

报告编号: XF-2022003

测试报告

委托单位: 山东能洁动保科技有限公司

样品名称: 能灭(过硫酸氢钾复合物粉)

测试项目: 能灭(过硫酸氢钾复合物粉)细胞水平
抗口蹄疫病毒效果检测

测试时间: 2022年05月至2022年07月

测试单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所

2022年7月20日

测试报告

样品名称	能灭（过硫酸氢钾复合物粉）	样品受理编号	XF-2022003
样品规格	500g/袋	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	粉红色粉末
测试项目	能灭（过硫酸氢钾复合物粉）细胞水平抗口蹄疫病毒效果检测	送检日期	2022 年 04 月 06 日
测试结果	送检样品一定比例稀释后，与口蹄疫病毒液等体积混合，在细胞测试水平，能灭(过硫酸氢钾复合物粉)在 1:150 及以内比例稀释后，与口蹄疫病毒作用 10 min 及以上时间时，可完全杀灭口蹄疫病毒。 （此栏以下无正文）		
检验人	吴钟乾 . 侯佳艺	日期	2022.7.20
审核人	王健	日期	2022.7.20
签发人	郭建	日期	2022.7.20
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:

能灭（过硫酸氢钾复合物粉）细胞水平抗口蹄疫病毒试验报告

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）以及《口蹄疫诊断技术》（GB/T18935-2018）等方法，本实验室对山东能洁动保科技有限公司委托检验的能灭（过硫酸氢钾复合物粉）进行细胞水平抗口蹄疫病毒（FMDV）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：乳仓鼠肾细胞（BHK-21）。

口蹄疫病毒毒株：FMDV/O/Mya98/2010 由国家口蹄疫参考实验室提供，病毒滴度为 $10^{-5.8}$ TCID₅₀/50 μ l。

样品信息：能灭（过硫酸氢钾复合物粉）（送检样品）

测试耗材：MEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司；25cm² 细胞培养瓶；96 孔细胞培养板；10ml 吸管；200 μ l、1000 μ l 枪尖；1.5ml Eppendorf 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 MEM 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。称量 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 BHK-21 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

吸取稀释 10 $\times$ 送检样品工作液上清，进行 2 倍梯度稀释。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；同时设一列阴性对照组。每孔加入 100 μ l 24h 内长满单层的 BHK-21 细胞悬液。96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温 CO₂ 培养箱培养，每 24h 观察各细胞培养孔中是否出现细胞毒性，72h 终判结果。

1.2.3 送检样品灭活口蹄疫病毒有效浓度的测定

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, 用维持液进行稀释, 使终浓度依次为 $100\times$ 、 $150\times$ 及 $200\times$ 。将不同浓度的送检样品混悬液分别与等体积 $10^{-5.8}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ 的病毒液混匀, 作用 10min 后, 离心, 吸取上清, 并用维持液进行 10 倍梯度稀释, 按照上清原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} …… 10^{-9} 的顺序依次加入 96 孔板, $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 重复 8 孔, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 24h 内长满单层的 BHK-21 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, 每 24h 观察各细胞培养孔中是否出现致细胞病变效应 (CPE), 72h 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 $10^{-5.8}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ 的病毒液, 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 $100\mu\text{l}$, 每个滴度一列, 重复 8 孔, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 24h 内长满单层的 BHK-21 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, 每 24h 观察各细胞培养孔中是否出现致细胞病变效应 (CPE), 72h 终判并计算病毒滴度 (TCID_{50})。

1.2.4 送检样品灭活口蹄疫病毒有效作用时间的测定

吸取 $150\times$ 送检样品混悬液与等体积 $10^{-5.8}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ 的病毒液充分混匀, 室温下分别作用 5min 和 10min, 离心, 吸取上清, 如 1.2.3 中 (1) 分别测定病毒滴度。

2 结果

2.1 送检样品对 BHK-21 细胞毒性测定结果

送检样品 $3200\times$ ~ $10240\times$ 稀释的上清液实验组细胞正常, $10\times$ ~ $1600\times$ 稀释的上清液实验组细胞均致死。阴性对照细胞及空白对照组均正常。

2.2 送检样品灭活口蹄疫病毒效果测定

送检样品 $100\times$ 、 $150\times$ 、 $200\times$ 依次稀释的混悬液, 分别与口蹄疫病毒等体积混匀, 作用 10min 时, $100\times$ 与 $150\times$ 上清的病毒全部被杀灭, $200\times$ 上清病毒滴度从 $10^{-5.8}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ 降至 $10^{-2.2}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$; 送检样品 $150\times$ 稀释, 作用 5min 时, 上清的病毒滴度从 $10^{-5.8}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ 降至 $10^{-1.5}\text{TCID}_{50}/50\mu\text{l}$ 。阴性对照细胞和空白对照组均正常。

3 结论

送检样品一定比例稀释后，与口蹄疫病毒液等体积混合，在细胞测试水平，能灭(过硫酸氢钾复合物粉)在 1:150 及以内比例稀释后，与口蹄疫病毒作用 10 min 及以上时间时，可完全杀灭口蹄疫病毒。