

【论 著】

两种过硫酸氢钾复合物对禽流感病毒和新城疫病毒的灭活效果观察

张玉霞¹,蔡李萌²,孟 凯¹,袁小远¹,王友令¹

(1 山东省农业科学院家禽研究所,山东济南 250100; 2 青岛农业大学动物医学院)

摘要 目的 观察过硫酸氢钾复合盐对禽流感病毒和新城疫病毒的灭活效果。**方法** 采用鸡胚培养法,对 2 种过硫酸氢钾复合物灭活禽流感病毒和新城疫病毒的效果进行观察。**结果** 用浓度为 313 mg/L 的复方过硫酸氢钾复合盐水溶液对悬液内 H9N2 型禽流感病毒作用 5 min 可达到完全灭活。用浓度为 1 250 mg/L 的复方过硫酸氢钾水溶液对悬液内新城疫病毒作用 10 min 可达到完全灭活。**结论** 2 种复合过硫酸氢钾粉剂对禽流感病毒和新城疫病毒均具有良好的灭活效果,新城疫病毒对该消毒剂的抗力稍强于禽流感病毒。

关键词 过硫酸氢钾复合盐;禽流感病毒;新城疫病毒;灭活效果

中图分类号:R187.1

文献标识码:A

文章编号:1001-7658(2019)07-0484-03

DOI:10.11726/j.issn.1001-7658.2019.07.002

Inactivation effect of two kinds of potassium peroxomonosulfate compound on avian influenza virus and Newcastle disease virus

ZHANG Yu-xia¹,CAI Li-meng²,MENG Kai¹,YUAN Xiao-yuan¹,WANG You-ling¹

(1 Institute of Poultry Science,Shandong Academy of Agricultural Sciences,Ji'nan Shandong 250100; 2 College of Veterinary Medicine,Qingdao Agricultural University,China)

Abstract Objective To study the inactivation effect of potassium peroxomonosulfate compound salt on avian influenza virus and Newcastle disease virus. **Methods** The inactivation effects of two kinds of potassium peroxomonosulfate compound on avian influenza virus and Newcastle disease virus were observed by chicken embryo culture method. **Results** The minimum effective concentration of potassium peroxomonosulfate compound powder for H9N2 avian influenza virus was 313 mg/L and the shortest time was 5 min to achieve complete inactivation,while the minimum effective concentration for Newcastle disease virus was 1 250 mg/L for 10 min. **Conclusion** Both the two kinds of potassium peroxomonosulfate compound have good inactivation effects on avian influenza virus and Newcastle disease virus. Newcastle disease virus is slightly more resistant to this disinfectant than avian influenza virus.

Key words potassium peroxomonosulfate compound;avian influenza virus;Newcastle disease virus;inactivation effect

禽流感病毒(AIV)H9N2 属于低致病性病毒,但此病毒的疫情则一直不断发生,对养禽业影响明显。H9N2 亚型禽流感病毒还可以跨越种间屏障传播给哺乳动物,包括猪和人等,对公共卫生安全造成威胁^[1]。新城疫病毒(NDV)属于禽副黏病毒,是危害我国家禽养殖的最严重传染病之一。研究表明规模化鸡场疫病病原主要来源于外界或鸡群内本身扩散造成^[2],因此养殖区及周围环境的日常消毒工作至关重要。研究显示,AIV 对多数化学消毒剂均比较

敏感,而 NDV 对理化因素的抵抗力相当强,但很多化学消毒剂均可将其灭活^[3]。本研究以过硫酸氢钾复合物粉为消毒剂,在实验室条件下观察其对 H9N2 型 AIV 和 NDV 的灭活效果,为实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

国产过硫酸氢钾复合粉为浅红色粉末,易溶于水;进口过硫酸氢钾复合粉为红色颗粒状。2 种产品的有效成分含量均为 11.5% 左右,均符合说明书中有效氯含量不低于 10% 的表述。

试验病毒株为低致病性 AIV H9N2 亚型 1 402

[基金项目] 国家重点研发计划(2016YFD0501600)
[作者简介] 张玉霞(1981-),女,山东聊城人,硕士,助理研究员,从事禽病防治研究工作。
[通讯作者] 王友令,Email:wangyouling71@163.com

