

中华人民共和国卫生行业标准

××/T ×××××—××××

新型冠状病毒消毒效果实验室评价方法

Evaluation method for disinfection effect on severe acute respiratory syndrome  
coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in laboratory

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

××××—××—××发布

××××—××—××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
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 基本要求.....	1
5 病毒灭活试验方法.....	2
6 注意事项.....	5

## 前 言

为正确评价新型冠状病毒的消毒效果，根据《中华人民共和国传染病防治法》、《消毒技术规范》等有关规定，特制定本标准。

本标准按照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规定起草。

本标准由国家卫生健康委员会提出并归口。

本标准起草单位：江苏省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、苏州市疾病预防控制中心等。

本标准主要起草人：徐燕 吴晓松 郭喜玲 王玲 崔仑标 陈银 褚宏亮 王崑 沈益鸣 孙惠惠 沈瑾 范晶晶 葛以跃 迟莹 杨海兵

# 新型冠状病毒消毒效果实验室评价方法

## 1 范围

本标准规定了新型冠状病毒消毒效果的术语和定义、基本要求和病毒灭活试验方法。  
本标准适用于新型冠状病毒实验室消毒效果的检测与评价。

## 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。凡是注日期的引用文件，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。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 38502 消毒剂实验室杀菌效果检验方法

消毒技术规范（2002年版）〔（卫法监发[2002]282号）〕

新型冠状病毒肺炎防控方案 国家卫生健康委员会

实验室生物安全手册第三版 世界卫生组织

新型冠状病毒实验室生物安全指南 国家卫生健康委员会

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**中和剂 neutralizer**

在微生物杀灭试验中，用以消除试验微生物与消毒剂的混悬液中和微生物表面上残留的消毒剂，使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

### 3.2

**中和产物 product of neutralization**

中和剂与消毒剂作用后的产物。

### 3.3

**载体 carrier**

试验微生物的支持物。

## 4 基本要求

### 4.1 实验室及人员要求

新型冠状病毒消毒效果试验应在取得开展新型冠状病毒实验活动资格的BSL-3实验室中进行。从事新型冠状病毒消毒效果试验的实验室人员应同时具备病毒学和消毒学实验的工作经验,经过生物安全的培训和考核,有BSL-3实验室的准入资格。

## 4.2 消毒试验要求

### 4.2.1 检测要求

4.2.1.1 实验室试验分悬液法病毒灭活试验和载体法病毒灭活试验。实验室试验以悬液法试验为主,对不适宜用悬液法试验评价的消毒剂 and 器械,如黏稠的消毒剂、冲洗用消毒剂、原液使用的消毒剂及紫外线等的实验室试验可用载体法试验。

4.2.1.2 实验室试验时,悬液试验时原则上对用于不经过清洗或较脏的消毒对象的消毒剂,有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为3.0%;对用于经过清洗或较清洁的消毒对象的消毒剂,有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为0.3%;对用于经过严格清洗或极清洁的消毒对象的消毒剂,可不使用有机干扰物。

4.2.1.3 用于低温消毒时,应做低温消毒效果验证,试验时应维持低温环境进行灭活试验,全过程的温度为规定低温,低温消毒剂和染菌载体必须低温平衡后再做使用,其余实验步骤应与常温下(20℃±1℃)相同。

4.2.1.4 试验重复3次,重复性试验应分期分批进行。必要的器材和试剂应重新制备或灭菌,以防产生系统性误差。

### 4.2.2 结果评价

符合下列所有条件的消毒因子判为消毒效果合格:

- a) 去除残留消毒剂效果的中和剂鉴定试验合格;
- b) 悬液灭活试验,每次试验对新型冠状病毒应有效灭活,阳性对照组病毒滴度对数值应 $\geq 5.0$ ;载体灭活试验,每次试验对新型冠状病毒应有效灭活,阳性对照组病毒滴度对数值应 $\geq 4.0$ 。

## 5 病毒灭活试验方法

### 5.1 试验材料

试验病毒为分装保存的已确定病毒滴度的新型冠状病毒,消毒因子,中和剂,细胞株为非洲绿猴肾传代细胞(Vero-E6),有机干扰物为3%牛血清白蛋白或0.3%牛血清白蛋白,胰蛋白胍大豆肉汤培养基。试剂:细胞消化液,细胞维持液,细胞培养液等。仪器:二氧化碳培养箱、倒置显微镜、冰箱、水浴箱、II级生物安全柜,单道、多道移液器等。耗材:无菌有滤芯tip头、吸管、离心管、冻存管、试管、多孔细胞培养板等。

### 5.2 细胞准备

实验所用Vero-E6细胞在细胞培养室常规传代培养,置二氧化碳培养箱(37℃±1℃ 5%±1% CO<sub>2</sub>)中培养至单层细胞备用。载体:可选用布片、玻璃片、不锈钢片等。

