

报告编号: XDJ-2024-007

试验报告

委托单位: 山东能洁动保科技有限公司

检测单位: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

国家非洲猪瘟专业实验室

联系电话: 0451-51051781

二零二四年十一月

声 明

1. 本报告仅对送检的样品在试验内容中的结果负责。
2. 本报告涂改、增删无效，未加盖单位印章无效。
3. 本报告和本机构的名称不得用于产品标签、广告、商业宣传和评优等。
4. 如对本报告有异议，请于收到报告之日起十五个工作日内以书面形式向本机构提出异议。
5. 如有违背声明操作，将追究法律责任。

联系地址：哈尔滨市香坊区哈平路 678 号

邮政编码：150069

联系电话：0451-51051781

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

国家非洲猪瘟专业实验室

低温下能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂灭杀非瘟病毒效果评价

本实验室对山东能洁动保科技有限公司委托检验能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂在低温条件下进行了体外灭活非洲猪瘟病毒 (ASFV) 的试验, 现将试验结果报告如下:

1. 材料与方法

1.1 非洲猪瘟病毒

以高致病性非洲猪瘟病毒 Pig/HLJ/2018 株为骨架, 构建携带 GFP 标签感染性克隆病毒株由本实验室鉴定和保存。

1.2 猪原代肺泡巨噬细胞 (PAMs)

猪原代肺泡巨噬细胞分离于 30-40 天 SPF 猪, SPF 猪来源于哈尔滨兽医研究所试验动物基地, PAMs 用含 10%胎牛血清 1640 培养基于 5%CO₂ 中 37℃ 进行培养。

1.3 中和剂的配制

按照 0.5%胰蛋白胨、0.25%酵母提取物、1%D-葡萄糖、0.1%巯基乙酸钠、0.6%硫代硫酸钠、0.25%亚硫酸氢钠、0.7%卵磷脂、0.5%吐温 80 的成份, 使用 PBS 溶液配制, 完全溶解高压后备用。

1.4 消毒剂对细胞的毒性试验

能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂均匀喷粉在平皿中纸片上, 25℃作用 15 分钟后, 用镊子夹起纸片, 尽量将纸片上固体消毒剂抖落, 将纸片加入细胞维持液中浸泡 10 分钟, 然后旋涡震荡 15s, 8000rpm 离心 3min, 将上清接种到 PAMs 细胞上, 37℃ 5% CO₂ 温箱中培养 96 小时, 每 24 小时观察细胞状态, 确定消毒剂对细胞毒性。

1.5 消毒剂对病毒杀灭试验

每个滤纸片加入 1×10^6 copies/ml 浓度 ASFV, 其中 1 片接毒纸片直接加入细胞维持液中作为阳性对照, 同时设未加毒的作为阴性对照, 其余已加病毒纸片在距离 2-3cm 均匀喷粉能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂, 4℃、-4℃和 -18℃、分别作用 5 分钟、10 分钟、15 分钟和 30 分钟后, 将所有纸片放入中和液中浸泡 10 分钟, 再放入细胞维持液中浸泡 10 分钟, 然后旋涡震荡 15 秒, 8000rpm 离心 3min, 取上清加入已长满单层 PAMs 细胞培养板中, 每个浓度复 4 孔, 37℃5%CO₂ 温箱中培养, 每 24 小时观察细胞状态及病毒复制产生荧光情况, 观察 96 小时后统计试验结果。

在阳性对照组, 孔内细胞荧光阳性率 90%以上, 阴性对照组孔内无荧光信号成立前提条件下, 若实验组孔内无荧光信号证明病毒被消毒剂完全灭活; 若实验组孔内有明显荧光信号证明病毒未被消毒剂完全灭活。