毒株,由华南农业大学兽医学院提供;NDV chiping 12 株,由山东省家禽研究所自行分离并鉴定保存;病毒培养宿主为 10 日龄 SPF 鸡胚,由山东省农科院家禽研究所提供。

试剂包括中和剂硫代硫酸钠;0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS);无菌生理盐水;1% 鸡红细胞悬液,均为本实验室自制。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒 EID₅₀测定 参考相关文献方法^[4],将 2 种病毒分别接种 10 日龄鸡胚,培养后收集合格的尿囊液逐个进行血凝试验,并按 Reed - Muench 氏法进行计算对 2 种病毒的鸡胚半数致死剂量(EID₅₀)进行检测。2 种病毒悬液的 EID₅₀均不得低于 2 × 10⁶。

1.2.2 中和剂鉴定试验 根据《兽用消毒剂鉴定技术规范》^[5]进行预试验,判定所选中和剂对病原及 SPF 鸡胚的影响。分别以 2 种消毒剂推荐有效浓度 625 mg/L 为试验浓度,病毒液为 H9N2 病毒液,按表 1 设计同日龄接种鸡胚,每组 5 只,同方法收取尿囊液,测定各组病毒滴度,以判定所选中和剂是否合适。

1.2.3 消毒剂对病毒灭活效果测定 分别取不同浓度消毒剂各 2.5 ml,与 2.5 ml 病毒悬液等量混合。在室温下作用至设定时间,取样液 1 ml,加入装有 9 ml 中和剂试管中,混匀后中和作用 10 min,取样液接种鸡胚。同时进行阳性对照组和阴性对照组试验。鸡胚接种方法,取试验组和对照组样液 0.2 ml 接种 10 日龄易感鸡胚尿囊腔,每组浓度样液接种 5 个鸡胚。24 h 后死亡鸡胚及时取出冷冻,并分别逐个胚液做 HA 试验,HA 阴性表示病毒被灭活,HA 阳性表示病毒未灭活。

1.2.4 结果判定 以 100% 或 80% 均为阴性的消毒液最低浓度为灭活病毒的有效浓度,以该浓度消毒剂灭活病毒的最短时间为最快有效时间。

2 结果

2.1 EID₅₀检测结果

对 2 种病毒接种 SPF 鸡胚所收获的尿囊液逐个进行 HA 检验,分别记录其阴阳性。根据 Reed - Muench 计算结果显示,H9N2 亚型 1 402 株 AIV 的 EID₅₀为 10^{-4.4}/ ml,HA 效价为 1 : 2⁹;chiping12 株 NDV EID₅₀为 10^{-6.4}/ ml,HA 效价为 1 : 2¹¹,2 种病毒均符合试验毒要求。

2.2 中和剂鉴定试验结果

结果表明,用浓度为 10 g/L 硫代硫酸钠 PBS 作为中和剂,能有效中和 2 种过硫酸氢钾消毒剂推荐

浓度下残留作用,且对 SPF 鸡胚和病毒无不良影响,因此可判定该中和剂及所选浓度为合格(表 1)。

表 1 过硫酸氢钾中和剂鉴定试验结果

成分	2 种消毒液组病毒液血凝结果	
	国产过硫酸氢钾	进口过硫酸氢钾
(消毒剂 + 中和剂) + 中和剂	0/5	0/5
中和剂 + 病毒液	5/5	5/5
(消毒剂 + 中和剂) + 病毒液	5/5	5/5
消毒剂 + 病毒液	0/5	0/5
病毒悬液	5/5	5/5

注:分子为阳性数,分母为鸡胚数。

2.3 病毒液灭活试验结果

经 3 次重复试验结果表明,用浓度为 313 mg/L 的复方过硫酸氢钾复合粉水溶液对悬液内 H9N2 型 AIV 作用 5 min 可达到完全灭活。用浓度为 1 250 mg/L 的复方过硫酸氢钾水溶液对悬液内 NDV 作用 10 min,可达到完全灭活(表 2)。结果还提示,延长消毒时间或提高使用浓度,均可促进过硫酸氢钾复合粉灭活病毒的作用增强。

