

# 《水中病毒的富集浓缩方法》

## 编制说明

### 一、目的意义

#### （一）背景

水是人类赖以生存的重要资源，同时也是多种病毒贮存和迁徙的重要媒介。许多疾病可通过水体传播，导致散发、暴发或流行。在河流、湖泊、海洋、景观娱乐用水等环境水体，甚至是符合“饮用水卫生标准”的水体中，均有病毒检出的报告。因此，监测水体中病毒的污染状况，评价疫情趋势、预警公众健康，已成为当前环境卫生与公共健康领域的研究热点。

由于水体类型繁多，浊度不一且存在多种干扰物质，单位水体体积内病毒浓度极低，直接采用 RT-qPCR 方法检测水体中的病毒难以检出微量或痕量病毒。因此，需要针对不同浊度的水体进行合适的前处理，采用高效的富集和浓缩方法，以去除水体中的杂质和干扰物，提高单位体积水体目标病毒的浓度，从而提升检测的灵敏度和准确性。

目前，国内外针对水体中病毒的富集和浓缩方法主要基于病毒及其衣壳蛋白的物理化学特性、电荷作用以及亲（疏）水性，采用不同类型的滤膜（膜包）或化合物进行机械筛分、吸附截留或聚集沉淀。然而，由于水体环境复杂，水中病毒种类繁多，不同学者在不同水体环境下的富集方法各不相同，富集效率也存在较大差异，难以兼顾复杂水体环境的干扰因素。因此，尚缺乏一种针对不同水体浊度并兼具高效性、稳定

性和可推广性的病毒富集和浓缩方法。我国尚无针对不同浊度水体中病毒富集和浓缩的统一标准。

## （二）必要性

标准的缺失导致各实验室采用的检测方法不尽相同，检测结果难以横向比较，影响疫情监测、风险评估以及疾病防控工作的有效性。因此，制定统一的《水体中病毒的富集和浓缩方法》地方标准，具有重要的现实意义。

首先，该标准能够规范水体病毒检测的前处理步骤，提高检测的灵敏度和可靠性。其次，可为地表水、饮用水及环境水体的病毒污染监测提供技术支撑，增强突发公共卫生事件的应对能力。此外，为科研机构、疾控中心、环境监测站提供统一的实验操作流程，提高数据的可比性，同时为政府和监管机构提供科学依据，推动水体病毒污染控制相关法规 and 政策的实施。

推广本标准可以提升水质安全监测能力，提高地表水、饮用水及环境水体的病毒监测能力，降低水媒传染病的传播风险。同时，该标准能够有效支持疫情趋势评估、预警及公共卫生干预措施的制定，加强环境治理，为水资源管理和环境保护提供科学依据。在经济效益方面，优化的富集和浓缩方法可提高检测效率，减少实验耗材和时间成本。同时，有助于环境监测、疾控和水处理行业的发展，促进相关产品和技术的研发及市场推广。

## （三）可行性

本研究团队已对多种水体病毒富集和浓缩方法进行系统研究，并通过实验优化筛选出适用于不同浊度水体的高效方法。采用膜吸附-超滤法，结合不同的预处理手段，对不同水体浊度（ $\leq 1$  NTU、 $1 < \text{NTU} \leq 5$ 、 $\geq 5$  NTU）进行分类优化，实现病毒的高效富集。该方法具有适应性强的特点，可针对不同水体浊度进行分类优化，提高病毒回收率。同时，其操作简便，无需专门购置大型仪器设备，适用于各级实验室推广应用。此外，实验结果表明，该方法的病毒回收率稳定，检测效率高。结合 RT-qPCR 技术，可对目标病毒进行高灵敏度、特异性检测。

本研究基于水体病毒富集和浓缩技术的系统优化，提出了一种适用于不同浊度水体的高效富集方法，能够有效提升水体病毒检测的灵敏度和稳定性。制定《水体中病毒的富集和浓缩方法》地方标准，不仅具有重要的科学价值，也能为水体安全监测、公共卫生防控及相关产业发展提供有力支撑。该标准的实施，将有助于提升水环境管理水平，保障公共健康，并推动水质安全监测技术的标准化和规范化。

## 二、任务来源

本项目来源于江苏省市场监督管理局《省市场监管局关于下达 2023 年度江苏省地方标准项目计划的通知》（苏市监标〔2023〕173 号）。计划项目名称：《水体中病毒的富集和浓缩方法》，计划项目序号为 197。本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心（江苏省预防医学科学院）、无锡市疾病预防控制中心、江苏省农业科学院。对口行政主管部门为江苏省卫生健康委员会。

## 三、编制过程

## （一）成立工作组

2021 年对江苏省 13 个设区市疾控中心微生物实验室对水中诺如病毒检测能力进行摸底，采用问卷调查的方式，主要调查各实验室开展果相关实验，使用的方法、仪器设备、检测效果等。发现 13 个设区市的实验室做过相关实验，但是没有统一的方法，觉得相关工作开展困难。

2021 年 11 月在南京召开水中食源性病毒富集和检测技术工作会议，邀请省内专家对方法的可行性进行会商，建立项目工作组和课题研究组。

## （二）实验研究和论证形成讨论稿

2022 年 1 月-2022 年 8 月开展纯水中病毒三种富集方法的比较研究。

2022 年 9 月 2023 年 6 月开展纯水中病毒富集和浓缩方法优化及筛选研究。

2023 年 7 月-2024 年 2 月开展污水中病毒富集与浓缩方法的优化研究。

2024 年 1 月在南京召开水体中病毒富集浓缩和检测标准中期研制会议，标准起草组人员同与会专家对标准研制过程中的技术问题探讨和答疑，与会专家分别提出了对标准进行完善和修正的建议，课题组将针对专家意见进行完善和整改，对缺少的实验数据进行补充、更新。

2024 年 3 月-2024 年 9 月开展不同病毒在污水中富集与浓缩效果验证研究。

2024 年 6 月~2025 年 3 月邀请 6 家第三方实验室开展室间方法验证。

2024 年 10 月，汇总分析数据，形成标准讨论稿及编制说明初稿。

## （三）形成征求意见稿

2024 年 11 月在南京召开水体中病毒富集和浓缩标准方法研讨会，工作组和课题组将研究结果向专家进行汇报，听取专家对讨论稿的意见，对讨论稿进行修订完善，修订编制说明，形成标准征求意见稿。

（四）征求意见及专家咨询

2024 年 12 月~2025 年 1 月，标准征求意见稿及编制说明由经工作组审核后，通过专家研讨会和“发函”方式征求意见，意见征求对象包括疾病预防控制中心、高等院校等。截止 2025 年 6 月，共发函 30 个单位/专家，收到 23 个单位/专家回函，共收到意见 88 条，其中采纳 77 条，部分采纳 0 条，不采纳 11 条。工作组对反馈意见进行认真汇总和分析，形成《地方标准征求意见汇总表》，并对各条意见均进行了回复，列出了处理的详细理由。具体见征求意见汇总表 1。

表 1 意见处理情况汇总表				
章节	采纳数 (条)	部分采纳数 (条)	不采纳数 (条)	小计 (条)
全文	12	0	3	15
引言	2	0	0	2
范围	8	0	1	9
规范性引用文件	3	0	0	3
术语和定义	2	0	0	2
原理	1	0	0	1
试剂和材料	3	0	0	3
设备	5	0	4	9
操作步骤	17	0	1	18
病毒核酸提取和纯化	7	0	0	7
RT-qPCR 反应体系和参数	1	0	0	1
质量控制	7	0	2	9
生物安全	1	0	0	1
附录	8	0	0	8
合计	77	0	11	88
合计 (%)	87.5	0	12.5	100

（五）终审形成标准报批稿

2025 年 7 月，工作组根据《地方标准征求意见汇总表》对标准征求意见稿进行补充、修改及完善，7 月 28 日在南京召开《水体中病毒的富集和浓缩方法》专家预审会议，审查文本的送审讨论稿、编制说明和征求意见等材料，工作组根据专家意见对送审讨论稿进行修改和完善。

