

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.1.1

三类常用消毒剂对非洲猪瘟病毒灭活效果的评价

南文龙¹, 巩明霞¹, 邹艳丽¹, 刘 珊¹, 陆 游^{1,2}, 吴晓东^{1*}, 陈义平^{1*}

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032; 2. 扬州大学, 江苏扬州 225009)

[收稿日期] 2020-10-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 01-0001-06 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为评价戊二醛类、酚类、含氯类常用消毒剂对非洲猪瘟病毒 (ASFV) 的灭活效果, 参考 OIE 参考实验室相关操作流程, 基于畜禽栏舍、运载工具、器具消毒的目的, 根据说明书标明的浓度范围选择低、中、高 3 个工作浓度, 在选定工作浓度下将消毒剂与 ASFV 分别在 4 ℃ 和 20 ℃ 条件下作用 30 min, 10 倍连续稀释后接种猪肺泡巨噬细胞, 同时加入猪红细胞, 培养观察红细胞吸附现象。结果显示, 这三类消毒剂对 ASFV 均具有灭活作用, 但效果因消毒剂种类和工作浓度不同有所差异。相同工作浓度的同一消毒剂产品, 在 4 ℃ 和 20 ℃ 这两种条件下的灭活效果基本一致。戊二醛类和酚类消毒剂, 在说明书推荐的工作浓度下均可有效灭活 ASFV; 含氯类消毒剂需在其说明书标明浓度范围的较高工作浓度时才可有效灭活 ASFV。本研究评价了三类常用消毒剂对 ASFV 的灭活效果, 可为生猪养殖、运输调运、屠宰加工、检验检疫等工作中消毒剂的选择和使用提供参考。

[关键词] 非洲猪瘟; 消毒剂; 灭活

Evaluation of the Inactivation Effect of Three Kinds of Disinfectants on African Swine Fever Virus

NAN Wen-long¹, GONG Ming-xia¹, ZOU Yan-li¹, LIU Shan¹, LU You^{1,2},
WU Xiao-dong^{1*}, CHEN Yi-ping^{1*}

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China;

2. Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Corresponding author: WU Xiao-dong, E-mail: wuxiaodong@cahec.cn; CHEN Yi-ping, E-mail: cyp777@163.com

Abstract: In order to evaluate the inactivation effects of glutaraldehyde, phenol and chlorine compound disinfectants on African swine fever virus (ASFV), this study was designed referring to the procedures of OIE reference laboratory. According to the disinfection purpose of livestock and poultry houses, vehicles and instruments, three working concentrations (low, medium and high) of the disinfectants were selected. Then, the

基金项目: 国家重点研发计划“非洲猪瘟病毒流行病学和检测技术研究”(2018YFC0840401); 湖南省课题“湖南非洲猪瘟流行风险监测与防控技术研究与应用”(2019 NK2181)

作者简介: 南文龙, 副研究员, 从事外来动物疫病诊断与防控技术研究。

通讯作者: 吴晓东, E-mail: wuxiaodong@cahec.cn; 陈义平, E-mail: cyp777@163.com

disinfectants were prepared and reacted with ASFV at 4 °C and 20 °C for 30 minutes, respectively. The reaction products were diluted 10 times continuously and inoculated in porcine alveolar macrophages, and at the same time porcine erythrocytes were added. The haemadsorption was observed daily. The results showed that all the disinfectants had inactivation effects on ASFV, but they were various due to different kinds and working concentrations of the disinfectants. For each disinfectant, when the working concentration was determined, the inactivation effect was basically same whenever at 4 °C or 20 °C. Generally, glutaraldehyde and phenol compound disinfectants could effectively inactivate ASFV at the working concentration recommended in the instructions; chlorine compound disinfectants could effectively inactivate ASFV only at the high working concentration indicated in the instructions. This study preliminarily verified the inactivation effects of three common kinds of disinfectants on ASFV, which provides reference for the selection and use of disinfectants in the aspects of swine breeding, transportation, slaughter processing, inspection and quarantine.

