

# T/FDSA

团 体 标 准

T/FDSA 006—2019

---

## 消毒剂灭活腺病毒效果的测试方法

Test method for the adenovirus inactivated by chemical  
disinfectants and antiseptics

2019-7-10 发布

2019-8-10 实施

---

中国食品药品企业质量安全促进会

发布

## 目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 试剂与仪器.....	1
5 病毒悬液的制备.....	2
6 病毒灭活试验.....	4
7 注意事项.....	6

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国食品药品企业质量安全促进会标准化专业委员会提出并归口。

本标准起草单位：中关村国际医药检验认证科技有限公司、中国人民解放军疾病预防控制中心、重庆两江创享医药检验认证科技有限公司、重庆市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：李杰、苏裕心、张廷芬、帖金凤、于海玲、李海帅、王芳、刘南、刘治平。

# 消毒剂灭活腺病毒效果的测试方法

## 1 范围

本标准规定了消毒剂灭活腺病毒效果的试剂与仪器、病毒悬液的制备、病毒灭活试验及消毒效果评价、注意事项。

本标准适用于各种消毒剂对腺病毒的灭活效果评价。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

GB15981 消毒与灭菌效果的评价方法与标准

中华人民共和国卫生部 消毒技术规范 2002年版

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1 致细胞病变效应 cytopathic effect, CPE

指病毒在宿主细胞内大量增殖，导致细胞病变甚至死亡的现象。

### 3.2 半数细胞感染剂量 50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>

以使50%的试验培养细胞出现感染反应的病毒稀释液的稀释度倒数的对数值。

## 4 试剂与仪器

### 4.1 指示病毒

人腺病毒5型（Ad 5, ATCC VR-5）。

### 4.2 宿主细胞

A549细胞（ATCC CCL-185）或 HeLa细胞（ATCC CCL-2）。

### 4.3 培养基及试剂

4.3.1 DMEM 培养基。

4.3.2 胎牛血清。

4.3.3 0.25%胰蛋白酶。

4.3.4 磷酸盐缓冲液（PBS），0.03mol/L，pH7.2±0.2。

4.3.5 有机干扰物：30g/L 或者 3g/L 牛血清白蛋白（BSA）。

4.3.6 细胞冻存液：含 20% (V/V) 胎牛血清，10% (V/V) 二甲基亚砷，70% (V/V) DMEM。

4.3.7 双抗：10000 $\mu$ g/mL 链霉素和 10000U/mL 青霉素混合液。

4.3.8 细胞完全培养基：吸取 445mL 细胞培养基于容量瓶中，加入 50mL 胎牛血清和 5mL 双抗，充分混匀，置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，一个月内使用。

4.3.9 细胞维持培养基：吸取 475mL 细胞培养基于容量瓶中，加入 20mL 胎牛血清和 5mL 双抗，充分混匀，置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，一个月内使用。

4.3.10 标准硬水（硬度 342mg/L）：称取 CaCl<sub>2</sub> 0.304g，MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.139g，溶解在 1000mL 的蒸馏水中，用 0.22 $\mu$ m 无菌微孔滤膜过滤除菌，置于 4 $^{\circ}$ C 冰保存，备用。

#### 4.4 仪器设备

4.4.1 超低温冰箱（-80 $^{\circ}$ C）。

4.4.2 生物安全柜（II 级）。

4.4.3 液氮罐。

4.4.4 倒置显微镜。

4.4.5 离心机。

4.4.6 二氧化碳培养箱。

4.4.7 恒温器。

4.4.8 数字可调移液器。

4.4.9 T25 细胞培养瓶与 96 孔培养板。

4.4.10 生物安全二级（BSL-2）实验室。

### 5 病毒悬液的制备

#### 5.1 细胞培养

##### 5.1.1 细胞传代

5.1.1.1 准备：生物安全柜、实验用品（试管架、洗耳球等）用紫外线照射 30min~60min。

5.1.1.2 润洗：从培养箱中取出要传代的细胞培养瓶，在生物安全柜内无菌操作开盖，吸弃瓶内旧培养液，加入约 3mL PBS，轻轻吹打，润洗细胞，然后将洗液完全吸弃。

5.1.1.3 消化：加入 1mL~1.5mL 含 0.25% 胰蛋白酶的细胞消化液，平放培养瓶，轻轻摇匀，置于 37 $^{\circ}$ C 的二氧化碳细胞培养箱中消化 2 min 左右，置于显微镜下观察，如果细胞圆缩、细胞间隙加大、有成片或数个细胞脱落时，应立即加入等体积的细胞完全培养基，摇匀，终止消化。

5.1.1.4 **离心**: 把细胞悬液吸到离心管中, 3000r/min 离心 5min~7min。吸弃上清液, 加 1mL~2mL 细胞完全培养基, 重悬细胞。