2025 年 9 月，在南京召开江苏省地方标准《水中病毒的富集浓缩方法》审查会议，专家组对标准送审稿进行认真审查，提出具体意见和建议，形成审查会议纪要。与会专家一致同意该标准通过审查，建议起草单位按照专家组意见对标准进行修改，形成报批稿，报江苏省市场监督管理局批准发布。2025 年 11 月最终确定形成标准报批稿。

## 四、主要内容

### （一）适用范围

本文件规定了水中病毒的富集浓缩方法。本文件适用于水源水、生活饮用水、娱乐景观用水、污水等水样中噬菌体病毒、诺如病毒、柯萨奇病毒、轮状病毒、肠道病毒、星状病毒、腺病毒、新冠病毒、札如病毒、呼吸道合胞病毒等病毒的富集浓缩。各类水体因自然环境和人为活动的不同，其浊度和悬浮物含量存在较大差异，直接影响病毒在水体中的分布和浓度。针对这一特点，本标准在制定时充分考虑了不同水体浊度对病毒富集过程的影响，提出了分类预处理和优化的技术措施，确保在低浊度和高浊度水体中均能实现高效的病毒富集和浓缩。

在浊度较低（ $\leq 1$  NTU）的水体中，悬浮物含量少，干扰因素相对较低，病毒富集过程中可直接采用膜吸附法进入后续操作；而对于中等浊度（ $1 < \text{NTU} \leq 5$ ）和高浊度（ $> 5$  NTU）的水体，则需先通过预过滤步骤去

除大颗粒悬浮物，以降低干扰，保证病毒能够充分接触到负电性滤膜。通过预过滤后，再向水样中添加一定浓度的多价阳离子（如将阳离子浓度调至 0.025 mol/L），利用病毒与滤膜之间的静电作用，使病毒得以吸附在混合纤维素酯膜上，从而为后续的洗脱和超滤浓缩打下基础。

前期课题组开展的研究表明，针对不同水体浊度，膜吸附-超滤法较之单一膜吸附法或膜吸附-PEG 法，能显著提高病毒回收率。研究中采用 MS2 噬菌体作为目标病毒，经过多组实验比对，在纯净水中优化后的膜吸附-超滤法回收率最高可达 81.20%，而在污水等复杂水体中也能实现 81.91% 的高回收率。实验数据充分证明，关键参数（如阳离子浓度、滤膜孔径、预过滤方式、洗脱液成分及超滤管截留分子量等）对病毒富集效率具有显著影响。特别是通过对混合纤维素酯膜（MCE 膜）孔径选择（0.22  $\mu\text{m}$  优于其他规格）、预过滤方式（采用 1.2  $\mu\text{m}$  预过滤膜优于定性滤纸）等方面的优化，标准方法能够针对不同浊度水体进行有针对性的调整，保证在各类水体中均获得较高的富集效率。此外，本标准还结合了质量控制体系，规定了过程控制病毒、扩增控制及阴阳性对照等措施，确保整个富集、浓缩及核酸检测流程的准确性和重复性。这不仅为各级实验室提供了一套标准化、易操作的病毒富集检测方法，也为政府部门及公共卫生机构在水质安全监测、疫情预警和疾病防控中提供了可靠的技术支持。本标准适用范围广泛，不仅涵盖各类天然和人工水体，同时针对不同水体浊度采取了差异化的预处理和优化方案。前期研究成果的验证使得该标准在理论与实践上均具备较高的可操作性和推广价

值，能够有效解决因水体复杂性而导致的病毒检测灵敏度不足问题，为水体病毒监测和公共卫生风险评估提供坚实的技术保障。

## （二）原理

本标准采用的病毒富集和浓缩方法基于水体中病毒的电荷特性及粒径差异。首先，根据水体浊度将样品分为低、中、高浊度组。对于浊度较高的水体，通过预过滤去除大颗粒悬浮物，减少干扰，使后续病毒吸附更为充分；而低浊度水体则可直接进入吸附步骤。接下来，在水样中添加适量的多价阳离子（如  $\text{Mg}^{2+}$ ），使病毒表面负电荷得到中和，并在病毒与负电性混合纤维素酯滤膜之间形成桥联，从而促使病毒高效吸附于滤膜上。在吸附后，将滤膜剪碎后置于含 1% TGBE 洗脱液的离心管中，通过震荡洗脱使吸附的病毒脱附进入洗脱液。由于洗脱液中病毒浓度仍较低，随后采用超滤技术进行二次浓缩。超滤管内置具有特定截留分子量（如 30 kD）的膜，能够将病毒颗粒截留，而洗脱液中的小分子物质则透过滤膜，从而实现病毒浓缩。整个流程中，通过控制阳离子浓度、pH 值和洗脱条件，保证了病毒在吸附、洗脱及浓缩各环节的高效转移。

为确保实验结果的准确性和重复性，标准中还引入了质量控制措施，如在样品中预加已知浓度的过程控制病毒（例如 MS2 噬菌体），并设置空白对照、阳性和阴性对照。通过对过程控制病毒的回收率进行检测，可实时监控各个操作环节的效果，及时发现并纠正可能存在的问题。结合 RT-qPCR 检测技术，整个方法既保证了富集效率，又提高了后续核酸检测的灵敏度。该方法通过预处理、阳离子调控、滤膜吸附、震荡洗脱及超滤浓缩等步骤，有效解决了不同水体浊度和复杂干扰因素对病毒检



测带来的挑战。经过前期研究验证，该方法在纯净水和污水等多种水体中的回收率均表现优异，具备操作简便、设备依赖性低和易于推广应用等优点，为水体中病毒监测、疫情预警及环境风险评估提供了科学、可靠的技术支持。

### （三）膜吸附-超滤法的确定

在水体病毒监测中，水样中病毒浓度低的问题一直是检测灵敏度不足的重要原因。为了提高病毒浓度，膜吸附-超滤法应运而生，其基本思路是先利用膜吸附将病毒从大体积水样中捕获，再通过超滤浓缩步骤将病毒进一步集中。相比于单独的膜吸附法或膜吸附-PEG 法，膜吸附-超滤法在实验中展现出了更高的回收率和更好的稳定性。

首先，膜吸附-超滤法的第一步采用混合纤维素酯滤膜对水样中的病毒进行初步富集。利用添加多价阳离子（如  $Mg^{2+}$ ）调节水样 pH 至 3.0 左右，使病毒表面带负电荷在阳离子桥联的作用下，能够有效吸附于负电性的混合纤维素酯滤膜上。实验数据表明，在高浓度水样中（0.5 PFU/ $\mu$ L），使用混合纤维素酯滤膜的吸附效果较好，其平均回收率可达到约 23.92%，而在低浓度水样（0.05 PFU/ $\mu$ L）中，其回收率也达到 15.67%。相比之下，单独使用膜吸附法的回收率分别仅为 10.31% 和 7.79%，而膜吸附-PEG 法的回收率略有改善，但仍低于膜吸附-超滤法。从表 2 和图 1 中可以看出，无论在高浓度还是低浓度水样中，膜吸附-超滤法均能获得更高的病毒回收率。统计学分析显示，方法因素对回收率的影响具有显著性（ $P < 0.01$ ），进一步验证了膜吸附-超滤法在实际应用中的优势。膜吸附-超滤法不仅在回收效率上优于其他方法，其操作流程也较为简便。

经过膜吸附后，将滤膜剪碎并用适量的 TGBE 洗脱液进行震荡洗脱，可以充分释放膜上吸附的病毒。随后，利用超滤管进行二次浓缩，不仅显著降低了洗脱液体积，而且能将病毒颗粒集中到极小的体积中，极大提高了后续 RT-qPCR 检测的灵敏度。与 PEG 沉淀法相比，膜吸附-超滤法对离心设备依赖性较低，且操作时间短，适合大批量水样同时处理，便于在现场快速应用。