Key words: African swine fever virus; disinfectants; inactivation

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染引起的家猪和野猪的一种急性、热性、高度接触性传染病。自 2018 年 8 月农业农村部发布沈阳沈北新区发生首起非洲猪瘟疫情^[1]至今,非洲猪瘟已蔓延至我国多个省市自治区,给养猪业及相关行业造成了巨大经济损失和深远影响。

ASFV 对高温、腐败、干燥、冻融、超声波和极端 pH 值等环境条件具有较强的抵抗能力,但本身作为囊膜病毒,对消毒剂的抵抗能力较差,常用的消毒剂均可有效将其灭活^[2-4]。我国农业农村部发布的《感染非洲猪瘟养殖场恢复生产技术指南》、《非洲猪瘟疫情应急实施方案》(2020 年第二版)、《非洲猪瘟常态化防控技术指南(试行版)》等系列防控文件中,均对用于 ASFV 防控用消毒剂种类和使用方法进行了推荐。

当前我国生猪产业实践中在使用多种不同类型、组方及工作浓度的消毒剂产品,对 ASFV 的灭活效力亟需科学、客观评价。本研究选择市售常用的戊二醛类、酚类、含氯类消毒剂,参考 OIE 参考实验室有关操作流程,评价其对 ASFV 的灭活效果,以期为生猪养殖、运输调运、屠宰加工、检验检疫等工作中消毒剂的选择和使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 消毒剂 收集市面常见的戊二醛类、酚类、含

氯类消毒剂,其中戊二醛类 6 种,商品代号 A1 ~ A6;酚类 6 种,商品代号 B1 ~ B6;含氯类 3 种,商品代号 C1 ~ C3。消毒剂产品详细信息见表 1,试验时消毒剂均在有效期内。

1.2 病毒 非洲猪瘟病毒 African swine fever virus isolate CN2018/1 株,由国家非洲猪瘟参考实验室分离鉴定。

1.3 试剂与耗材 DMEM 培养基、胎牛血清为 GIBCO 公司产品;细胞瓶及 96 孔细胞板购自 Corning 公司。

1.4 猪肺泡巨噬细胞、猪红细胞和血清的制备 无菌采集健康猪肺脏,向肺脏注入灭菌 PBS 灌洗数次,收集灌洗液,离心收集猪肺泡巨噬细胞,按 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 浓度 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 接种 96 孔板。次日铺板,进行测试。同步无菌采集抗凝血,离心收集血清,之后将细胞沉淀洗涤 3 ~ 5 次,弃去白细胞和血小板,用 PBS 配成 10% 猪红细胞悬液,4 °C 保存备用。

1.5 消毒剂对细胞状态影响试验 依据畜禽栏舍、运载工具、器具消毒目的,按消毒剂说明书推荐合理选择高、中、低 3 个工作浓度,并将消毒剂原液制成 10 倍工作浓度备用。将 0.1 mL 10 倍工作浓度液加入到 0.9 mL 含 1% 猪血清的 PBS 中充分混合,混合物分别在 20 °C 和 4 °C 条件下作用 30 min。阴性对照组,直接取 1 mL 含 1% 猪血清的 PBS,按相同条件作用处理。

表 1 消毒剂产品信息表

Tab 1 Information of disinfectant products

消毒剂种类	商品代号	说明书主要成分	说明书推荐工作浓度	主要适用范围
戊二醛类	A1	戊二醛 20%	1:80 ~ 1:200 稀释	
	A2	戊二醛 20%	1:4 ~ 1:10 稀释	
	A3	100 mL 含戊二醛 15 g, 苯扎氯铵 10 g	1:80 ~ 1:300 稀释	
	A4	戊二醛, 苯扎氯铵	1:80 ~ 1:300 稀释	
	A5	100 mL 含戊二醛 5 g, 癸甲溴铵 5 g	1:500 ~ 1:2000 稀释	
	A6	100 mL 含戊二醛 5 g, 癸甲溴铵 5 g	1:500 ~ 1:2000 稀释	
酚类	B1	酚, 醋酸, 十二烷基苯磺酸	1% ~ 5% 稀释	畜禽栏舍; 运载工具; 器具消毒
	B2	酚 41% ~ 49%, 醋酸 22% ~ 26%	1:200 ~ 1:500 稀释	
	B3	100 mL 含邻苯基苯酚 12 g, 对氯间甲酚 12 g	1:200 ~ 1:800 稀释	
	B4	酚 41% ~ 49%, 醋酸 22% ~ 26%, 十二烷基苯磺酸	1% ~ 5% 稀释	
	B5	高沸点煤焦油酚 41% ~ 49%, 醋酸 22% ~ 26%, 十二烷基苯磺酸	1:100 ~ 1:1000 稀释	
	B6	酚 41% ~ 49%, 醋酸 22% ~ 26%, 十二烷基苯磺酸	0.3% ~ 1.6% 稀释	
含氯类	C1	二氯异氰脲酸钠有效氯计 30%	1:300 ~ 1:3000 稀释	
	C2	二氯异氰脲酸钠有效氯计 20%	1:200 ~ 1:2000 稀释	
	C3	二氯异氰脲酸钠有效氯计 45%	1:200 ~ 1:2000 稀释	

