

DB32

江苏省地方标准

DB32/T 3762.21—2023

新型冠状病毒检测技术规范 第21部分： 污水样本病毒富集浓缩和检测

Technical specifications for SARS-CoV-2 detection—Part 21:
Concentration and detection of virus in sewage samples

2023-07-25 发布

2023-08-25 实施

江苏省市场监督管理局 发布
中国标准出版社 出版

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 检出限与回收率	1
5 环境与设施	1
6 设备与耗材	2
7 试剂与材料	2
8 污水样本富集浓缩	2
9 核酸检测	3
10 标准曲线的建立	3
11 污水新冠病毒浓度定量	3
12 回收率计算	3
13 质量控制	4
14 结果与报告	4

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。

本文件是 DB32/T 3762《新型冠状病毒检测技术规范》的第 21 部分。DB32/T 3762 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：生物样本采集、运输和保存；
- 第 2 部分：病毒分离与鉴定；
- 第 3 部分：核酸荧光 PCR 检测程序；
- 第 4 部分：重组酶介导等温扩增程序；
- 第 5 部分：血清 IgM 和 IgG 抗体酶联免疫吸附检测程序；
- 第 6 部分：血清 IgM 和 IgG 抗体胶体金免疫层析检测程序；
- 第 7 部分：空气样本检测与评估；
- 第 8 部分：物体表面检测与评估；
- 第 9 部分：医务人员职业暴露检测与评估；
- 第 10 部分：微量血清中和试验；
- 第 11 部分：全基因组高通量测序；
- 第 12 部分：药物体外抗病毒效果测定；
- 第 13 部分：叠氮溴化丙锭—荧光 PCR 检测程序；
- 第 14 部分：N 亚基因组荧光 PCR 检测程序；
- 第 15 部分：血清/血浆 IgM 和 IgG 抗体磁微粒化学发光法检测程序；
- 第 16 部分：核酸数字 PCR 法；
- 第 17 部分：核酸检测用假病毒阳性质控品；
- 第 18 部分：规模化核酸检测程序；
- 第 19 部分：全自动核酸快速一体化检测；
- 第 20 部分：核酸荧光 PCR 检测质量控制；
- 第 21 部分：污水样本病毒富集浓缩和检测。

请注意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。

本文件由江苏省卫生标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、北京大学分子工程苏南研究院、苏州市疾病预防控制中心、无锡市疾病预防控制中心、扬州市疾病预防控制中心、常熟市疾病预防控制中心、未名环境分子诊断(常熟)有限公司、南京医科大学。

本文件主要起草人：丁震、周波、彭世富、李喜青、郑浩、张瑜、沈强、肖勇、徐勤、周正元、冯微宏、袁轩、管红霞、李鑫娜、龚利强、朱宝立、徐燕、朱媛园、王蕊。

新型冠状病毒检测技术规范 第21部分： 污水样本病毒富集浓缩和检测

1 范围

本文件规定了污水样本中新型冠状病毒富集浓缩和检测方法。

本文件适用于生活、医疗、商业和工业等污水样本中的新型冠状病毒的浓缩富集和检测。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

裂解法 **pyrolysis method**

利用裂解盐使污水中病毒核酸与蛋白分离,高盐条件下的污水通过滤膜,其核酸样本被膜吸附,完成富集过程,利用低盐条件将吸附的核酸样本从膜上洗脱,再进行后续检测分析。

3.2

回收率 **recovery efficiency**

浓缩富集后回收样本的总拷贝数与原污水样品中接种的病毒总拷贝数之比。

4 检出限与回收率

富集浓缩采用裂解法时,方法的检出限为 1 copy/mL,N 靶标的回收率为 16%~65%,ORF1ab 靶标的回收率为 10%~48%。

5 环境与设施

富集浓缩和检测等操作应在生物安全二级实验室(BSL-2)进行,同时采用不低于生物安全三级实验室的个人防护。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。新冠病毒核酸检测实验室应满足 GB 19489。

6 设备与耗材

6.1 设备

生物安全柜、移液器(10 μ L、50 μ L、200 μ L、1 mL)、电动移液器、冷冻离心机(4 $^{\circ}$ C、2 mL 转子)、pH 计(精度 \geq 0.01)、水浴锅、多孔真空抽滤装置、滚轴摇匀仪、电子天平(分辨力不低于 0.001 g)、实时荧光定量 PCR 仪或数字 PCR 仪。

6.2 耗材

N95 及以上防护口罩、医用无纺布帽、护目镜、连体防护服、一次性 PE 手套、一次性手术衣、乳胶手套、防水靴套。

7 试剂与材料

7.1 试剂

氯化钠(NaCl,分子生物学级)、无核酸酶水(分子生物学级)、乙醇(70%)、TE 缓冲液(1 mol/L Tris, 100 mmol/L EDTA)(配制方法:称取 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris,纯度 \geq 99%),3.36 g 乙二胺四乙酸二钠(纯度 \geq 99%),置于烧杯中,加入 70 mL 水,搅拌溶解后转移至试剂瓶中,用盐酸将 pH 调至 7.2,定容至 100 mL)。

7.2 材料

无菌锥形瓶(100 mL)、无菌无核酸酶带盖离心管(50 mL)、无菌无核酸酶移液器吸头(10 μ L、200 μ L、1 mL,带滤芯)、一次性玻璃纤维膜(1 μ m)、无菌注射器(50 mL)、核酸富集柱、无菌无核酸酶带盖离心管(1.5 mL)、增量管(25 mL)