表 2 三种富集方法回收率比较

浓度	方法	Ct 值	平均回收率 (%)	95 % 置信区间 (CI)	
				下限 (%)	上限 (%)
高浓度 (0.5PFU/μL)	膜吸附-超滤法	28.07±1.02	23.92±14.43	14.75	33.09
	膜吸附法	30.38±0.87	10.31±5.80	4.22	16.39
	膜吸附-PEG 法	28.76±1.02	15.52±10.28	8.99	22.05
	总计	28.81±1.29	17.84±12.42	13.20	22.48
低浓度 (0.05PFU/μL)	膜吸附-超滤法	32.25±0.92	15.67±8.08	10.54	20.81
	膜吸附法	34.35±0.81	7.79±3.90	3.7	11.89
	膜吸附-PEG 法	33.08±1.08	9.90±7.06	5.42	14.39
	总计	33.0±1.22	11.79±7.57	8.96	14.62
合计	膜吸附-超滤法	30.16±2.33	19.80±12.19	14.65	24.95
	膜吸附法	32.36±2.23	9.05±4.89	5.94	12.16
	膜吸附-PEG 法	30.92±2.43	12.71±9.09	8.87	16.55
	总计	30.90±2.45	14.81±10.64	12.07	17.56

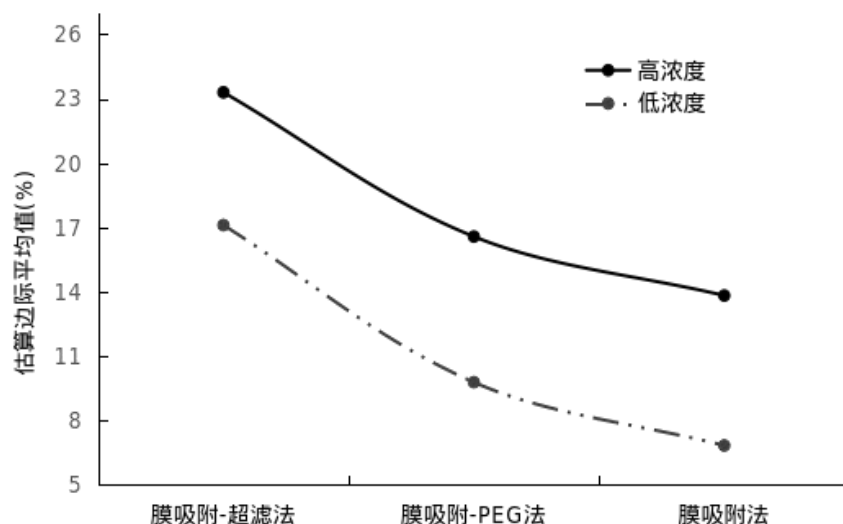


图 1 三种富集方法回收率估算平均值图

#### (四) 混合纤维素酯过滤膜的确定

混合纤维素酯过滤膜因其优异的物理化学特性而成为病毒富集的首选材料。从实验数据来看，使用混合纤维素酯膜（无论是 142 mm、0.45  $\mu\text{m}$  还是 47 mm、0.45  $\mu\text{m}$  规格）均能实现较高的病毒回收率，而与之对比的尼龙膜（47 mm、0.22  $\mu\text{m}$ ）回收率却远远低于前者（见表 3）。数据表明，混合纤维素酯膜在病毒吸附方面的回收率均维持在 20% 左右，而尼龙膜仅为 0.62% 左右，这种巨大差异充分说明了混合纤维素酯膜在捕获病毒方面的明显优势。混合纤维素酯膜有均一的孔径和高孔隙率，提供了较为均匀的孔径结构和较大的有效吸附面积，能够在预处理阶段高效截留悬浮物，同时为病毒与膜表面之间的接触提供足够机会。混合纤维素酯膜表面具有一定的负电性，在加入多价阳离子（如  $\text{Mg}^{2+}$ ）后，通过电荷中和和桥联效应，病毒（通常带负电）更易被吸附。这种特性在实验中得到了验证，其回收率显著高于其他材料。实验中，无论使用 142 mm 还是 47 mm 规格的混合纤维素酯膜，均能获得稳定且较高的回

收率；此外，膜与超滤管的配合进一步提高了病毒浓缩效率，使得后续的核酸检测更为灵敏可靠。

表 2 不同实验条件回收率比较

滤膜	超滤管	提取方法	平均回收率 (%)	95 % 置信区间 (CI)	
				下限 (%)	上限 (%)
混合纤维素酯膜 (142 mm、0.45 μm)	Ultr-15 (100K)	硅胶离心柱法	23.92±14.43	14.75	33.09
混合纤维素酯膜 (47 mm、0.45 μm)	Ultr-15 (100K)	硅胶离心柱法	23.34± 15.53	13.47	33.21
尼龙膜 (47 mm、0.22 μm)	Ultr-15 (100K)	硅胶离心柱法	0.62 ± 0.58	0.25	0.99
混合纤维素酯膜 (142 mm、0.45 μm)	Ultr-15 (50K)	硅胶离心柱法	26.05±19.59	13.6	38.9
混合纤维素酯膜 (142 mm、0.45 μm)	Ultr-15 (100K)	磁珠法	21.47 ± 14.45	12.29	30.64

（五）过程控制和扩增控制

过程控制和扩增控制在标准方法中起到了确保检测全过程质量和结果可靠性的关键作用。过程控制通过在水样中预先加入已知浓度的过程控制病毒来实现。由于水体中病毒浓度通常极低，且在预过滤、膜吸附、洗脱、超滤浓缩以及核酸提取等多个步骤中可能会造成病毒损失或受到干扰，过程控制病毒可以贯穿整个富集与检测流程。通过对比检测后回收的过程控制病毒数量与初始加入量，能够评估整个处理过程的回收效率，判断方法是否在各个操作环节中均保持了良好的稳定性和重复性。通过过程控制病毒的加标和回收率计算，能够量化整个操作流程的损失情况，确保在不同水体类型中都能达到预期的检测敏感性和准确性。扩增控制主要用于监测 RT-qPCR 反应过程，确保核酸提取和扩增步骤的有效性。扩增控制包括阳性对照和阴性对照，以及有时加入的扩增抑制对照。通过在每次 RT-qPCR 检测中同时设立扩增对照，可以判断 PCR 反

应是否受到样品中潜在抑制剂的干扰，同时验证试剂和仪器的正常运行情况。如果扩增控制显示出异常，说明检测流程中可能存在操作失误或试剂问题，需要重新检测或调整方法。环境水样中常含有各种有机物、悬浮颗粒及其他干扰物，这些因素都可能对 PCR 扩增产生抑制作用，扩增控制是判断 RT-qPCR 反应是否达到理想扩增效率的重要保障。

通过过程控制病毒的回收率评估，我们发现在优化后的膜吸附-超滤法中，纯净水样中 MS2 噬菌体的回收率可达到 81.20%（95% CI = 71.86%~90.54%），而在污水样本中，通过预过滤后相应优化条件下，回收率可达到 81.91%（95% CI = 76.69%~87.14%）。这些数据表明，在整个富集和浓缩流程中，虽然存在多步骤操作，但通过过程控制病毒的监测，我们可以量化每一步的损失情况，从而确保方法在不同水质条件下均能实现高效病毒回收。在扩增控制方面，RT-qPCR 检测中我们构建了 MS2 噬菌体标准曲线，通过在每个 PCR 板上同时设置扩增阳性对照和阴性对照，我们能够及时检测 PCR 反应是否受到样品中抑制物（如有机物、悬浮颗粒等）的影响。实际检测中，扩增对照均显示出与标准曲线一致的 Ct 值，证明 PCR 反应未受显著抑制，从而确保核酸提取和扩增步骤的有效性。

## （六）不同浊度水样的预处理

对不同水样的实验数据进行比较，预过滤在去除水体中较大颗粒和干扰物质方面起到至关重要的作用。水样中悬浮物浓度较高时，会阻塞混合纤维素酯滤膜，还可能导致病毒与膜表面之间的吸附位点被覆盖，从而降低病毒的富集效率。实验显示，当水样浊度 $\leq 1$  NTU 时，水质较为

