

报告编号: XF-2022005

测试报告

委托单位: 山东能洁动保科技有限公司

样品名称: 能安 pH2.8 酸性固体消毒剂

测试项目: 能安 pH2.8 酸性固体消毒剂细胞
水平杀灭猪流行性腹泻病毒效果检测

测试时间: 2022 年 11 月至 2022 年 12 月

测试单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所

2022 年 12 月 26 日

测试报告

样品名称	能安 pH2.8 酸性固体消毒剂	样品受理编号	XF-2022005
样品规格	5 公斤/桶	样品数量	1 袋
委托单位	山东能洁动保科技有限公司	样品状态	粉末
测试项目	能安 pH2.8 酸性固体消毒剂细胞水平杀灭猪流行性腹泻病毒效果检测	送检日期	2022 年 11 月 19 号
测试结果	送检样品一定比例稀释后，与猪流行性腹泻病毒等体积混合，在细胞测试水平，能安（pH2.8 酸性固体消毒剂）在 1:20 及以内比例稀释后，与猪流行性腹泻病毒作用 10min 及以上时间时可完全杀灭病毒。 （此栏以下无正文）		
检验人	张莉萍	日期	2022年12月26日
审核人	191214	日期	2022年12月26日
签发人	郭峰	日期	2022年12月26日
备注	试验报告见附件		
测试单位	中国农业科学院兰州兽医研究所		



附件

能安 pH2.8 酸性固体消毒剂

细胞水平杀灭猪流行性腹泻病毒效果试验报告

参照《消毒技术规范》(2002 版)、《兽医消毒剂鉴定技术规范》(1992 版)、《欧洲兽用消毒剂杀灭病毒效力检测标准》(EN14675) 等方法, 本实验室对山东能洁动保科技有限公司送验的能安 pH2.8 酸性固体消毒剂进行细胞水平杀灭猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 定性评价。试验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

测试用细胞: 非洲绿猴肾细胞 (Vero cells)。

猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 毒株: PEDV CH/HNLB/2017 由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室提供, 病毒滴度为 $10^{-6.125}$ TCID₅₀/ml。

样品信息: 能安 (pH2.8 酸性固体消毒剂)

测试耗材: DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 25 cm² 细胞培养瓶; 96 孔细胞培养板; 10 ml 吸管; 200 μ l、1000 μ l 枪尖; 1.5 ml、2 ml Eppendorf 管、离心管等实验耗材均购自 Corning 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 材料准备

配制 pH 7.6 DMEM 培养基 (简称维持液, 未加双抗、血清) 作为样品稀释液及阴性对照。称取 1g 送检样品, 溶于 10ml 维持液中, 充分混匀, 制备成 10 $\times$ 工作液。

1.2.2 送检样品对 Vero 细胞的毒性测定

反应模式: 送检样品+维持液+细胞 $\rightarrow$ 细胞对照组

吸取 10 $\times$ 工作液, 进行 2 倍倍比稀释。按照 10 $\times$ 、20 $\times$ 、40 $\times$ 、80 $\times$ ……10240 $\times$ 的顺序依次加入 96 孔板, 每孔 100 μ l, 每个滴度一列, 重复 8 孔; 同时设一列加入细胞的阴性对照组。每孔再加入 100 μ l 24 h 内长满单层的 Vero 细胞悬液。96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温 CO₂ 培养箱培养, 观察各细胞培养孔中是否出现细

胞毒性，96h 终判结果。

1.2.3 送检样品灭活猪流行性腹泻病毒有效作用浓度的测定

反应模式（1）：不同浓度的送检样品+病毒+细胞→实验组

吸取适量送检样品工作液，用维持液稀释，使终浓度依次为 $10\times$ 、 $20\times$ 及 $30\times$ 。将不同浓度的送检样品分别与等体积 $10^{-6.125}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 的病毒液混匀，作用 10min。每个浓度实验组再用维持液进行 10 倍倍比稀释，按照上清原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} …… 10^{-9} 的顺序依次加入 96 孔板，每孔 100 μl ，每个滴度一列，重复 8 孔，每孔再加入 100 μl 24h 内长满单层的 Vero 细胞悬液。同时设阴性对照和空白对照。96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 恒温 CO_2 培养箱培养，观察各细胞培养孔中是否出现致细胞病变效应（CPE），96h 终判并计算病毒滴度（ TCID_{50} ）。

反应模式（2）：病毒+维持液+细胞→病毒对照组

吸取适量 $10^{-6.125}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 的病毒液，与维持液等体积混合，室温作用 10min，如反应模式（1），用维持液进行 10 倍倍比稀释，按照 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} …… 10^{-9} 的顺序依次加入 96 孔板，每孔 100 μl ，每个滴度一列，重复 8 孔，每孔再加入 100 μl 24h 内长满单层的 Vero 细胞悬液。同时设阴性对照和空白对照。96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 恒温 CO_2 培养箱培养，定期观察各细胞培养孔中是否出现致细胞病变效应（CPE），96h 终判并计算病毒滴度（ TCID_{50} ）。

1.2.4 送检样品灭活猪流行性腹泻病毒有效作用时间的测定

吸取 $20\times$ 送检样品与等体积 $10^{-6.125}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 的病毒液充分混匀，室温下分别作用 5min 和 10min，如 1.2.3 中（1）分别测定病毒滴度。

2 结果

2.1 送检样品对 Vero 细胞毒性的测定

送检样品 $10\times$ 至 $80\times$ 稀释的上清液实验组细胞均致死， $160\times$ 至 $10240\times$ 稀释的上清液实验组细胞正常。阴性对照细胞及空白对照组均正常。

2.2 送检样品灭活猪流行性腹泻病毒效果测定

送检样品 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $30\times$ 依次稀释的混悬液，分别与猪流行性腹泻病毒等体积混匀，作用 10min 时， $10\times$ 与 $20\times$ 上清的病毒全部被杀灭， $30\times$ 上清的病毒滴度从 $10^{-6.125}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 降至 $10^{-3.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ；送检样品 $20\times$ 稀释，作用 5min 时上清的病毒滴度从 $10^{-6.125}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 降至 $10^{-1.75}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。阴性对照细胞及空白对照组均正常。

3 结论

送检样品一定比例稀释后，与猪流行性腹泻病毒等体积混合，在细胞测试水平能安（pH2.8 酸性固体消毒剂）在 1:20 及以内比例稀释后，与猪流行性腹泻病毒作用 10min 及以上时间时可完全杀灭病毒。