置离心回收样本。

7.3.2.2 无菌带盖离心管：2 mL，无核酸酶；50 mL。

7.3.2.3 无菌移液器吸头：1 mL，带滤芯，无核酸酶。

7.3.2.4 无菌移液管：50 mL。

#### 7.3.3 仪器和设备

7.3.3.1 冷冻离心机：4 °C，50 mL转子，可承受离心力≥6 000 g。

7.3.3.2 冷冻离心机：4 °C，250 mL水平转子，可承受离心力≥3 000 g。

7.3.3.3 生物安全柜：II级或II级以上。

7.3.3.4 高压灭菌器。

7.3.3.5 移液器：1 mL。

7.3.3.6 大容量电动移液器。

#### 7.3.4 富集浓缩步骤

##### 7.3.4.1 预离心

7.3.4.1.1 用大容量电动移液器移取50 mL污水样本于50 mL离心管中，在4 °C、5 000 g条件下离心30 min，分别保留上清液和沉淀物。剩余污水样本作为备份。

7.3.4.1.2 取0.5 mL上清液加入到保留沉淀物的离心管中，将沉淀物重悬混匀，保留待用。

##### 7.3.4.2 富集浓缩

7.3.4.2.1 超滤杯前处理：取30 mL无菌水加入到样品浓缩杯中，使用水平转子在4 °C、2 480 g条件下离心10 min，弃除滤液收集杯中的滤出液，再将样品浓缩杯反向倒置在浓缩液收集杯上，在4 °C、920 g条件下离心3 min，弃除收集液。

7.3.4.2.2 将7.3.4.1.1预离心得到的上清液转移至样品浓缩杯中，使用水平转子在4 °C、2 480 g条件下离心15 min。如样品浓缩杯中残留液体体积较大，可适当延长离心时间，直至浓缩杯中液体约为0.3 mL~0.6 mL。

7.3.4.2.3 待全部上清液浓缩完成后，将样品浓缩杯反向倒置在浓缩液收集杯上，在4 °C、920 g条件下离心3 min，吸取浓缩液收集杯中的液体，转移至2 mL离心管中。

7.3.4.2.4 吸取 7.3.4.1.2 预离心得到的沉淀物混悬液 0.5 mL，与 7.3.4.2.3 中得到的液体混合，即为该水样的浓缩液，体积约为 0.8 mL~1.1 mL，于 0℃~4℃ 条件下保存，并于 24 h 内完成核酸提取和实时荧光 RT-PCR 检测。

注1：也可选用截留分子量为100 kDa的超滤杯，但对应离心浓缩时离心力不宜超过3 000 *g*；

注2：也可选用不带倒置离心功能的超滤杯，但在完成7.3.4.2.2后，7.3.4.2.3应改为“待全部上清液浓缩完成后，取下样品浓缩杯，用移液器吸取浓缩液体小心吹打膜数次后，吸取所有浓缩液并转移至2 mL离心管中”。

## 8 核酸检测

### 8.1 核酸提取

#### 8.1.1 试剂和材料

##### 8.1.1.1 试剂

8.1.1.1.1 病毒核酸提取试剂盒。

8.1.1.1.2 无核酸酶水：分子生物学级。

##### 8.1.1.2 材料

8.1.1.2.1 无菌带盖离心管：1.5 mL，无核酸酶。

8.1.1.2.2 无菌移液器吸头：10 μL、200 μL、1 mL，带滤芯，无核酸酶。

注：其他材料参照所用病毒核酸提取试剂盒。

#### 8.1.2 仪器和设备

8.1.2.1 生物安全柜：II级或II级以上。

8.1.2.2 高压灭菌器。

8.1.2.3 移液器：10 μL、200 μL、1 mL。

注：其他仪器和设备参照所用病毒核酸提取试剂盒。

#### 8.1.3 核酸提取步骤

在生物安全柜中打开装有污水样本浓缩液的离心管，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RT-PCR检测。剩余的浓缩液和核酸样本应于-80℃条件下冻存。

## 8.2 实时荧光 RT-PCR 检测

### 8.2.1 试剂和材料

#### 8.2.1.1 试剂

8.2.1.1.1 新型冠状病毒核酸检测试剂盒（荧光PCR法）。

8.2.1.1.2 无核酸酶水：分子生物学级。

#### 8.2.1.2 材料

8.2.1.2.1 无菌移液器吸头：10 μL、100 μL、200 μL、1 mL，带滤芯，无核酸酶。

8.2.1.2.2 无菌PCR管或PCR板：无核酸酶。

#### 8.2.2 仪器和设备

8.2.2.1 实时荧光PCR仪。

8.2.2.2 混匀器。

8.2.2.3 生物安全柜：II级或II级以上。

8.2.2.4 移液器：10 μL、100 μL、200 μL、1 mL。

注：其他仪器和设备参照所用新型冠状病毒核酸检测试剂盒。

#### 8.2.3 检测步骤

##### 8.2.3.1 检测靶标选择原则

采用双靶标检测，针对开放读码框1ab（open reading frame 1ab，ORF1ab）和核壳蛋白（nucleocapsid protein，N）。必要时可根据检测需求和相关规定进行调整。