1.6 消毒剂对病毒核酸降解效果试验

每个滤纸片加入 1×10^6 copies/ml 浓度 ASFV，其中 1 片接毒纸片直接加入细胞维持液中作为阳性对照，同时设未加毒的作为阴性对照，其余已加病毒纸片在距离 2-3cm 均匀喷粉能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂，共计三个实验组，25℃ 分别作用 1 小时、2 小时、3 小时和 4 小时后，将所有纸片放入中和液中浸泡 10 分钟，然后旋涡震荡 15 秒，8000rpm 离心 3min，取上清提取病毒核酸，按 WOA 方法实时荧光定量 PCR 检测 ASFV。

2. 结果

2.1 消毒剂对 PAMs 细胞的毒性试验

能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂按实验方案 1.4 操作，结果对 PAMs 细胞无毒性。



图 1 实验组

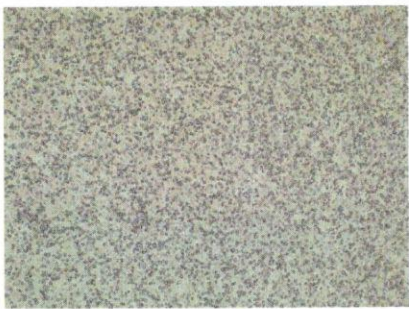


图 2 阴性对照组

2.2 消毒剂对非洲猪瘟病毒杀灭作用

将消毒剂参考使用说明书、细胞毒性试验及具体试验方案，消毒剂采用三种作用温度和四种作用时间，进行对非洲猪瘟病毒灭活效果检测。结果判定标准为实验组无明显荧光信号，证明非洲猪瘟病毒被消毒剂完全灭活。结果见表 1 至表 3。

表 1.在 4℃ 条件下消毒剂喷粉方式与 ASFV 作用后荧光观察结果

消毒剂名称	作用时间			
	5 分钟	10 分钟	15 分钟	30 分钟
能安 pH2.8 牌酸性固体 消毒剂	有	无	无	无

表 2.在 -4℃ 条件下消毒剂喷粉方式与 ASFV 作用后荧光观察结果

消毒剂名称	作用时间			
	5 分钟	10 分钟	15 分钟	30 分钟
能安 pH2.8 牌酸性固体 消毒剂	有	有	无	无

表 3.在-18℃条件下消毒剂喷粉方式与 ASFV 作用后荧光观察结果

消毒剂名称	作用时间			
能安 pH2.8 牌酸性固体	5 分钟	10 分钟	15 分钟	30 分钟
消毒剂	有	有	无	无

2.3 消毒剂对病毒核酸降解结果

将消毒剂在 25℃条件下采用喷粉方式，分别作用 1-4 小时后回收病毒，用 qPCR 方法检测病毒载量，CT 值大于 40 判定为消毒剂将病毒核酸完全降解。结果见表 4。

表 4.在 25℃条件下消毒剂喷粉方式与 ASFV 作用后病毒核酸检测结果

消毒剂名称	作用时间/CT 值				
能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂	组别	1 小时	2 小时	3 小时	4 小时
	1	34.535	35.560	——	——
	2	35.949	36.058	38.582	——
	3	37.684	——	——	——
	阳性	28.040	29.044	30.370	30.821

注：CT 大于 40 表示为——。

3.结论

在 4℃作用条件下，能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂采用喷粉方式，作用 10 分钟能完全灭活非洲猪瘟病毒。

在-4℃作用条件下，能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂采用喷粉方式，作用 15 分钟能完全灭活非洲猪瘟病毒。

在-18℃作用条件下，能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂采用喷粉方式，作用 15 分钟能完全灭活非洲猪瘟病毒。

在 25℃作用条件下，能安 pH2.8 牌酸性固体消毒剂采用喷粉方式，作用 4 小时能完全降解非洲猪瘟病毒核酸。

本次试验结果仅对送检样品负责。

以下空白。

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
国家非洲猪瘟专业实验室
2024 年 11 月 22 日

检验人: 姜成刚

复核人: 姜成刚

批准人: 姜成刚