表 2 2 种不同消毒剂杀灭 NDV 强毒株效果

消毒时间 (min)	消毒剂 来源	不同浓度(mg/L)的灭活效果			阴性 对照	阳性 对照
		1 250	0.625	0.313		
5	国产	1/5	5/5	5/5	0/5	5/5
	进口	0/5	4/5	5/5	0/5	5/5
	国产	0/5	1/5	1/5	0/5	5/5
	进口	0/5	1/5	1/5	0/5	5/5
15	国产	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
	进口	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
30	国产	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
	进口	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5

注:分子为阳性数,分母为鸡胚数。

3 讨论

低致病性 AIV 与 NDV 2 种疫病的发生一般是由于外界病原体的侵入污染造成的,及时有效的消毒可以切断病原微生物的传播,是防控疫病的重要措施之一^[6]。常用消毒剂包括含氯、含碘消毒剂,过氧化物类消毒剂,醛类、醇类、酚类消毒剂,季铵盐复合物等。它们既可杀灭病原微生物,也对人体和环境有一定的毒性,有些消毒剂副产物还是“三致物质”,消毒药等乱用可导致土壤、河流污染严重,危害人类食品安全及生命安全。随着工业研制方法的改进,过硫酸氢钾复合盐近年来作为一种广谱、高效的兽用复方消毒剂引发广泛关注。过硫酸氢钾主要靠氧化作用破坏病原微生物的生物膜屏障,干扰 DNA 和 RNA 合成,使蛋白质变性凝固杀灭病原体^[7]。水溶液偏中性,溶解后仅产生 SO₄²⁻、K⁺ 等

离子,对环境影响较小,在水中不会产生毒副产物,其消毒高效、安全、无残留的优势适用于动物养殖。

NDV 与 AIV 均为有囊膜的病毒,低中效消毒剂就可以达到消毒效果^[8]。NDV 病毒虽然只有一个血清型,但不同毒株之间毒力差异较大,致病性千差万别,经过多年疫苗免疫,目前强毒株在禽群内已很少分离到,临床病例多为非典型的温和症状。尽管如此,为稳妥起见本试验依旧选择强毒株 NDV,研究表明,过硫酸氢钾复合粉对禽流感 H9N2 病毒具有较好的杀灭效果,在低浓度短时间内即可将其全部灭活,而新城疫强毒株 1 250 mg/L 稀释浓度 10 min 及以上杀灭效果良好,想要短时间内灭活新城疫强毒则需要提高消毒剂浓度,这与王娟等研究结果一致^[9]。总之,过硫酸氢钾复合粉是一种安全有效的消毒剂,值得在家禽养殖场所推广使用。

本试验所得数据仅为试验条件下对 2 种病毒的杀灭效果进行评价,对其他病原体的杀灭浓度及在规模化养禽场中的应用效果还需结合周边环境、流行的病原微生物种类及性价比等因素进一步验证。

(上接第 483 页)

本实验室曾以胶束电动毛细管色谱分离模式,以 20 mmol/L 硼砂 + 80 mmmol/L SDS 为分离缓冲溶液,实现了 OPA、对氯间二甲苯酚和三氯生的同时分离与测定^[11]。用此方法对 9 件 OPA 的样品进行测定时发现,有的样品存在干扰,尽管改用 254 nm 进行检测可消除部分干扰,但干扰依然存在,且灵敏度显著下降。为此我们对分离缓冲溶液进行了优化,加入了经常被用于改善分离的 PEG 20 000^[12,13],并运用三因素七水平的均匀试验设计方法对缓冲液中的硼砂、SDS 和 PEG 20 000 的浓度进行选择,结果确定分离缓冲液组成为 55 mmol/L Na₂B₄O₇ + 70 mmol/L SDS + 15 g/L PEG 20 000,在此分离缓冲液中 OPA 的峰形最好且分离度最佳。

本研究在已有文献基础上,对上述 3 种仪器方法进行了优化,并用优化的方法对 9 件 OPA 样品进行测定,尽管 3 种方法测定原理不同,但均获得了一致的测定结果,这样可以在遇到重大或可疑样品时,运用不同原理的方法进行互相印证,确保分析结果的准确性。