### 8.2.3.2 反应体系

参照新型冠状病毒核酸检测试剂盒说明书。每个样本设置3个平行。

## 9 质量控制

### 9.1 富集浓缩质量控制

#### 9.1.1 富集浓缩阳性质量控制

9.1.1.1 将采集到的污水样本灭活后，加入污水中不存在的非人源病毒（如：鼠肝炎病毒、牛冠状病毒、牛呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒假病毒等阳性质控），加标浓度为1000 copies/mL，作为富集浓缩阳性质控样。富集浓缩阳性质控样检测过程与污水样本检测过程完全相同，但实时荧光 RT-PCR 时应使用相应核酸检测试剂盒。

9.1.1.2 在每一批次检测中应至少做一个富集浓缩阳性质控样。

#### 9.1.2 富集浓缩阴性质量控制

9.1.2.1 样本采集时用无核酸酶水代替污水样本，将其作为富集浓缩阴性质控样。富集浓缩阴性质控样检测过程与污水样本检测过程完全相同。

注：富集浓缩阴性质控样同时也是采样过程空白对照样。

9.1.2.2 在每一批次检测中应至少做一个富集浓缩阴性质控样。

### 9.2 核酸提取质量控制

#### 9.2.1 核酸提取阳性质量控制

9.2.1.1 使用9.1.1.1中阳性质控作为核酸提取过程阳性质控样。核酸提取阳性质控样检测过程与污水样本从核酸提取开始的检测过程完全相同，但实时荧光 RT-PCR 时应使用相应核酸检测试剂盒。

9.2.1.2 在每一批次核酸提取过程中应至少做一个核酸提取阳性质控样。

#### 9.2.2 核酸提取阴性质量控制

9.2.2.1 使用无核酸酶水作为核酸提取过程阴性质控样。核酸提取阴性质控样检测过程与污水样本从核酸提取开始的检测过程完全相同。

9.2.2.2 在每一批次核酸提取过程中应至少做一个核酸提取阴性质控样。

### 9.3 PCR 检测质量控制

#### 9.3.1 PCR 检测阳性质量控制

9.3.1.1 使用新型冠状病毒核酸检测试剂盒中的阳性质控作为 PCR 检测过程阳性质控样。制备反应体系时用 PCR 阳性质控样代替样本核酸加入，其他操作与污水样本 PCR 检测过程完全相同。

9.3.1.2 在每一批次实时荧光 RT-PCR 过程中应至少做一个 PCR 检测阳性质控样。

#### 9.3.2 PCR 检测阴性质量控制

9.3.2.1 使用新型冠状病毒核酸检测试剂盒中的阴性质控作为 PCR 检测过程阴性质控样。制备反应体系时用 PCR 阴性质控样代替样本核酸加入，其他操作与污水样本 PCR 检测过程完全相同。

9.3.2.2 在每一批次实时荧光 RT-PCR 过程中应至少做一个 PCR 检测阴性质控样。

## 10 结果与报告

### 10.1 实验有效性判断

实验结果应满足表1要求，否则实验视为无效。



表1 实验有效性判断标准

质控样类型	实验结果
富集浓缩阳性质控样	阳性
富集浓缩阴性质控样	阴性
核酸提取阳性质控样	阳性
核酸提取阴性质控样	阴性
PCR 检测阳性质控样	阳性
PCR 检测阴性质控样	阴性
注：以上6项需在一次实验中同时满足。	

## 10.2 结果判定

### 10.2.1 PCR 结果判断

10.2.1.1 阴性：无 Ct 值、无 S 形扩增曲线。

10.2.1.2 阳性：Ct 值小于或等于新型冠状病毒核酸检测试剂盒说明书规定值，且有 S 形扩增曲线。

注：或以产品说明书为准。

### 10.2.2 阳性样本判断

10.2.2.1 双靶标：同一份样本中新型冠状病毒 2 个靶标（ORF1ab 和 N）实时荧光 RT-PCR 均出现阳性检测结果，即 2 个靶标的 3 个平行样各出现至少 1 个阳性检测结果，样本判定为阳性，例如：ORF1ab +/ - / -，N - / + / -。

10.2.2.2 单靶标：同一份样本中新型冠状病毒单靶标（ORF1ab 或 N）实时荧光 RT-PCR 至少 2 个平行样出现阳性检测结果，样本判定为阳性，例如：ORF1ab + / + / -，N - / - / - 或 ORF1ab - / - / -，N + / + / -。当出现单个靶标只有 1 个平行样为阳性检测结果时，需对该样本重新进行富集浓缩和核酸提取，并进行实时荧光 RT-PCR 检测，若仍出现阳性检测结果，则样本判定为阳性。

## 10.3 结果报告

根据检测结果，报告“检出新型冠状病毒核酸”或“未检出新型冠状病毒核酸”。

## 11 实验室安全

### 11.1 生物安全

污水样本采集时个人防护要求应符合 WS/T 697 相关规定。样本灭活、检测等操作应在生物安全二级及以上实验室进行，同时采用不低于生物安全三级实验室的个人防护。水样采集后，富集浓缩、核酸提取和实时荧光 RT-PCR 检测等所有操作均应避免样本暴露于外环境。实验过程中产生的所有废弃物（包括剩余水样）均应经有效灭菌后再按医疗废弃物进行分类处理。

### 11.2 实验室设备使用安全

离心机应装有不平衡振动显示及报警装置。