

【论 著】

5 种常用消毒剂对鸡新城疫病毒的灭活效果

申玉玺,游国静,陈 雯,杨 胡,杜吉腾,李淑云,黄 勇
(四川农业大学动物医学院,四川成都 611130)

摘要 **目的** 观察 5 种消毒剂对鸡新城疫病毒(NDV)的灭活效果。**方法** 采用细胞感染法,对常用的 5 种化学消毒剂灭活新城疫病毒的效果进行了观察。**结果** 0.625 mg/L 的二氯异氰尿酸钠,12.5 mg/L 的过氧乙酸,50 mg/L 的次氯酸钠,25 mg/L 的苯扎溴铵和 5 mg/L 的双癸基二甲基溴化铵作用 10 min,均可有效灭活对悬液内新城疫病毒。**结论** 本研究 5 种常用消毒剂在较低浓度下均可有效灭活新城疫病毒,鸡胚成纤维细胞可作为新城疫病毒的敏感细胞,用作消毒效果评价试验。

关键词 新城疫病毒;消毒剂;细胞感染法;灭活效果

中图分类号:R187.2 文献标识码:A

文章编号:1001-7658(2019)08-0571-03 DOI:10.11726/j.issn.1001-7658.2019.08.004

Observing the inactivation effect of 5 commonly used disinfectants on Newcastle disease virus

SHEN Yu-xi, YOU Guo-jing, CHEN Wen, YANG Hu, DU Ji-teng, LI Shu-yun, HUANG Yong
(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu Sichuan 611130, China)

Abstract **Objective** To observe the inactivation effect of 5 kinds of disinfectants on chicken Newcastle disease virus (NDV). **Methods** The cell infection method was used to observe the effect of NDV inactivation by five commonly used chemical disinfectants. **Results** 0.625 mg/L sodium dichloroisocyanurate, 12.5 mg/L peracetic acid, 50 mg/L sodium hypochlorite, 25 mg/L benzalkonium bromide and 5 mg/L bis-decyl dimethyl bromide ammonium for 10 minutes can effectively inactivate the NDV. **Conclusion** In this study, five commonly used disinfectants can effectively inactivate NDV at lower concentrations, and chicken embryo fibroblasts can be used as an experimental model to evaluate the inactivation effect of NDV.

Key words Newcastle disease virus; disinfectant; cell infection method; inactivation effect

新城疫是一种由新城疫病毒(NDV)引起的、以感染禽类为主的、典型症状为呼吸道和消化道黏膜出血的动物急性传染病^[1]。在疫情防控中消毒剂的使用已成为养殖场对新城疫防控的有效手段之一^[2]。目前,评价消毒措施对 NDV 消毒效果的模型一般是采用鸡胚接种感染法,该方法虽然没有复杂的操作技术,但工作量大,结果判定不够准确,鸡胚价格不菲。在病毒灭活效果评价中,采用细胞感染法被认为是目前比较可靠的方法^[3]。因此,本研究利用鸡成纤维细胞(CEF)作为观察手段建立消毒剂

灭活 NDV 的方法,选择常用的五种化学消毒剂在实验室验证了细胞培养感染法的可操作性和结果可靠性。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用消毒剂包括二氯异氰尿酸钠(泡腾片)、过氧乙酸、次氯酸钠、苯扎溴铵和双癸基二甲基溴化铵,均为国内市售产品。

指标病毒毒株为新城疫病毒 F48E9 毒株,购自中国兽医药品监察所;细胞培养基为 DMEM, CEF 由 9~11 日龄鸡胚自制。

主要器材有 Amicon® Ultra-0.5 超滤管及相关实验室常规器材。

〔基金项目〕 国家重点研发计划(2016YFD0501604)