清澈，悬浮颗粒和其他干扰物质含量低，病毒在富集过程中不易受到显著干扰；当水样浊度 $>1$  NTU 时，水中悬浮物增多，这可能堵塞滤膜，还会与病毒竞争膜表面吸附位点，影响阳离子桥联和病毒的高效吸附。基于此，将 1 NTU 作为界限，区分不同的处理策略：对于浊度 $\leq 1$  NTU 的水样，可省略预过滤步骤，使病毒直接进入膜吸附流程；对于浊度 $>1$  NTU 的水样，需通过预过滤（如采用  $1.2\ \mu\text{m}$  MCE 膜）先去除大颗粒干扰物，确保膜吸附步骤中病毒与滤膜之间能有更充分、有效的接触。将水样浊度作为正交试验的关键因素之一进行研究，以 1 NTU 作为判断水质清澈程度的界限。实验数据显示，不同浊度条件下的病毒回收率存在显著差异，其主要影响因素的排序为：阳离子浓度  $>$  水样浊度  $>$  预过滤方式  $>$  MCE 膜孔径。具体而言，当污水浊度处于 $<1\sim 5$  NTU 范围内时，经  $1.2\ \mu\text{m}$  MCE 膜预过滤后，采用优化的膜吸附-超滤法能够获得最高的病毒回收率，达到 81.913%（95% CI: 76.686%~87.140%），保证了病毒与滤膜之间的高效吸附。依据国家标准，1 NTU 被视为水样清澈与否的分界点，采用 1 NTU 作为初步分类依据，将水样分为低浊度（ $\leq 1$  NTU）和中高浊度（ $>1$  NTU）两大类。在低浊度水样中，由于悬浮物较少，直接进行膜吸附步骤即可实现较高的病毒富集效果；而在浊度高于 1 NTU 的水样中，预过滤步骤显得尤为必要，以有效去除大颗粒干扰物，避免其阻碍病毒与混合纤维素酯滤膜之间的结合。因此在标准方法中规定了不同浊度水样的预处理策略，从而确保无论在纯净水还是在复杂的污水环境中，均能实现稳定、可重复的病毒富集效果。这种依据水样浊度调

整处理流程的做法，优化了整个富集流程的效率，也为后续病毒核酸检测提供了数据支撑。

### （七）吸附过程

结合前期研究，针对方法中吸附过程条件的选择，特别是阳离子浓度调控（ $\text{MgCl}_2$ 浓度设定为  $0.025 \text{ mol/L}$ ）、酸化水样至  $\text{pH } 3.0 \pm 0.5$ 、选用孔径为  $0.22 \mu\text{m}$  的混合纤维素酯（MCE）过滤膜，有相应的实验数据支持。这些条件直接影响病毒在滤膜表面的吸附效率，是实现高效、稳定富集的关键因素。病毒颗粒通常带有负电荷，滤膜表面（如混合纤维素酯膜）也带负电，导致两者在中性或低离子强度环境下排斥，难以形成有效吸附。而加入多价阳离子（如  $\text{Mg}^{2+}$ ）可通过电荷中和或“桥联”机制，在病毒与滤膜之间形成静电桥梁，增强病毒对滤膜的吸附。在前期研究中，以不同浓度的  $\text{MgCl}_2$ （ $0.025 \text{ mol/L}$ 、 $0.05 \text{ mol/L}$ 、 $0.1 \text{ mol/L}$ ）作为变量，比较其对 MS2 噬菌体回收率的影响，结果显示  $0.025 \text{ mol/L}$  时病毒回收率最高，达到  $81.913\%$ （ $95\%\text{CI: } 76.686\% \sim 87.140\%$ ）。随着浓度进一步升高，回收率反而下降，这可能与高离子强度对病毒结构稳定性造成影响，或导致滤膜表面电荷屏蔽过强有关。因此， $0.025 \text{ mol/L}$  为病毒吸附效率与溶液稳定性的最优平衡点。

$\text{pH}$  值直接影响病毒粒子和滤膜表面的电荷状态，是病毒吸附过程中的关键参数。在中性或碱性条件下，病毒和滤膜表面均为强负电，吸附效率较差。而在酸性环境下，病毒的表面电荷密度降低，滤膜上的负电位也被部分抑制，有利于多价阳离子（如  $\text{Mg}^{2+}$ ）进行桥联作用。前期实验中将  $\text{pH}$  设定为  $3.0 \pm 0.5$ ，不仅有利于阳离子“桥接”机制的建立，而

且可在一定程度上增强病毒对滤膜的静电吸附。特别是在富集低浓度水样或污水样本中，酸化处理能显著提高膜吸附效率和回收率。而选择 1 mol/L 的盐酸为调节剂，是基于其操作简便、调节精确且不引入其他离子干扰的优势。

滤膜的材质与孔径决定了病毒能否被有效截留或吸附。尽管病毒粒径远小于 0.22  $\mu\text{m}$ （如 MS2 约 27 nm，诺如病毒约 30–40 nm），但膜吸附并非依赖物理筛选，而是基于膜表面的电荷特性进行静电吸附。实验中对三种不同类型和孔径的滤膜（MCE 膜 0.22  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ ；尼龙膜 0.22  $\mu\text{m}$ ）进行比较。0.22  $\mu\text{m}$  MCE 膜的病毒回收率显著高于其他膜类型；MCE 膜具有良好的亲水性和表面均一性，电荷密度适中，适合作为阴离子吸附膜；而尼龙膜对病毒的回收率极低（平均仅 0.62%），可能与其材质电荷不适宜病毒吸附有关。选用 0.22  $\mu\text{m}$  MCE 膜在保证流速和不过度阻塞的前提下，提供了最大的吸附面积和最佳电荷环境，实现病毒高效截留。

## （八）洗脱过程

使用 1% TGBE 洗脱液是经过实验验证后的最优选择，其目的在于高效、温和地洗脱吸附在滤膜上的病毒颗粒，并保持其结构和核酸完整性，确保后续核酸提取和分子检测的准确性。Tris-Base 可以维持碱性环境（pH 9.0–9.5），有助于打破病毒与滤膜之间的静电吸附作用，增强病毒脱附效率；Glycine（甘氨酸）作为两性电解质，可以缓冲和稳定 pH，同时提供一定的离子强度，协助改变病毒粒子的电荷状态；Beef Extract（牛



肉膏) 含有多多种氨基酸、肽类和有机分子, 具有蛋白竞争吸附作用, 能与滤膜表面结合, 置换被吸附的病毒, 使其进入洗脱液。

在前期研究中对不同浓度的 TGBE 洗脱液进行筛选, 发现过低浓度 (如 0.5%) 可能导致洗脱力不足, 病毒解吸效率低, 回收率下降; 过高浓度 (如 2% 以上) 虽可增强洗脱力, 但可能带入过多有机杂质或抑制物, 干扰后续 RT-qPCR 检测。在 1% TGBE 浓度下, MS2 噬菌体在纯净水和污水中回收率最高, 回收率可达 81.913% (95% CI: 76.686%~87.140%), 明显优于其他洗脱液或浓度组合。

### (九) 浓缩过程

在浓缩步骤中, 离心速度、时间以及超滤管的选择是直接决定病毒回收率和检测灵敏度的关键因素。通过前期实验研究中正交试验和回收率评估, 确定离心速度为 3000g, 时间为 15min, 截留分子量 30 kD 的超滤管。实验中对不同离心力 (2000 g、3000 g、4000 g) 进行了比较, 发现 3000 g 是病毒回收率最优的离心力, 在低于 3000 g 时透滤速率慢、浓缩不充分, 高于 3000 g 时可能因压力过大导致膜堵塞或病毒受损, 影响后续检测。在 3000 g 下离心时间 15 分钟可将原始洗脱液浓缩至 0.5 mL 以下, 基本达到检测所需浓度, 延长至 20 min 或 30 min 对回收率提升作用不明显, 反而可能导致病毒粘附于膜面造成损失。比较了 30 kD、50 kD 和 100 kD 三种截留分子量的超滤管, 发现 30 kD 的超滤管回收率最高, 在污水样本中对 MS2 噬菌体 (直径约 27 nm, 分子量介于 2–3 MDa) 回收率达到 81.913% (95% CI: 76.686%–87.140%); 50 kD、100 kD 超滤管对 MS2 的回收率下降, 可能因部分病毒颗粒通过滤膜造成损失; 30