注:其他材料参照所用病毒核酸提取、扩增试剂盒。

8 污水样本富集浓缩

8.1 样本灭活

样本灭活按照 WS/T 799—2022 中第 6 章执行。

8.2 预过滤

用大容量电动移液器移取 40 mL 灭活后的污水样本于 50 mL 无菌离心管中,加入 9.35 g NaCl 和 400 μ L TE 缓冲液,使用滚轴摇匀仪震荡混合,直至 NaCl 固体完全溶解。多孔真空抽滤装置上依次接 1 μ m 玻璃纤维膜和 50 mL 注射器套管,无菌锥形瓶放置于真空抽滤装置内对应位置。打开真空泵,在负压条件下将上述样品过滤收集到无菌锥形瓶中。关掉真空泵,打开阀门释放压力,取出锥形瓶,在滤液中加入 40 mL 70% 乙醇,振荡摇匀,室温静置 5 min。

注:未配备多孔真空抽滤装置的实验室可使用常规固相萃取装置代替,完成预过滤和富集浓缩步骤;未配备滚轴摇匀仪的实验室可手动摇匀,促进 NaCl 固体的溶解。

8.3 富集浓缩

多孔真空抽滤装置上依次连接核酸富集柱、增量管。打开真空泵,形成负压。将滤液与乙醇混合样混匀后,倒入增量管中,通过核酸富集柱完成浓缩步骤。

注:如污水样品较为浑浊,过滤速度慢或发生堵塞,可使用新的核酸富集柱进行替换,完成富集过程,同一污水样本所有的核酸富集柱的洗脱液作为该污水样本的浓缩液。

8.4 洗脱

待样品浓缩完成后,关掉真空泵,打开阀门释放压力,回收核酸富集柱。核酸富集柱置入配套离心管中,将无核酸酶水加入到柱膜中间,静置 3 min~5 min 后,4℃条件下 12 000 r/min 离心 1 min,收集洗脱液,最终获得的洗脱液即为该污水样本的浓缩液。后续可依据病毒核酸提取试剂盒说明完成提取步骤。

注:依据病毒核酸提取试剂盒所加入样本量体积,确定加入核酸富集柱无核酸酶水体积,两者体积可保持一致。洗脱的浓缩液为原始核酸样本,如果当天能完成提取和扩增步骤时,浓缩液 4℃保存;或冷冻在-80℃以备日后检测。

9 核酸检测

富集浓缩后样本的新冠病毒核酸检测按照 WS/T 799—2022 中第 8 章执行。

10 标准曲线的建立

污水中病毒核酸的浓度需通过标准曲线进行换算。建立标准曲线的样本应与目标实验的样本匹配,即相同的总 RNA 样本。标准曲线分析的稀释范围或动态范围应涵盖实验样本预期的浓度范围。本文中可选用新冠病毒核酸基因组标准物质制备标准曲线。将已知病毒核酸浓度的样本进行连续 10 倍或 5 倍梯度稀释,设置至少 6 个浓度梯度,每个浓度至少做 3 个样本平行,2 个扩增平行。以已知的连续稀释浓度的对数值为横坐标,该浓度对应的 C_t 值为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线应满足 $R^2 \geq 0.99$,扩增效率在 90%~110% 之间。

11 污水新冠病毒浓度定量

当污水样品判定为新冠核酸阳性后,可使用数字 PCR 仪完成上机前核酸样本浓度 C_s 的绝对定量;如使用实时荧光定量 PCR 仪检测,可使用标准曲线完成定量工作。浓缩处理前污水体积为 V_s mL,富集后浓缩液体积为 V_c μ L,从浓缩液中取出 V_e μ L 进行核酸提取,得到的核酸体积为 V_n μ L,对该核酸样本进行 RT-qPCR 分析,通过建立标准曲线,将样本检出 C_t 值代入标准曲线公式,换算为提取后的核酸浓度 C_s (copies/ μ L),污水中新冠病毒浓度 C_{ww} (copies/mL)按公式(1)计算:

$$C_{ww} = \frac{C_s \times V_n \times V_c}{V_s \times V_e} \dots\dots\dots (1)$$

注:由于方法回收率受个体操作、污水基质、病毒浓度和试剂盒众多因素影响,在实际操作过程中,难以实现每份污水样本的方法回收率数据的收集,故在此计算过程中忽略方法回收率的影响。

12 回收率计算

将已知浓度的新冠病毒假病毒加入到 40 mL 污水中,混合摇匀。后续步骤与污水样本检测操作保持一致,完成富集浓缩、提取和扩增步骤,以该样本的 C_t 值换算污水中新冠病毒浓度 C_{ww} (单位为 copies/mL),浓

缩处理前污水体积为 V_s mL(40 mL),根据接种假病毒浓度 C_0 (copies/mL)和接种假病毒体积 V_0 mL,污水浓缩富集过程的回收率 $R(\%)$,按公式(2)计算:

$$R(\%) = \frac{C_{ww} \times V_s}{C_0 \times V_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

注:所使用的污水样本需确定在加标前不含新冠病毒。当无法获知污水样本中是否含有新冠病毒,可使用其他外源性病毒完成方法回收率的计算。

13 质量控制

样本富集浓缩、检测的质量控制按照 WS/T 799—2022 中第 9 章执行。

14 结果与报告

实验结果的判定和报告按照 WS/T 799—2022 中第 10 章执行。