5.1.1.5 **接种**: 待细胞分散均匀后, 吸取适量细胞悬液于新的细胞培养瓶中并补充细胞完全培养基至 10 mL。将细胞培养瓶置于 37℃、5%二氧化碳细胞培养箱中培养。

5.1.1.6 **观察**: 每天观察细胞生长情况, 当细胞单层布满培养皿时, 即可用于试验。

## 5.1.2 细胞冻存与复苏

5.1.2.1 **冻存**: 实验前准备工作完成后, 取出要冻存的细胞, 选用的是生长状态良好、处于生长对数期的细胞。弃去旧培养基, 加入 2mL PBS, 充分润洗后吸弃, 加入消化液消化, 方法同 5.1.1.3。离心后吸弃上清液, 加入细胞冻存液 2.5mL~3mL, 反复吹打至细胞成悬液, 分装于冻存管中。标记细胞名称和代次、冻存时间、操作者名字等, 放入冻存盒中, 先在 4℃ 冰箱中放置 4h, 再转入-20℃冰箱中 4h, 再置入-80℃冰箱中 6h~12h。第 2d 移入液氮罐中, 保存备用。

5.1.2.2 **复苏**: 从液氮罐中取出要复苏细胞的冻存管, 置于 37℃水浴迅速摇晃至融化。待完全融化后, 离心, 弃去上清。加入细胞完全培养基, 吹打均匀使细胞重悬, 吸入适量到新的细胞培养瓶中并补充细胞完全培养基至 10 mL, 使培养瓶中的细胞均匀分布, 标记好细胞种类、日期等详细信息。将细胞培养瓶放置于 37℃、5%二氧化碳细胞培养箱中培养。每日观察细胞生长情况。

## 5.2 病毒悬液制备步骤

5.2.1 将腺病毒悬液适当稀释后接种于 A549 细胞中。

5.2.2 加入适量细胞维持培养基, 置于 37℃、5%二氧化碳细胞培养箱中培养, 每日观察 CPE, 通常 2d-5d。

5.2.3 当发现细胞从培养瓶底开始大团脱落、75%的细胞出现 CPE 时, 立即对细胞冻融三次 (-20℃和 37℃交替进行), 吸取冻存液于离心管中, 6000r/min 离心 10min 去除沉淀。

5.2.4 离心后取上清液, 装入冻存管中, 于-80℃冰箱中保存。

## 5.3 终点稀释法病毒感染滴度计算

5.3.1 以半数细胞感染剂量 (TCID<sub>50</sub>) 表示, TCID<sub>50</sub> 按式 (1) 计算。

$$\text{TCID}_{50} \text{ 对数值} = \text{病变率高于 50\% 组稀释度的对数值} + \text{距离比例} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

“病变率高于 50%组”是指病变率超过 50%的最低组, 下简称“高于 50%组”。

5.3.2 计算方法如下：

5.3.2.1 计算细胞病变率。先计数培养板上不同稀释度样本细胞病变发生与未发生的孔数，然后分别计算“细胞病变（-）”和“细胞病变（+）”的累积总计值。计算“细胞病变（-）”累积值时，由稀释度低样本组向稀释度高样本组累积；“细胞病变（+）”累积值则相反，由稀释度高样本组向稀释度低样本组累积。各稀释度样本组“细胞病变（+）”累积总计值，除以该稀释度样本组“细胞病变（-）”与“细胞病变（+）”累积总计值之和即为其病变比，由之可得病变率（%）。

5.3.2.2 计算距离比例。距离比可按式（2）计算：

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于 50\% 组的病变率} - 50}{\text{高于 50\% 组的病变率} - \text{低于 50\% 组的病变率}} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

“病变率低于 50%组”是指病变率低于 50%的最高组，下简称“低于 50%组”。

## 6 病毒灭活试验

### 6.1 实验原理

采用定量悬液试验法，以细胞感染法测定消毒剂作用前后（或对照组与实验组）样本中指示病毒的 TCID<sub>50</sub>。以细胞感染后的细胞病变结果作为判断指标，确定各组病毒的感染滴度，计算消毒剂对指示病毒的灭活对数值。

### 6.2 中和剂鉴定试验

6.2.1 用标准硬水配制消毒液至所需浓度的 1.25 倍。

6.2.2 中和剂可用 PBS 为基础，加入对应的中和成分，灭菌后备用。

表 1 中和剂鉴定试验分组

组别	具体操作步骤
第1组 (消毒剂+病毒悬液)	取合适滴度病毒悬液，加入30g/L或3g/L BSA <sup>®</sup> 作对倍稀释，制备成实验所用病毒悬液，吸取0.2mL病毒悬液加入0.8mL待测消毒液中，立刻混匀。作用至预定时间，吸取0.1mL反应液于0.9mL去离子水中，充分混匀。进行梯度稀释，接种，置于细胞培养箱中培养。
第2组 (消毒剂+病毒悬液)+中和剂	将合适滴度的病毒悬液与30g/L或3g/L BSA <sup>®</sup> 作对倍稀释，吸取0.2mL该病毒悬液加入0.8mL待测消毒液中，立刻混匀。作用至预定时间，吸此反应液0.1mL加入含有0.9mL中和剂中，立即混匀，中和10min后，进行梯度稀释，接种，置于细胞培养箱中培养。
第3组 (中和剂+病毒悬液)	方法同第一组，将中和剂代替消毒剂。