kD 超滤管在保证回收率的同时，对大部分干扰物（如可溶性有机物、PCR 抑制因子）有较强去除作用，有利于后续 RT-qPCR 检测的准确性。

## 10.核酸提取和纯化

Trizol 试剂结合酚-氯仿异丙醇沉淀的方法，并使用乙醇洗涤，是经典的核酸提取纯化方法，首先通过 Trizol 试剂中异硫氰酸胍的强大变性作用，高效裂解病毒颗粒，从而释放出核酸，同时有效抑制核酸酶活性，保护核酸不被降解。酚-氯仿抽提步骤则能进一步分离蛋白质、脂质及大部分有机杂质，确保核酸处于水相中，为后续纯化奠定基础。此方法的普适性强，能够从多种生物样本中提取 RNA 和 DNA，使其适用于水体中可能存在的多种不同类型病毒的核酸提取需求。此外，该方法所需的试剂成本相对较低，操作流程清晰，实验室人员经过培训后易于掌握，具备良好的经济性和可操作性。最终，异丙醇沉淀能高效浓缩和纯化核酸，结合后续的乙醇洗涤，可进一步去除盐离子和残留杂质，从而获得较高纯度的核酸，这对于后续灵敏的实时荧光 RT-qPCR 检测至关重要，有助于减少 PCR 抑制物的干扰，确保检测结果的准确性和可靠性。标准文本同时提及，也可选用商品化的病毒核酸提取纯化试剂盒，以满足不同实验室的具体需求。

## 五、技术指标确定的依据

### （一）方法确定依据

本标准的主要技术指标确定，是基于前期一系列研究成果的综合考量与优化，旨在建立一套科学、高效且适用于多种水体的病毒富集和浓缩方法。使用膜吸附-超滤法作为核心技术路线，这是通过与单一膜

吸附法及膜吸附-PEG 法进行对比验证后确定的。研究数据显示，膜吸附-超滤法在纯净水中的平均回收率最高，达到  $19.80\% \pm 12.19\%$ ，显著优于膜吸附-PEG 法的  $12.71\% \pm 9.09\%$  和膜吸附法的  $9.05\% \pm 4.89\%$ 。这表明二次富集能有效提高富集效率，且膜吸附-超滤法操作简便、耗时短、对设备依赖性低，具备更强的推广应用潜力。针对水体浊度的复杂性，使用差异化的预处理策略。前期研究发现，水样浊度对病毒富集效果影响显著，其中阳离子浓度是影响最大的因素，其次是水样浊度、预过滤方式和 MCE 膜孔径。当水样浊度  $\leq 1\text{NTU}$  时，水质清澈，可直接进入膜吸附步骤。对于浊度  $> 1\text{NTU}$  的水样，需进行预过滤以去除大颗粒悬浮物和干扰物质。研究表明，采用  $1.2\mu\text{m}$  MCE 膜进行预过滤优于定性滤纸。在优化条件下，污水浊度处于  $1 \sim 5\text{NTU}$  范围时，经预过滤后可实现高达  $81.913\%$  的病毒回收率。

在吸附过程中，阳离子浓度、pH 值和滤膜选择是关键技术指标。研究表明，将阳离子终浓度调节至  $0.025\text{mol/L}$  能获得最优的病毒回收率，因为其在高浓度下可能会与病毒竞争结合位点。同时，将水样 pH 值调节至  $3.0 \pm 0.5$  有利于多价阳离子与病毒及带负电荷的滤膜形成“桥联”作用，增强吸附效率。关于滤膜材质和孔径，研究对比了混合纤维素酯膜和尼龙膜，结果显示混合纤维素酯膜（MCE 膜）的吸附效果显著优于尼龙膜。其中，孔径为  $0.22\mu\text{m}$  的 MCE 膜在保证流速的同时，提供了最佳的吸附面积和电荷环境，其回收率显著高于  $0.45\mu\text{m}$  和  $1.2\mu\text{m}$ 。洗脱过程中，洗脱液种类和洗脱方式至关重要。研究筛选出  $1\% \text{TGBE}$ （Tris-glycine-beef extract）作为最优洗脱液。TGBE 中的 Tris-Base 提供

碱性环境以打破静电吸附，甘氨酸稳定 pH，而牛肉膏则通过竞争吸附机制促进病毒脱附。震荡洗脱被确定为最优洗脱方式，能有效将病毒从滤膜上洗脱下来。

浓缩过程主要通过超滤管的截留分子量和离心力进行优化。研究结果显示，选用截留分子量为 30kD 的超滤管和 3000g 的离心力能获得最佳的病毒回收率。更高的离心力可能导致病毒透过滤膜或对膜造成损害。这些优化后的条件使得纯净水中 MS2 噬菌体的回收率可达 81.20%，污水中 MS2 噬菌体的回收率可达 81.913%。质量控制体系，包括空白对照、过程控制对照、扩增控制阴性/阳性对照、核酸提取阴性/阳性对照和核酸检测阴性/阳性对照。过程控制病毒（如 MS2 噬菌体和门哥病毒）的回收率需 $\geq 1\%$ ，以及扩增抑制指数的判定，以确保整个富集浓缩及核酸检测流程的准确性和重复性。这些指标的确定均有坚实的实验数据支撑，共同构成了本标准的核心技术框架。

## （二）实验论证

1 柯萨奇病毒 CA6（回收率 24.64%~50.45%）；检出限 100copies/L；见表 4。

表 4 柯萨奇病毒 CA6 检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	平均回 收率(%)
100000	32.06	31.08	30.571	31.664	32.645	32.571	31.77	0.83	2.60	44.10
10000	34.71	33.34	35.581	34.626	35.059	34.914	34.71	0.75	2.16	37.91
1000	36.43	36.27	38.796	36.732	37.451	37.153	37.14	0.92	2.49	50.45
100	41.65	39.58	41.12	-	40.874	-	40.81	0.88	2.15	24.64
10	-	30.69	-	-	-	-	30.69	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2 肠道病毒 EV71（回收率 31.79%~43.21%）；检出限 1000copies/L；见表 5。

表 5 肠道病毒 EV71 检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	平均回收率 (%)	
1000000	31.84	32.31	531.34	532.35	131.54	632.14	5	31.92	0.42	1.31	37.89
100000	34.28	534.86	235.75	134.34	733.21	435.25	6	34.62	0.88	2.55	43.31
10000	37.15	537.62	837.41	638.31	536.61	537.23	1	37.39	0.56	1.51	31.79
1000	39.21	240.25	839.35	841.14	639.91	740.10	3	40.00	0.70	1.74	33.43
100	41.51	3	42.62	4	-	-	-	42.07	0.79	0.02	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3 轮状病毒（回收率 21.37%~39.38%）；检出限为 100copies/L；见表 6。

表 6 轮状病毒检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准差	变异系 数(%)	平均回 收率(%)
1000000	28.02	29.35	29.81	30.16	32.12	30.57	30.01	1.36	4.53	39.38
100000	31.75	31.87	32.02	33.78	34.61	33.79	32.97	1.23	3.74	21.37
10000	34.86	33.55	33.19	35.34	37.12	37.1	35.19	1.68	4.79	38.73
1000	36.37	36.16	36.06	38.61	40.25	39.07	37.75	1.79	4.74	35.73
100	39.12	39.27	40.55	41.25	-	-	40.05	1.03	2.56	24.74
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4 星状病毒（回收率 38.07%~66.26%）；检出限在 10copies/L；见表 7。

表 7 星状病毒检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准差	变异系 数(%)	平均回 收率(%)
1000000	23.57	22.78	27.37	26.97	24.14	26.92	25.29	2.02	7.98	66.26
100000	27.75	26.56	30.74	29.51	28.28	29.66	28.75	1.51	5.25	38.50
10000	30.24	29.23	33.14	33.6	32.87	32.77	31.98	1.79	5.59	46.70
1000	33.18	32.65	37.37	36.81	36.73	36.29	35.51	2.04	5.75	40.63
100	35.13	36.67	41.88	38.15	39.32	38.02	38.20	2.31	6.04	55.37
10	40.23	39.78	-	41.31	-	41.67	40.75	0.89	2.18	38.07