〔作者简介〕 申玉玺(1996-),女,新疆乌鲁木齐人,硕士,从事动物传染病的研究。

〔通讯作者〕 黄勇,Email:hyong601@163.com

1.2 试验方法

1.2.1 病毒悬液制备及其感染滴度(TCID₅₀)测定^[4] 选取9~11日龄SPF鸡胚,在尿囊腔内接种0.2 ml NDV 毒株 F48E9 冻融液,37℃孵箱中孵育;每日照蛋3次,将24 h内死亡的鸡胚弃去。收集120 h内死亡鸡胚尿囊液,置于-80℃冰箱中保存备用。将收集的尿囊液做10倍梯度稀释,接种24孔细胞培养板,用Reed-Muench法计算病毒的TCID₅₀。

1.2.2 残留消毒剂去除鉴定试验 ①化学中和法:含氯消毒剂和过氧乙酸选择浓度为10 g/L 硫代硫酸钠的磷酸缓冲液作为中和剂^[5,6],用一次性滤器进行过滤除菌后再作适当稀释。参照2002年版《消毒技术规范》进行^[7],试验设计5组,结果判定以第1组无病毒存活或存活少量病毒,为第2、3、4组病毒生长正常,第5组为阴性对照。符合上述判定,表明所选中和剂对宿主细胞无毒且对消毒剂去除有效。②过滤去除法:两种季铵盐类消毒剂采用过滤法去除其残留。试验依然设计5组,且结果判定也按上述原则进行。

1.2.3 病毒灭活试验 用灭菌标准硬水将各消毒剂配制成试验浓度的2倍溶液,与病毒悬液一并在试验条件下恒温。取配制的消毒液与等体积的NDV原液(10^{6.5}TCID₅₀/0.1 ml)混匀并作用10 min,然后加入50 μl 中和剂中和作用10 min。取样液原液及相应稀释度样液100 μl 加入到24孔CEF细胞培养板上,每个浓度加4孔,再向每孔中加入300 μl 1%胎牛血清DMEM细胞维持液。置于37℃二氧化碳培养箱中培养,观察3 d。同时设置病毒感染组和DMEM细胞维持液对照组。用Reed-Muench法计算病毒感染组和消毒剂组的TCID₅₀。

灭活对数值=log N₀-Log N_x,其中N₀为病毒感染对照组的TCID₅₀,N_x为消毒剂组的TCID₅₀。灭活对数值≥4.00,且阳性对照组病毒滴度对数值在5~7之间,可判定对NDV消毒的实验室试验合格^[7]。

2 结果

2.1 残留消毒剂去除试验结果

结果表明,用终浓度为500 mg/L 的硫代硫酸钠PBS可有效中和含氯消毒剂和过氧乙酸的残留物且对CEF细胞无毒性(表1)。过滤法表明,两种季铵盐类消毒剂采用超滤法去除残留,第一组经测得TCID₅₀趋近于0.00,第2、3、4组组间病毒滴度相差≤15%,第5组无细胞病变、细胞生长良好,且连续3次重复试验结果一致,过滤法适宜于这两种消毒剂残留的去除。

表1 含氯消毒剂和过氧乙酸中和剂鉴定结果

组序	各组消毒剂回收平均滴度(TCID ₅₀ /0.1 ml)值	
	含氯消毒剂组	过氧乙酸组
1	0.00	0.00
2	6.33	6.33
3	6.50	6.50
4	6.50	6.50
5	0.00	0.00

2.2 病毒灭活效果

结果表明,NDV 毒株 F48E9 在 CEF 上的感染滴度为10^{-6.5}/0.1 ml。浓度为0.625 mg/L的二氯异氰尿酸钠溶液、12.5 mg/L 的过氧乙酸溶液、50 mg/L的次氯酸钠、25 mg/L 的苯扎溴铵原液和5 mg/L的双癸基二甲基溴化铵溶液作用10 min后,对悬液内的NDV 毒株 F48E9 均能达到灭活合格(表2)。