### 5.3 病毒悬液的制备

取出-80℃低温保存的新型冠状病毒,室温化冻后,与有机干扰物按照1:1比例混合作为消毒剂灭活试验用病毒悬液。

### 5.4 载体的制备

××/T ×××××—××××

5.4.1 载体应根据消毒对象选择相应的材料，常用的材料有布片、玻璃片、不锈钢片等，金属载体一般用 12 mm 直径圆形金属片（厚 0.5 mm），其他材质载体一般为方形，大小 10 mm×10 mm，特定用途的消毒因子可使用其他相兼容材质的载体。

5.4.2 所用载体于染病毒前，应进行脱脂处理。脱脂过程应严格按照如下步骤进行：

- a) 将载体放入含洗涤剂的水中煮沸 30 min；
- b) 用自来水漂洗；
- c) 用蒸馏水煮沸 10min；
- d) 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性；
- e) 晾干，备用。

5.4.3 载体经压力蒸汽灭菌后烘干备用，试验前使用滴染法染病毒悬液。

5.4.4 滴染载体的病毒滴度对数值应 $\geq 4.0$ 。

## 5.5 中和剂鉴定试验

### 5.5.1 设计原则

鉴定试验旨在确定所选中中和剂是否适用于拟进行的细胞感染法病毒灭活试验。通过预试验确定消毒剂、中和产物和中和剂等对细胞生长有无影响；通过所设各组试验结果综合分析，确定所用中和剂是否对测试消毒剂有良好的中和作用，对试验用病毒和细胞株是否有害或不良影响；中和试验用消毒剂浓度应为正式消毒试验最高浓度，作用时间最短不得少于 30s。试验重复 3 次。

### 5.5.2 试验分组

#### 5.5.2.1 预实验分组

在使用细胞感染法进行病毒灭活试验时，对所用中和剂的鉴定，应进行以下各组预试验，如果中和剂与中和产物对细胞生长无影响，再进行正式试验。

- a) 中和剂 + 细胞 → 培养：观察所用中和剂对细胞的生长有无影响。
- b) （消毒剂 + 中和剂）+ 细胞 → 培养：观察中和产物溶液对细胞生长有无影响。
- c) （消毒剂 + 细胞）→ 培养：观察消毒剂对细胞生长有无影响。

在确定了中和剂与中和产物对细胞生长无影响后，进行正式试验。

#### 5.5.2.2 正式试验

- a) 中和剂 + 病毒悬液/病毒载体 → 接种细胞培养  
观察中和剂对病毒有无抑制作用。
- b) （消毒剂/消毒剂载体+中和剂）+病毒悬液/病毒载体 → 接种细胞培养  
观察中和产物，或未被完全中和的残留消毒剂对病毒有无抑制作用或对检测方法有无干扰。
- c) 病毒悬液/病毒载体 → 接种细胞培养  
观察病毒是否可致细胞病变，并将该组病毒滴度对数值作为阳性对照值。
- d) 未接种病毒的细胞 → 培养  
观察细胞生长是否正常。

### 5.5.3 操作步骤

#### 5.5.3.1 悬液法中和剂鉴定试验

××/T ×××××—××××

- a) 第1组。试验体系中按病毒与中和剂(1:4体积比例)进行试验。吸取0.2 ml病毒混悬液于试管内,置20℃±1℃中5 min后,吸取中和剂溶液0.8 ml,混合均匀。作用10 min,以细胞维持液作10倍系列稀释,吸取样液100 μl,接种于单层细胞培养板上,每个滴度接种4孔。
- b) 第2组。试验体系中按病毒与中和产物(1:4体积比例)进行试验。吸取0.2 ml病毒混悬液于试管内,置20℃±1℃中5 min后,吸取中和产物溶液0.8 ml,混合均匀。作用10 min,以细胞维持液作10倍系列稀释,吸取样液100 μl,接种于单层细胞培养板上,每个滴度接种4孔。
- c) 第3组。试验体系中按病毒与去离子水(1:4体积比例试验)进行试验。吸取0.2 ml病毒混悬液于试管内,置20℃±1℃中5 min后,吸取去离子水0.8 ml,混合均匀。作用10 min,以细胞维持液作10倍系列稀释,吸取样液100 μl,接种于单层细胞培养板上,每个滴度接种4孔。
- d) 第4组。将试验用细胞,加细胞维持液后置二氧化碳培养箱(37℃±1℃ 5%±1% CO<sub>2</sub>)中培养。

### 5.5.3.2 载体法中和剂鉴定试验

- a) 第1组。将病毒载体置20℃±1℃中5 min后,浸入中和剂1.0 ml,作用10 min。充分洗脱,以细胞维持液作10倍系列稀释,吸取样液100 μl,接种于单层细胞培养板上,每个滴度接种4孔。
- b) 第2组。将病毒载体置20℃±1℃中5 min后,浸入中和产物溶液(染有消毒剂的载体+中和剂,作用10 min)1.0 ml,混合均匀。充分洗脱,以细胞维持液作10倍系列稀释,吸取样液100 μl,接种于单层细胞培养板上,每个滴度接种4孔。
- c) 第3组。将病毒载体置20℃±1℃中5 min后,浸入去离子水1.0 ml,充分洗脱,以细胞维持液作10倍系列稀释,吸取样液100 μl,接种于单层细胞培养板上,每个滴度接种4孔。
- d) 第4组。将试验用细胞,加细胞维持液后置二氧化碳培养箱(37℃±1℃ 5%±1% CO<sub>2</sub>)中培养。