5 腺病毒（回收率 30.01%~63.94%）；检出限 10copies/L；见表 8。

表 8 腺病毒检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准差	变异系 数(%)	平均回 收率(%)
1000000	23.72	24.68	23.46	25.31	23.66	24.48	24.22	0.72	2.98	63.94
100000	26.39	28.08	27.89	29.46	28.47	28.18	28.08	1.00	3.55	43.11

10000	29.17	31.99	32.41	33.11	34.16	32.77	32.27	1.69	5.23	34.76
1000	32.81	34.55	35.46	37.46	37.33	34.72	35.39	1.78	5.03	30.51
100	36.51	36.55	37.88	39.67	40.02	38.32	38.16	1.49	3.91	32.31
10	39.67	41.83	40.1	42.42	-	42.62	41.33	1.36	3.28	30.01

6 新冠病毒（回收率 14.62%~19.41%）；检出限 1000copies/L；见表 9。

表 9 新冠病毒检测情况

	加 标 浓 度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均 值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	平均回收 率(%)
ORF1ab 基因	1000000	28.521	28.114	29.982	30.252	29.08	28.182	29.02	0.92	3.17	17.66
	100000	31.876	31.045	32.45	34.159	34.175	34.628	33.06	1.47	4.43	17.95
	10000	34.99	34.594	36.07	37.703	37.416	38.681	36.58	1.62	4.43	19.29
	1000	38.373	39.901	40.731	39.429	41.31	41.938	40.28	1.31	3.24	14.91
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N 基因	1000000	27.281	28.581	27.08	28.675	29.45	27.463	28.09	0.95	3.38	19.41
	100000	30.803	31.358	31.175	30.175	33.07	30.956	31.26	0.98	3.13	18.19
	10000	35.132	36.946	34.416	33.73	36.731	33.231	35.03	1.54	4.40	14.62
	1000	38.242	39.458	37.12	36.206	39.654	37.152	37.97	1.39	3.65	15.41
	100	42.381	-	41.71	39.099	-	-	41.06	1.73	4.22	18.51
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7 札如病毒（回收率 28.07%~45.61%）；检出限 1000copies/L；见表 10。

表 10 札如病毒检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准差	变异系 数(%)	平均回 收率(%)
1000000	29.53	29.78	28.69	29.75	29.45	30.5	29.62	0.59	1.98	45.61
100000	32.02	32.86	32.33	32.51	33.68	33.83	32.87	0.74	2.24	33.63
10000	36.31	35.56	35.22	35.26	36.81	36.15	35.89	0.64	1.78	28.07
1000	39.23	37.37	38.11	37.39	40.52	41.67	39.05	1.76	4.51	35.95
100	-	41.04	-	40.57	-	-	40.81	0.33	0.81	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8 呼吸道合胞病毒（回收率 40.34%~52.97%）；检出限 100 copies/L；

见表 11。

表 11 札如病毒检测情况

加标浓度 (copies/L)	1	2	3	4	5	6	平均值 (CT)	标准差	变异系 数(%)	平均回 收率(%)
1000000	28.67	27.61	25.97	26.25	28.49	28.05	27.51	1.15	4.17	52.97
100000	31.07	32.19	29.66	30.78	32.61	31.37	31.28	1.05	3.36	47.77

10000	34.13	36.16	33.76	35.06	36.88	34.95	35.16	1.19	3.37	42.86
1000	39.31	40.3	39.06	39.23	37.24	38.21	38.89	1.05	2.70	40.34
100	-	-	42.81	-	41.04	42.69	42.18	0.99	2.34	48.70
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

9 污水中病毒的富集浓缩，见表 12、表 13。

表 12 不同地区污水中病毒浓缩和富集效果

地点	检测情况	诺如 GI	诺如 GII	星状病毒	轮状病毒	札如病毒
虎丘区	阳性数	22	16	16	2	14
	总样本数	51	51	51	51	51
	检出率(%)	43.14	31.37	31.37	3.92	27.45
吴中区	阳性数	13	12	12	1	11
	总样本数	21	21	21	21	21
	检出率(%)	61.90	57.14	57.14	4.76	52.38
相城区	阳性数	9	9	9	0	7
	总样本数	9	9	9	9	9
	检出率(%)	100.00	100.00	100.00	0.00	77.78
工业园区	阳性数	7	7	7	0	6
	总样本数	7	7	7	7	7
	检出率(%)	100.00	100.00	100.00	0.00	85.71

表 13 不同月份污水中病毒浓缩和富集效果

月份	检测情况	腺病毒	诺如 GI	诺如 GII	星状病毒	轮状病毒	札如病毒	肠道病毒	新冠病毒
四月	阳性数	43	7	0	0	0	0	/	/
	总样本数	44	44	44	44	44	44	/	/
	检出率(%)	97.73%	15.91%	0%	0%	0%	0%	/	/
五月	阳性数	/	46	46	46	1	41	46	/
	总样本数	/	46	46	46	46	46	46	/
	检出率(%)	/	100.0%	100.0%	100.0%	2.17%	89.13%	100.0%	/
八月	阳性数	16	0	0	0	0	0	/	10
	总样本数	16	16	16	16	16	16	/	16
	检出率(%)	100.0%	0%	0%	0%	0%	0%	/	62.5%

### （三）实验论证结论

过优化膜吸附-超滤法对水体中病毒进行富集浓缩，并对多种常见介水传播病毒的富集效果进行了全面评估，详见表 11、表 12。结果显示，本方法对新冠病毒的平均回收率为 14.62%~19.41%，肠道病毒 EV71 的平均回收率为 31.79%~43.21%，札如病毒的平均回收率为

28.07%~45.61%。此外，本方法对星状病毒的平均回收率为 38.07%~66.26%，腺病毒的平均回收率为 30.01%~63.94%，轮状病毒的平均回收率为 21.37%~39.38%，柯萨奇病毒 CA6 的平均回收率为 24.64%~50.45%。在检出限方面，星状病毒和腺病毒可低至 10copies/L，轮状病毒和柯萨奇病毒 CA6 为 100copies/L，而新冠病毒、肠道病毒 EV71 和札如病毒则为 1000copies/L。数据有力地证明本方法对包括 RNA 和 DNA 病毒在内的多种常见食源性病毒以及新冠病毒均具有良好的富集效果和较低的检出能力。

在实际应用方面，本方法对污水样本的检测结果进一步验证了其在复杂环境水体中的适用性。在虎丘区、吴中区、相城区和工业园区等不同区域的污水样本中，诺如病毒 G.I 型、诺如病毒 G.II 型和星状病毒均被成功检出，检出率从 31.37%~100.00%。按月统计数据也显示，腺病毒、诺如病毒 GI 型和诺如病毒 GII 型在 4 月、5 月和 8 月的污水样本中普遍具有较高的检出率，部分月份甚至达到 100.00%。这些实际环境水体的检测结果表明，本方法能够有效应对水体基质的复杂性，成功富集并检测其中的病毒，具备良好的环境适应性和实际应用价值。

#### （四）室间验证

方法验证阶段，由 6 个第三方实验室完成。分为两个阶段。第一阶段是对方法灵敏度和重复性的验证。使用 1000 copies/ $\mu$ L 的阳性病毒作为储备液，分别稀释 10 倍和 1000 倍进行加标，使纯净水样品中病毒浓度达到  $10^5$  copies/L 和  $10^3$  copies/L 进行富集和检测。分别验证 GII 型诺如病毒、札如病毒、星状病毒、轮状病毒、人呼吸道合胞病毒的回收率。



诺如病毒平均回收率 36.89 %，札如病毒平均回收率 29.07 % ，星状病毒平均回收率 41.94 %，轮状病毒平均回收率 29.01% ，人呼吸道合胞病毒平均回收率 42.23% ，变异系数均< 10%，当纯净水中目标病毒浓度高于 1000 copies/μL，方法的准确率为 94.7 %。详见表 14～表 18。

