

ICS 11.080

CCS C 50

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 775—2021

新型冠状病毒消毒效果实验室评价标准

Evaluation standard for disinfection effect on 2019 novel coronavirus (2019-nCoV)
in laboratory

2021 - 02 - 20 发布

2021 - 02 - 20 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 结果评价.....	5
7 注意事项.....	6

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规定起草。

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。

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

新型冠状病毒消毒效果实验室评价标准

1 范围

本文件规定了消毒因子对新型冠状病毒消毒效果实验室评价的基本要求、病毒灭活试验方法、结果评价和注意事项。

本文件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

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

消毒技术规范（2002年版）卫生部（卫法监发〔2002〕282号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

低温消毒 cryogenic disinfection

对温度在0℃以下的环境或物品进行的消毒。低温消毒需使用在该温度下被证明有效的消毒因子。

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获得开展新型冠状病毒培养实验活动资格的BSL-3实验室中进行；从事新型冠状病毒消毒效果评价的实验室人员应同时具有病毒学和消毒学实验室工作经验；进入BSL-3实验室的人员应经过生物安全的培训和考核，具有BSL-3实验室的准入资格。

4.2 试验要求

4.2.1 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病毒灭活试验为主，对不适宜用悬液法病毒灭活试验评价的消毒剂和器械，如黏稠的消毒剂、原液使用的消毒剂及紫外线等消毒器械的实验室试验可用载体法病毒灭活试验。

4.2.2 实验室悬液病毒灭活试验时，有机干扰物为牛血清白蛋白。原则上对用于不经过清洗或污染的消毒对象的消毒剂，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，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。试验中病毒接触的溶液、病毒载体等，均应在试验温度（20℃±1℃）平衡后开始试验。实验室载体病毒灭活试验时使用相应滴度的病毒培养液滴染载体后备用。

4.2.3 用于评估消毒因子低温消毒效果时，应做规定低温条件下的消毒效果验证，一般采用载体法进行。试验时消毒剂和病毒载体应在低温环境下平衡不少于 30 min 后进行测试，其余实验步骤与常温下（ $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）相同。

4.2.4 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。

5 病毒灭活试验方法

5.1 试验器材

5.1.1 试验病毒与细胞

试验病毒为分装保存并确定病毒滴度的新型冠状病毒培养物，细胞株为非洲绿猴肾传代细胞(Vero-E6)或其它适合用于新型冠状病毒增殖培养的细胞系。

5.1.2 有机干扰物

牛血清白蛋白。

5.1.3 试剂

消毒因子、中和剂、细胞消化液、细胞维持液和细胞培养液等。

5.1.4 仪器

二氧化碳培养箱、倒置显微镜、冰箱、水浴箱、II 级或 II 级以上生物安全柜等。

5.1.5 耗材

无菌带滤芯 tip 头、吸管、离心管、冻存管、试管、多孔细胞培养板、单道移液器、多道移液器等。

5.1.6 载体

可选用布片、玻璃片、不锈钢片等。

5.2 细胞准备

实验所用 Vero-E6 细胞或其它细胞在细胞培养室常规传代培养，置二氧化碳培养箱（ $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $5\%\pm 1\%$ 二氧化碳）中培养至单层细胞备用。

5.3 病毒悬液的制备

取出 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存的新型冠状病毒，室温解冻后，与设定浓度的有机干扰物混合作为消毒剂灭活试验用病毒悬液。

5.4 载体的制备

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 10 min;
- 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 ≥ 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和剂是否适用于拟进行的细胞感染法病毒灭活试验。中和剂鉴定试验包括预试验和正式试验, 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 30 s。试验重复 3 次。

5.5.2 试验分组

5.5.2.1 预试验分组

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 \rightarrow 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 \rightarrow 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 \rightarrow 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 正式试验分组

- a) 中和剂+病毒悬液/病毒载体 \rightarrow 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 \rightarrow 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 \rightarrow 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 \rightarrow 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

- 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 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。置二氧化碳培养箱 (36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 5% \pm 1% 二氧化碳) 中培养 3-4 天。
- 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 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。置二氧化碳培养箱 (36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 5% \pm 1% 二氧化碳) 中培养 3-4 天。

- c) 第3组。试验体系中按病毒与细胞维持液（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 °C ± 1 °C 中 5 min 后，吸取细胞维持液 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。置二氧化碳培养箱（36 °C ± 1 °C，5% ± 1% 二氧化碳）中培养 3-4 天。
- 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（36 °C ± 1 °C，5% ± 1% 二氧化碳）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 °C ± 1 °C 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。置二氧化碳培养箱（36 °C ± 1 °C，5% ± 1% 二氧化碳）中培养 3-4 天。
- b) 第2组。将病毒载体置 20 °C ± 1 °C 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。置二氧化碳培养箱（36 °C ± 1 °C，5% ± 1% 二氧化碳）中培养 3-4 天。
- c) 第3组。将病毒载体置 20 °C ± 1 °C 中 5 min 后，浸入细胞维持液 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。置二氧化碳培养箱（36 °C ± 1 °C，5% ± 1% 二氧化碳）中培养 3-4 天。
- 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（36 °C ± 1 °C，5% ± 1% 二氧化碳）中培养。

5.5.3.3 结果判定

试验结果符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

- a) 第1、2、3组病毒生长与原接种量相近；
- b) 第4组细胞生长正常；
- c) 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；
- d) 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 °C ± 1 °C 水浴中备用。
- b) 病毒悬液的制备：取出 -80 °C 低温保存的新型冠状病毒，室温解冻后，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，加入经鉴定合格的 0.9 mL 中和剂中混匀；或用经鉴定合格的除药方法处理。
- 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：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36℃±1℃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（36℃±1℃, 5%±1%二氧化碳）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

试验结果符合以下全部条件，可判为合格：

- a) 阴性对照组细胞生长正常；
- b) 阳性对照组病毒滴度对数值应 ≥ 5.0 ；
- c) 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，置于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经鉴定合格的中和剂或洗脱液1.0 mL中，作用10 min，混匀洗脱。消毒器械载体布点应置于最难杀灭部位，具体方法参照《消毒技术规范》。
- 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：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36℃±1℃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（36℃±1℃, 5%±1%二氧化碳）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

试验结果符合以下全部条件，可判为合格：

- a) 阴性对照组细胞生长正常；
- b) 阳性对照组病毒滴度对数值应 ≥ 4.0 ；
- c) 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 结果评价

同时符合下列a)和b)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 ≥ 5.0 或载体灭活试验，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 ≥ 4.0 。

7 注意事项

- 7.1 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。建议参与实验的人员进行新型冠状病毒疫苗接种。
 - 7.2 涉及新型冠状病毒活病毒的操作应严格执行 BSL-3 实验室的生物安全相关规定。
 - 7.3 无菌器材使用前需检查包装是否完整，有破损者不得使用。
 - 7.4 消毒试验所用的细胞培养基和试剂等均需无菌。
 - 7.5 实验活动涉及新型冠状病毒活病毒的操作，应在 BSL-3 实验室的生物安全柜中进行，实验过程中若发生溢洒等意外情况时，应严格按照 BSL-3 实验室意外情况应急处置操作规程等进行安全处置。
 - 7.6 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。
-