表2 消毒剂对NDV病毒的灭活试验结果

消毒剂	有效成分含量(mg/L)	消毒剂组平均滴度(TCID ₅₀ /0.1 ml)	灭活对数值
二氯异氰尿酸钠	0.625	10 ^{0.33}	6.17
过氧乙酸	12.500	10 ^{1.50}	5.00
次氯酸钠	50.000	10 ^{0.67}	5.83
双癸基二甲基溴化铵	25.000	10 ^{2.33}	4.17
苯扎溴铵	5.000	10 ^{0.33}	6.17

注:对照组病毒滴度为10^{6.5} TCID₅₀/0.1 ml。

3 讨论

兽用消毒剂在临床使用中存在诸多问题,如不重视消毒剂的使用、消毒程序不科学、长时间使用一种消毒剂、消毒剂选择不当等。其中消毒剂选择不当有时会延误动物疫病的控制和扑灭,比如聚六亚甲基胍和苯扎溴铵对无包膜蛋白病毒如口蹄疫病毒基本无效^[8]。化学消毒剂本身也存在一些缺点,如刺激性大、有腐蚀性、水线清除效果差等。所以,兽医消毒剂的选择应该在保证消毒效果的基础上,尽量选择安全、低毒的消毒剂^[9],故本试验选用了二氯异氰尿酸钠、过氧乙酸、次氯酸钠、苯扎溴铵和双癸基二甲基溴化铵五种市场常见的安全性相对较高的消毒剂进行NDV杀灭效果的评估。

家禽病毒消毒剂的筛选一般采用鸡胚接种法^[10,11]。本文原拟采用SPF鸡胚作为消毒试验的评价平台,但接胚接种工作量大花费多,且NDV感染的评价标准是鸡胚死亡或鸡胚尿囊液的血凝性的测定,因此感染结果的判定比较繁琐。本文采用CEF作为NDV的感染观察手段和消毒试验的评价平台,主要优点是工作量小、花费少,结果易判定。NDV灭活评价试验中,有效去除反应体系中残留的

消毒剂是试验成功的关键环节^[12,13]。本研究中含氯消毒剂与过氧化物类消毒剂可用硫代硫酸钠中和,而季铵盐类消毒剂苯扎溴铵和双癸基二甲基溴化铵,资料介绍用 1% 甘氨酸 + 3% 吐温 80 + 0.3% 卵磷脂的生理盐水,但有研究报道,卵磷脂和吐温不仅本身对细胞生长有一定的影响,而且其与任何消毒剂形成的中和产物都会对试验细胞造成较大的危害^[13]。本试验前期预试验也证实其对 CEF 毒性较大,所以改用过滤法去除季铵盐类消毒剂的残留^[14]。CEF 本身对化学消毒剂的耐受力较低,在预试验时发现 5 种消毒剂的推荐使用浓度均对 CEF 细胞有毒性,故在消毒剂残留去除试验中没有设置消毒剂 + 病毒悬液组。

一般消毒剂对病毒的灭活效果受有机物影响比较大,常规消毒工作中,待消毒的物品或多或少都存在有机干扰物。因此,在评价消毒效果时,需要在病毒悬液中加入有机干扰物。本研究采用病毒悬液和用硬水稀释的消毒剂作用后再接种细胞,因此未加有机干扰物,得到的病毒灭活效果是理想状态,得出的有效浓度可能远远低于常规实际使用浓度,建议在实际使用中加大使用浓度。

本文筛选出了 5 种常用消毒剂残留的去除方法,测定了其对 NDV 的有效杀灭浓度。结果发现 5 种常用消毒剂在一定浓度下能有效杀灭 NDV,且二氯异氰尿酸钠杀灭 NDV 需要的有效含量最低。试验结果对新城疫防控消毒剂的筛选和生产,以及新城疫实际的消毒有积极的指导意义。

参考文献

[1] 邓紫艳,项勋,段纲,等. 新城疫病毒分子生物学研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2017(1):11-13.

[2] 刘艳华,温芳,王学伟,等. 兽用消毒剂二氧化氯检测方法的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2011,45(2):51-54.

[3] Steinmann J. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants[J]. J Hosp Infect,2004,56:S49-S54.