第二阶段是对方法的实际检测能力和准确性进行验证。使用自然水体 500 mL，加入阳性病毒，使 500 mL 环境水中病毒终浓度达到 10<sup>4</sup>copies/L，分别验证 G II 型诺如病毒、札如病毒、星状病毒、轮状病毒、人呼吸道合胞病毒的检出率，并使用过程控制病毒进行质量控制。过程控制病毒 MS2 平均 CT 值为 23.99，平均回收率为 30.38 %，变异系数为 7.34 %。当自然水体中病毒浓度达到 10<sup>4</sup> copies/L 时，富集浓缩实验准确性为 95.56 %；详见表 19。使用已知浓度（10<sup>5</sup>copies/uL）的 G I 型诺如病毒（2 份）、G II 型诺如病毒（2 份）、札如病毒（2 份）、星状病毒（2 份）、轮状病毒（2 份）做为阳性对照，使用大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 做为阴性对照，使用 PR-qPCR 方法进行检测，验证常见腹泻病毒（诺如病毒、札如病毒、星状病毒、轮状病毒）的特异性引物、探针的灵敏度和准确性；详见表 20。

表 14 室间方法验证对诺如病毒富集和检测灵敏度和重复性结果

加标浓度 (copies/L)	实验室 1	实验室 4	实验室 5	实验室 6	平均值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	回收率 (%)
100000	26.65	26.52	27.33	26.82	26.83	0.36	1.32	40.28
100000	27.82	25.17	30.82	29.15	28.24	2.39	8.45	39.66
1000	35.66	32.06	33.11	34.39	33.81	1.56	4.62	39.93
1000	34.35	35.4	32.32	35.44	34.38	1.46	4.25	27.69

表 15 室间方法验证对札如病毒富集和检测灵敏度和重复性结果

加标浓度 (copies/L)	实验室 2	实验室 4	实验室 5	实验室 6	平均值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	回收率 (%)
--------------------	----------	----------	----------	----------	-------------	---------	-------------	------------

100000	33.28	35.1	33.09	36.82	34.57	1.75	5.06	27.56
100000	35.55	36.68	35.99	32.56	35.20	1.82	5.16	22.87
1000	42.41	38.55	42.87	--	41.28	2.37	5.75	54.03
1000	43.09	41.71	--	42.68	42.49	0.71	1.67	11.81

表 16 室内方法验证对星状病毒富集和检测灵敏度和重复性结果

加标浓度 (copies/L)	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6	平均值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	回收率 (%)
100000	29.62	27.55	28.27	25.91	27.84	1.55	5.55	52.64
100000	27.89	28.21	29.48	26.18	27.94	1.36	4.87	44.96
1000	33.16	33.99	36.41	35.51	34.77	1.46	4.21	33.74
1000	36.8	32.77	34.05	37.22	35.21	2.15	6.11	36.43

表 17 室间方法验证对轮状病毒富集和检测灵敏度和重复性结果

加 标 浓 度 (copies/L)	实验室 3	实验室 4	实验室 5	实验室 6	平均值 (CT)	标准 差	变异系数 (%)	回收率 (%)
100000	33.31	36.55	33.68	32.161	33.93	1.87	5.50	30.41
100000	32.79	33.89	34.28	35.05	34.00	0.94	2.77	21.09
1000	38.21	38.86	39.85	40.04	39.24	0.86	2.19	45.04
1000	41.02	40.15	42.16	39.11	40.61	1.30	3.19	19.51

表 18 室间方法验证对人呼吸道合胞病毒富集和检测灵敏度和重复性结果

加 标 浓 度 (copies/L)	实验室 4	实验室 5	实验室 6	平均值 (CT)	标准差	变异系数 (%)	回收率 (%)
100000	29.53	31.9	32.21	31.21	1.47	4.70	56.05
100000	31.33	30.92	30.64	30.96	0.35	1.12	49.20
1000	39.88	42.26	37.86	40.00	2.20	5.51	28.62
1000	38.15	40.73	38.55	39.14	1.39	3.55	35.06

表 19 室间方法验证对不同病毒富集和检测准确性结果

	诺如病毒	MS2 病毒	回收率(%)	札如病毒	MS2 病毒	回收率(%)	星状病毒	MS2 病毒	回收率(%)	轮状病毒	MS2 病毒	回收率(%)	人呼 吸道 合胞 病毒	MS2 病毒	回收率(%)
实验室 4	36.29	24.65	12.31	36.93	22.21	58.60	37.19	28.01	1.44	35.92	25.08	9.35	38.87	21.71	80.68
	35.54	22.63	44.80	37.02	22.47	49.62	--	25.51	7.10	36.37	23.29	29.37	35.90	23.73	22.17
	33.62	25.02	9.71	37.02	23.56	24.71	36.91	22.81	39.92	37.12	23.56	24.71	34.09	21.45	95.27
实验室 5	33.62	23.32	28.81	37.28	25.16	8.88	35.26	25.08	9.35	37.22	24.01	18.53	34.77	28.57	1.00
	33.68	24.20	16.41	37.37	22.40	51.89	36.72	21.45	95.27	36.35	21.56	88.80	39.23	24.45	13.99
	33.81	25.03	9.65	37.49	22.81	39.92	35.33	24.11	17.38	38.91	22.31	54.97	34.81	27.75	1.69
实验室	35.31	23.46	26.34	38.71	26.27	4.37	32.66	21.84	74.24	36.44	23.29	29.37	35.13	23.13	32.54

6	35.85	24.60	12.71	--	21.69	81.72	37.14	26.29	4.31	35.09	25.26	8.33	38.69	22.12	62.07
	36.14	24.82	11.04	38.19	24.29	15.49	35.54	24.65	12.31	39.70	23.43	26.86	35.18	26.51	3.75
MS2 标准曲线	原液	10×稀释	10 <sup>2</sup> ×稀释	10 <sup>3</sup> ×稀释	10 <sup>4</sup> ×稀释	10 <sup>5</sup> ×稀释						斜率		截距	
Ct 值 (实验 均值)	17.61	20.99	24.05	28.05	31.71	35.54						-0.28		10.81	
MS2 病毒	CT 值		标准差		变异系数(%)							回收率(%)			
	23.99		1.76		7.34							30.48			

表 20 不同病毒 RT-qPCR 引物、探针灵敏度和准确性情况

实验室 1					
浓度(copies/L)	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10	1
诺如病毒 I 型(1#)	16.49	19.63	23.37	26.66	30.92
	16.5	20.04	23.72	27.16	30.93
诺如病毒 I 型(2#)	16.36	20.15	23.61	27.17	30.73
	16.59	19.98	23.56	27.27	30.96
诺如病毒 II 型(1#)	17.55	21.32	24.69	27.24	31.84
	17.9	20.64	24.2	27.93	31.44
诺如病毒 II 型(2#)	17.96	21.32	24.49	28.17	31.26
	18	21.1	24.61	27.55	31.45
札如病毒(1#)	18.64	22	25.08	28.56	32.08
	18.35	21.91	25.15	28.45	31.79
札如病毒(2#)	20.73	23.96	27.11	30.02	33.72
	20.74	23.99	27.01	30.36	33.8
星状病毒(1#)	22.85	25.84	28.54	32.06	35.61
	22.61	26.03	28.75	32.13	35.47
星状病毒(2#)	22.4	25.71	28.87	32.34	35.05
	22.49	25.83	29.06	32.31	35.61
轮状病毒(1#)	28.03	31.36	34.51	37.5	-
	28.08	31.53	34.74	38.46	41.1
轮状病毒(2#)	27.94	31.07	34.54	38.17	-
	27.97	31.14	33.81	38.73	-
实验室 2					
浓度(copies/L)	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10	1
诺如病毒 I 型(1#)	19.01	20.26	25.85	29.51	32.07
	19.45	20.11	25.74	28.84	33.5
诺如病毒 I 型(2#)	18.79	19.26	24.12	29.26	32.93
	19.4	17.99	25.92	29.28	32.92
诺如病毒 II 型(1#)	20.12	23.09	26.8	30.71	34.19
	20.46	23.17	26.49	30.5	34.24
诺如病毒 II 型(2#)	19.82	19.26	26.21	30.15	33.12