### 5.5.3.3 结果判定

- 1) 第1、2、3组病毒生长与原接种量相近。
- 2) 第4组细胞生长正常。
- 3) 中和剂和中和产物,在正式试验的最高浓度下对细胞生长无影响。
- 4) 连续3次试验取得合格评价。

## 5.6 病毒灭活试验

### 5.6.1 试验原理

用细胞感染法测定消毒因子作用前后(或对照组与实验组)样本中病毒的量。以细胞病变作为判断指标,确定各组病毒的感染滴度,观察消毒因子对新型冠状病毒的灭活效果。

### 5.6.2 悬液法病毒灭活试验

#### 5.6.2.1 操作步骤

- a) 取待测消毒剂,用灭菌硬水稀释至所需浓度的1.25倍,于20℃±1℃水浴中备用。
- b) 病毒悬液的制备:取出-80℃低温保存的新型冠状病毒,室温化冻后,与有机干扰物按照1:1比例混合作为消毒剂灭活试验用病毒悬液。
- c) 消毒试验:取上述病毒悬液1份加入4份待检消毒剂,立即混匀并记时。作用至规定时间,立即取出0.1 ml,加入中和剂中混匀;或用经鉴定合格的除药方法处理。

××/T ×××××—××××

- d) 对照组试验：阳性对照组为病毒对照组，观察病毒生长是否良好，病毒滴度是否达到试验要求；阴性对照组用细胞维持液作为阴性对照，观察有无污染，细胞生长是否良好。
- e) 以上各组按照终点稀释法分别进行病毒滴度测定。试验重复 3 次。
- f) 终点稀释法操作步骤：按照 5.5.2.2 正式试验操作程序，用细胞维持液对待滴定样本做 10 倍系列稀释，吸取样液 100 μl，接种于单层细胞培养板上，每个滴度接种 4 孔。在 37℃ 放置 1h~2h 后，取出培养板，更换细胞维持液。继续放入二氧化碳培养箱中（37℃±1℃ 5%±1% CO<sub>2</sub>）培养 3-4 天，显微镜下观察细胞生长状态，记录细胞病变情况。

### 5.6.2.2 结果判定

阴性对照组细胞生长正常；阳性对照组病毒滴度对数值应 $\geq 5.0$ ；消毒试验组细胞无病变，与阴性对照组细胞生长情况一致。

### 5.6.3 载体法病毒灭活试验

#### 5.6.3.1 操作步骤

- a) 取待测消毒剂，于 20℃±1℃ 水浴中备用。
- b) 病毒载体的制备：取灭菌载体片，滴染新型冠状病毒晾干备用。
- c) 消毒试验：取病毒载体置于消毒因子，作用至规定的时间后取出放入中和剂或洗脱液 1.0 ml 中，作用 10 min，混匀洗脱。
- d) 对照组试验：阳性对照组为病毒对照组，观察病毒生长是否良好，病毒滴度是否达到试验要求；阴性对照组用细胞维持液作为阴性对照，观察有无污染，细胞生长是否良好。
- e) 以上各组按照终点稀释法分别进行病毒滴度测定。试验重复 3 次。
- f) 终点稀释法操作步骤：按照 5.4.2.2 正式试验操作程序，用细胞维持液对待滴定样本做 10 倍系列稀释，吸取样液 100 μl，接种于单层细胞培养板上，每个滴度接种 4 复孔。在 37℃ 放置 1h~2h 后，取出培养板，更换细胞维持液。继续二氧化碳培养箱中（37℃±1℃ 5%±1% CO<sub>2</sub>）培养 3-4 天，显微镜下观察细胞生长状态，记录细胞病变情况。

#### 5.6.3.2 结果判定

阴性对照组细胞生长正常；阳性对照组病毒滴度对数值应 $\geq 4.0$ ；消毒试验组细胞无病变，与阴性对照组细胞生长情况一致。

## 6 注意事项

- 6.1 实验人员应严格按照 BSL-3 实验室个人防护标准操作规程要求做好个人防护。
- 6.2 涉及新型冠状病毒活病毒的操作必须在 BSL-3 实验室的生物安全柜中进行。
- 6.3 无菌器材使用前需检查包装是否完整，有破损者不得使用。
- 6.4 消毒试验所用的细胞培养基、TSB、和中和剂等均需无菌。
- 6.5 实验活动涉及新型冠状病毒活病毒的操作，实验过程中若发生溢洒等意外情况时，要严格按照 BSL-3 实验室意外情况应急处置操作规程等进行安全处置。
- 6.6 实验废弃物应按照相应废弃物处置操作规程进行安全处置。