[4] 房大学,王彦辉,王建举,等. 中草药在鸡胚成纤维细胞(CEF)上对新城疫病毒的作用研究[J]. 中国动物保健,2010,12(3):31-32.

[5] 杨洪,高文凤,刘衡川,等. 过氧化氢消毒液的中和剂筛选试验研究[J]. 中国消毒学杂志,2010,27(2):132-133.

[6] 徐继英,陈化琦,王瑜,等. 新型消毒剂消特威对鸡新城疫病毒杀灭效果研究[J]. 中兽医医药杂志,2016(3):61-63.

[7] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002.

[8] 佟海山,陈遇英. 我国兽用消毒剂的应用现状与对策[J]. 中国兽医杂志,2017(9):121-123.

[9] 邱梅,郝智慧,庞云露,等. 国内外兽用消毒剂的研究现状与发展趋势[J]. 中国兽药杂志,2011,45(6):43-47.

[10] 李朋朋,周德刚,卞愧,等. 过氧化氢溶液对鸡新城疫病毒的杀灭效果试验[J]. 中国兽医杂志,2018,54(5):101-103.

[11] 史晨婕,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.

[12] 韩杰,魏秋华. 化学消毒剂的中和剂研究现状[J]. 中国消毒学杂志,2013,30(12):1165-1168.

[13] 赵斌秀,张流波. 消毒剂消毒效果评价中残留物去除技术[J]. 中国消毒学杂志,2016,33(3):271-276.

[14] 于礼,王劲,刘国栋,等. 超滤法在病毒灭活试验中去除残留消毒剂的应用[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(6):504-506.

(收稿日期:2018-11-20)

(上接第 570 页)

[4] 刘敬先,杜柏林,王丽娜. 浅谈利巴韦林[J]. 黑龙江医药科学,2013,36(5):24-25.

[5] 刘亚军,谢燕萍. 紫外分光光度法测定利巴韦林葡萄糖注射液中的利巴韦林的含量[J]. 海峡药学,2000,12(2):32-33.

[6] 林红,徐咏. 紫外分光光度法测定利巴韦林颗粒的含量[J]. 儿科药科学杂志,2003,9(5):21-22.

[7] 肖七琪,周其超,张悦. 利巴韦林注射液中间产品含量快速测定方法[J]. 科技视界,2013,3(9):161-162.

[8] 李宇,王术皓,刘洪海,等. 流动注射化学发光法测定利巴韦林[J]. 光谱实验室,2005,22(2):238-241.

[9] 武晓红,肖娴,赵辉. 高效液相色谱法测定滴眼液中利巴韦林和诺氟沙星的含量[J]. 河南大学学报:医学版,2013,32(1):32-34.

[10] 李维超,佟若菲,张囡,等. HPLC 法测定复方盐酸林可霉素滴鼻剂中盐酸林可霉素和利巴韦林[J]. 现代药物与临床,2015,30(1):33-35.

[11] 罗伟,李旻华,林秋凤. 健康产品中非法添加利巴韦林的分散

固相萃取-高效液相色谱筛查及质谱确证[J]. 儿科药科学杂志,2017,23(1):39-42.

[12] 木其尔,赵英奎. 用氨基柱的 HPLC 法测定利巴韦林片含量[J]. 今日药学,2018,28(4):249-251.

[13] Breadmore MC, Theurillat R, Thormann W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis,2004,25(10-11):1615-1622.

[14] 王萍,李梦琦,赵丽媛,等. 基于均匀和正交试验设计的胶束电动毛细管色谱法同时测定消毒剂和抗抑菌产品中 3 种核苷类抗病毒药物[J]. 色谱,2018,36(9):931-937.

[15] Tavares MFM, Colombara R, Massaro S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis Evaluation of electrolyte systems for anion analysis[J]. J Chromatogr A,1997,772(1-2):171-178.

[16] Melanson JE, Barylka NE, Lucy CA. Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis[J]. Trends Analyt Chem,2001,20(6-7):365-374.

(收稿日期:2018-12-10)