第4组 (中和产物+病毒悬液)	方法同第一组, 将中和剂产物(以0.08mL消毒剂+0.9mL中和剂, 作用10min配制而成)代替消毒剂。
第5组 (去离子水+病毒悬液)	方法同第一组, 将标准硬水代替消毒剂。
第6组 (阴性对照组)	取正常的细胞稀释液, 接种。
<sup>a</sup> 用于医疗器械消毒或清洁条件下使用的消毒剂, 病毒灭活试验用有机干扰物质浓度为3g/L。	

6.2.3 试验用病毒悬液, 取 5.2 方法制备后冰箱贮备病毒悬液, 加入等量的有机干扰物(根据产品说明的使用条件选择 30g/L 或 3g/L BSA), 充分混匀后备用。

6.2.4 中和剂鉴定试验用药浓度应为正式试验浓度的最高浓度, 作用时间最短不少于 30s。

6.2.5 中和剂鉴定试验分组见表 1。

6.2.6 每日观察 CPE 情况, 共 5d, 测定各组病毒悬液的 TCID<sub>50</sub> 对数值。

6.2.7 中和剂的合格判断标准, 可参照《消毒技术规范》(2002年版)。

6.2.7.1 第1组无试验病毒, 或仅有少量生长。

6.2.7.2 第2组有远较第1组为多, 但明显较3组~5组为少的试验病毒生长。

6.2.7.3 第3、4、5(组)试验病毒生长量相近。

6.2.7.4 连续3次试验取得合格评价。

### 6.3 悬液定量病毒灭活试验

6.3.1 用标准硬水配制消毒液: 浓度为产品说明书推荐的最高稀释度的 1.25 倍, 作用时间为产品说明书推荐的最短时间(t), 同时还应包含 0.5t、1.5t 时间, 共 3 个作用时间。

6.3.2 中和剂: 可用 PBS 为基础, 加入对应的中和成分, 灭菌后备用。

6.3.3 试验用病毒悬液: 取 5.2 方法制备后病毒悬液, 加入等量的有机干扰物质(根据产品说明书的使用条件选择 30g/L 或 3g/L), 充分混匀后, 于 20°C±1°C 恒温器上恒温, 备用。

6.3.4 试验组: 将待测消毒剂溶液 0.8mL 加入一无菌 1.5mL EP 管中, 于 20°C±1°C 恒温器上恒温 5min 后, 加入 0.2mL 试验用病毒悬液, 立即混匀并计时。作用至规定时间, 立即取 0.1mL, 加入含 0.9mL 中和剂溶液的试管中, 中和作用 10min, 再用细胞维持液作适宜稀释, 取适量滴度样液 0.1mL 接种 96 孔细胞培养板(各孔中已有长满单层的宿主细胞), 每个稀释度接种 4 孔。

6.3.5 阳性(病毒)对照组: 用标准硬水代替消毒剂溶液, 其他同试验组, 再用细胞维持液作适宜稀释, 取样液 0.1mL 接种 96 孔细胞培养板, 每个稀释度接种 4 孔。



6.3.6 观察：将细胞培养板置于 37℃、5%二氧化碳培养箱中进行培养，逐日在显微镜下观察 CPE，连续观察 5d，逐孔观察并记录 CPE 情况，计算病毒 TCID<sub>50</sub> 对数值。

6.3.7 平均灭活对数值按式（3）计算

$$\text{平均灭活对数值} = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_x \dots \dots \dots (3)$$

式中：

N<sub>0</sub>——阳性对照组平均病毒灭活滴度（TCID<sub>50</sub>）

N<sub>x</sub>——试验组平均病毒灭活滴度（TCID<sub>50</sub>）

计算杀灭对数值时，取小数点后两位值，可以进行数字修约。

#### 6.4 消毒效果评价

按产品使用说明书指定的使用浓度（强度）和作用时间，试验重复 3 次。各次试验的灭活对数值均 ≥ 4.00，可判定该产品对腺病毒 5 型灭活效果达到消毒合格要求；阳性对照组病毒滴度对数值应不低于 6.00。

### 7 注意事项

7.1 操作人员应具备基本的病毒学和细胞培养试验经验，应使用微量移液器与一次性无菌吸头，严格按照二级生物安全实验室的要求开展试验。

7.2 在病毒灭活试验中，每次试验均应设置阳性对照、阴性对照。

7.3 使用病毒载体进行试验，可参照《消毒技术规范》（2002 年版）的原则进行适当修改使用。