参 考 文 献

[1] 常文军,蔡全才,徐荷,等. 邻苯二甲醛消毒剂研究进展[J]. 中国消毒学杂志,2004,21(1):72-74.
[2] 徐贤良,杨彬,陈璐,等. 气相色谱法测定消毒剂中邻苯二甲

参 考 文 献

[1] RahimiRad S, Alizadeh A, Alizadeh E, *et al.* The avianinfluenza H9N2 at avian-human interface: A possible risk for thefuture pandemics[J]. J Res Med Sci,2016,21(1):51-55.
[2] 张红双,秦梅,柴同杰. 养殖环境生物应激因素对鸡免疫功能和生产性能的影响[J]. 动物医学进展,2010,31(s1):23-26.
[3] 史晨捷,郝利华,白瑞,等. 过氧乙酸戊二醛复方消毒剂对 NDV 和 IBDV 的杀灭试验[J]. 中国兽医杂志,2017,53(4):33-35.
[4] 于海,孙英峰,常维山. 新城疫不同毒株 EID₅₀ 的测定及增殖速度的比较[J]. 黑龙江畜牧兽医,2005,26(3):43-44.
[5] 中华人民共和国农业部. 兽用消毒剂鉴定技术规范[S]. 1992.
[6] 陈吕华,沈明亮,云麟. 重视畜禽圈舍及环境消毒是畜牧业健康发展的关键[J]. 中国兽医杂志,2010,46(1):86-87.
[7] 董婕,薄洪,董丽波,等. 3 种市售消毒剂对人感染高致病性禽流感 H5 亚型病毒杀灭效果的定量评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(6):463-467.
[8] 阳艳林,隆雪明. 过硫酸钾复合粉消毒作用实验研究[J]. 中国兽药杂志,2008,4(3):34-36.
[9] 王娟,卞国志,袁建丰,等. 过硫酸氢钾复合盐对鸡新城疫病毒杀灭效果观察[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(8):563-565.
(收稿日期:2019-02-27)

醛含量的不确定度评定[J]. 中国卫生标准管理,2018,9(11):141-144.
[3] 林立旺,许能锋,陈菁,等. 复方邻苯二甲醛的研制及消毒性能观察[J]. 中国消毒学杂志,2007,24(1):21-25.
[4] 宋金武,阙绍辉,蔡建华,等. 消毒剂中邻苯二甲醛含量测定方法比较[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(5):630-632.
[5] 田佩瑶,李洁,魏建荣,等. 紫外分光光度法快速测定消毒剂邻苯二甲醛[J]. 中国消毒学杂志,2004,21(4):43-44.
[6] 陈金龙,帖金凤,王长德. 两种仪器分析方法测定复方邻苯二甲醛含量的比较研究[J]. 中国消毒学杂志,2014,31(4):396-397.
[7] 周香玉,马腾蛟,赵立文. 毛细管气相色谱法测定消毒产品中邻苯二甲醛[J]. 中国消毒学杂志,2006,23(4):308-310.
[8] 吴兆凤,余裕娟,廖如燕. 两种色谱法测定邻苯二甲醛含量比较研究[J]. 中国消毒学杂志,2015,32(7):641-643.
[9] 车宜平,丁晓静,赵珊,等. 反相高效液相色谱法快速测定复方化学消毒剂中邻苯二甲醛[J]. 中国消毒学杂志,2006,23(3):215-217.
[10] 魏文华,董四平,杨贺乐. 高效液相色谱法测定消毒剂中邻苯二甲醛的含量[J]. 中国消毒学杂志,2012,29(6):482-483.
[11] 解娜,丁晓静,宋宝花,等. 胶束电动毛细管色谱法同时测定复方化学消毒剂及日化产品中邻苯二甲醛、对氯间二甲苯酚及 3 氯生[J]. 色谱,2013,31(1):64-70.
[12] 李佳,丁晓静,李芸,等. 胶束电动毛细管色谱法同时测定西洋参中人参皂苷 Rg1、Re 和 Rb1[J]. 色谱,2011,29(3):259-264.
[13] 王茜,丁晓静,王心宇,等. 毛细管电泳法快速测定保健食品中免疫球蛋白 G[J]. 分析化学,2006,34(8):1161-1164.
(收稿日期:2018-12-04)