	20.74	18.17	26.48	30.1	33.68
札如病毒(1#)	20.55	23.89	26.93	30.69	35.13
	20.76	23.79	27.07	30.52	36.01
札如病毒(2#)	20.55	27.54	27.67	34.62	38.86
	21.23	27.37	27.53	34.63	36.72
星状病毒(1#)	23.88	27.54	30.61	34.62	38.88
	23.94	27.37	30.72	34.63	40
星状病毒(2#)	23.31	26.7	30.52	35.37	38.14
	23.44	26.69	30.44	35.98	36.47
轮状病毒(1#)	27.55	32.52	34.55	32.66	35.66
	30.89	32.43	34.09	33.48	34.93
轮状病毒(2#)	27.84	31.25	33.43	31.92	33.97
	28.29	30.8	33.77	32.19	34.04
实验室 3					
浓度(copies/L)	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10	1
诺如病毒I型(1#)	20.12	23.79	28.3	32.06	35.09
	20.3	24.2	27.92	31.79	36.97
诺如病毒I型(2#)	20.49	24.91	28.33	31.41	34.42
	20.14	23.74	27.69	31.67	34.48
诺如病毒II型(1#)	20.52	23.85	28.12	32.06	35.72
	20.49	24.24	27.94	31.77	37.18
诺如病毒II型(2#)	20.75	24.52	27.81	30.13	34.75
	20.24	23.72	27.42	31.51	34.97
札如病毒(1#)	18.52	21.76	25.15	28.9	33.17
	18.58	21.71	25.25	29.23	33.38
札如病毒(2#)	20.79	24.45	27.36	32.56	36.11
	21.89	24.48	27.61	32.24	36.21
星状病毒(1#)	23.44	26.92	30.16	33.86	-
	23.55	26.96	30.12	33.68	42.41
星状病毒(2#)	23.21	26.62	30.05	34.38	36.87
	23.11	26.47	29.86	34.63	-
轮状病毒(1#)	27.25	30.29	33.83	38.26	-
	27.39	30.41	33.53	38.5	-
轮状病毒(2#)	26.48	30.14	33.82	39.05	-
	27.1	30.46	33.24	40.62	-

## 六、重大分歧意见的处理过程和依据

无重大意见分歧，各实验室在使用本标准时，可根据各实验室要求，满足本方法的条件即可。

## 七、与相关法律法规和国家标准的关系

本标准在制定过程中，已充分考量我国国家法律法规的相关要求。标准引言部分明确指出，其起草遵循了 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。这表明标准在结构、格式和基本起草规范上与国家标准化体系保持一致。其次，本标准适用于地表水、地下水、集中式供水、娱乐用水、污水、饮用水、包装水等各类水体中病毒的富集和浓缩，这一范围设定与中国现行的水环境质量标准、饮用水卫生标准以及污水排放标准等法律法规的管理范畴相符，旨在为相关水体的病毒监测提供技术支撑，进而服务于公共卫生安全管理。此外，标准中提及的实时荧光逆转录-聚合酶链式反应（RT-qPCR）方法，以及对病毒富集、浓缩、核酸提取纯化和质量控制的详细规定，均符合当前我国在环境检测和传染病防控领域对检测方法科学性、准确性和可靠性的要求。标准中涵盖的质量控制体系，包括过程控制对照、扩增控制以及阴阳性对照等，体现了对检测结果质量的严格把控，这与国家对实验室检测质量控制的普遍要求相符。同时，考虑到标准涉及病毒检测，在试剂和耗材的使用、废弃物处理等方面，应严格遵守国家关于生物安全和实验室管理的相关法规，确保操作安全和环境友好。

本标准参考了 GB4789.42-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》质量控制方法中过程控制病毒的制备方法，该标准不涉及水中病毒的富集和浓缩方法。国内外有针对特定水体中特定病毒的检测标准，如 WS/T 799-2022《污水中新型冠状病毒富集浓缩与核酸

检测方法》、DB45/T 2138-2020《广西壮族自治区地方标准 水体中诺如病毒的核酸检测方法 实时荧光 RT-PCR 法》、ISO 标准: Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection (ISO 15216-2:2019)、加拿大卫生部标准: Concentration of Hepatitis A Virus and Rotavirus in Spring or Mineral Bottled Water Samples and Their Detection by the Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction (Canada/OPFLP04) 等,但这些标准中均没有规定针对不同水体的区别性的前处理方法。本标准专注于规定针对多种水体的特质,区别化开展病毒富集和浓缩的方法。本标准使用预过滤和两次富集过程,经实验论证,富集效率高于上述标准规定的方法,且更易于实验室操作。

## 八、推广实施建议

本文件适用于水源水、生活饮用水、娱乐景观用水、污水等水样中噬菌体病毒、诺如病毒、柯萨奇病毒、轮状病毒、肠道病毒、星状病毒、腺病毒、新冠病毒、札如病毒、呼吸道合胞病毒等病毒的富集浓缩。水中病毒监测是当前科学研究和公共卫生实践的热点问题,但是国内尚无水中病毒富集和浓缩的通用标准,限制了水中病毒监测的有效开展。该标准的建立,可以为公共卫生实践提供标准化的方法,使实验室间检测结果更具可比性,可指导各级各类实验室,尤其是基层实验室,提高水中病毒富集和浓缩能力。本标准核心技术方法为膜吸附-超滤法,经优化验证,对轮状病毒、诺如病毒、星状病毒、腺病毒、肠道病毒 EV71、札如病毒、柯萨奇病毒 CA6,以及新冠病毒等多种常见肠道病毒及其他介

水传播病毒均具有良好的富集效果和较低的检出限，因此在病毒监测领域具备广泛的适用性。在实际操作中，需注意水体浊度对预处理的影响：对于浊度较低（ $\leq 1$  NTU）的水样可直接进行膜吸附，而浊度较高（ $> 1$  NTU）的水样则必须进行预过滤，以确保病毒能有效吸附于滤膜表面。需严格遵循标准中的质量控制体系，包括过程控制病毒、扩增控制以及阴阳性对照的设置，以确保整个富集、浓缩及核酸检测流程的准确性和重复性。在核酸提取纯化过程中，建议严格按照操作规范，或选用符合要求的商品化试剂盒，以保证核酸的完整性和纯度，避免对后续 RT-qPCR 检测造成抑制。

建议标准归口单位和组织实施单位积极开展标准贯彻的指引工作，组织专门的培训班，确保各相关单位能准确理解和应用本标准。邀请专家讲解水中病毒的富集浓缩方法的具体内容，提高检测人员的重视程度。为扩大标准的影响力，应通过行业内部渠道以及对外信息平台进行广泛宣传，激发相关单位参与培训的积极性，并结合自身实际情况，深入学习和实践本标准。

### 九、起草单位和起草人员信息及分工

本标准起草单位为江苏省疾病预防控制中心（江苏省预防医学科学院）、无锡市疾病预防控制中心、江苏省农业科学院。

主要起草人：霍翔、倪云龙、乔昕、冯微宏、谢雅晶、管红霞、周连、田亭、沈赞、曹会。具体信息及分工见表 21。

表 21 项目人员情况表

序号	姓名	单位名称	职务/职称	项目分工
----	----	------	-------	------

1	霍翔	江苏省疾病预防控制中心	中心副主任/主任医师	标准制定与审核
2	倪云龙	江苏省疾病预防控制中心	副主任技师	标准撰写、实验验证
3	乔昕	江苏省疾病预防控制中心	副所长/主任技师	实验验证、标准审核
4	冯微宏	无锡市疾病预防控制中心	副研究员	实验验证
5	谢雅晶	江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所	副研究员	实验验证、标准论证
6	管红霞	无锡市疾病预防控制中心	副科长/副主任技师	实验验证
7	周连	江苏省疾病预防控制中心	中心副主任/主任医师	标准审核
8	田亭	江苏省疾病预防控制中心	主管医师	数据处理
9	沈赞	江苏省疾病预防控制中心	主任技师	实验验证
10	曹会	江苏省疾病预防控制中心	主管技师	实验验证