作用结束后,采用含 1% 猪血清的 PBS 连续 10 倍稀释上述各组作用后产物至 10^{-8} ,每孔 50 μ L 接种猪肺泡巨噬细胞培养物,同时加入 1% 猪红细胞 10 μ L,每个稀释度(含未稀释作用产物即原液)做 4 重复孔。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养 6 d,观察记录细胞状态。评估消毒剂对猪肺泡巨噬细胞和猪红细胞状态影响,用于消毒剂对 ASFV 灭活作用试验参照。

1.6 消毒剂对非洲猪瘟病毒灭活作用试验 参考 OIE 参考实验室开展的消毒剂对 ASFV 灭活效力评估操作流程,制定本试验方案。按 1.5 方法,稀释消毒剂至 10 倍工作浓度备用。测试组,将 0.1 mL 10 倍工作浓度液和 0.1 mL ASFV 培养物加入到 0.8 mL 含 1% 猪血清的 PBS 中充分混合,混合物分别在 20 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 条件下作用 30 min。阳性对照组,将 0.1 mL ASFV 培养物加入到 0.9 mL 含 1% 猪血清的 PBS 中充分混合,按相同条件作用处理。阴性对照组,直接取 1 mL 含 1% 猪血清的 PBS,按相同条件作用处理。

作用结束后,用含 1% 猪血清的 PBS 连续 10 倍稀释各组作用后产物至 10^{-8} ,每孔 50 μ L 接种猪肺

泡巨噬细胞培养物,同时加入 1% 猪红细胞 10 μ L,每个稀释度(含未稀释作用产物即原液)做 4 重复孔。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养 6 d,每天观察、记录并统计各稀释度培养孔中红细胞吸附(Hemadsorption, HAD)反应结果;如结果可疑或无法判定,再次传代后综合判定结果。重复试验 2 次,统计消毒剂不同工作浓度下各培养孔中 HAD 结果,采用 Reed – Muench 法计算半数红细胞吸附量(HAD₅₀),测定病毒滴度 Log₁₀ HAD₅₀/mL。参照卫生部颁布的 2002 版《消毒技术规范》^[5] 计算平均灭活对数值,消毒后平均灭活对数值 ≥ 4 ,判为有效灭活 ASFV。平均灭活对数值按如下方法计算:设阳性对照组平均病毒感染滴度(HAD₅₀)为 N₀,试验(消毒)组平均病毒感染滴度(HAD₅₀)为 N_x,平均灭活对数值 = log₁₀ N₀ – log₁₀ N_x。

2 结果与分析

2.1 消毒剂对细胞状态影响试验结果 戊二醛类、酚类、含氯类消毒剂对细胞状态影响结果详见表 2。其中,戊二醛类、酚类消毒剂对细胞状态影响可见于原液、 10^{-1} ~ 10^{-3} 稀释孔中,主要表现为猪肺泡巨噬细胞和猪红细胞死亡固定(当细胞孔中消

毒剂有效成分含量较高时)与不同程度的破碎、崩解。含氯类消毒剂对细胞状态影响相对较小,与阴性对照组相比,仅消毒剂 C1 的 1:300、C2 的 1:200、C3 的 1:200 和1:400工作浓度的原液孔中,猪肺泡巨噬细胞和猪红细胞轮廓略显模糊、折光性下降,状态相对较差,但形态未见明显异常。

表 2 消毒剂对细胞状态影响试验结果

Tab 2 Influence results of disinfectants on cell state										
消毒剂种类	商品代号	工作浓度	20 ℃作用 30 min				4 ℃作用 30 min			
			原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
戊二醛类	A1	1:200	++	+	+	—	++	+	+	—
		1:140	++	+	+	—	++	+	+	—
		1:80	++	+	+	—	++	+	+	—
	A2	1:10	++	++	+	+	++	++	+	+
		1:8	++	++	+	+	++	++	+	+
		1:4	++	++	+	+	++	++	+	+
	A3	1:300	++	+	—	—	++	+	—	—
		1:150	++	+	+	—	++	+	+	—
		1:80	++	+	+	—	++	+	+	—
	A4	1:300	++	+	+	+/-	++	+	+	+/-
		1:150	++	+	+	+/-	++	+	+	+/-
		1:80	++	+	+	+	++	+	+	+
	A5	1:2000	+	+	+	—	+	+	+	—
		1:1000	+	+	+	—	+	+	+	—
		1:500	+	+	+	—	+	+	+	—
酚类	B1	1:2000	+	+	+/-	—	+	+	+/-	—
		1:1000	+	+	+/-	—	+	+	+/-	—
		1:500	+	+	+/-	—	+	+	+/-	—
	B2	1%	++	+	+	+	++	+	+	+
		2%	++	+	+	+	++	+	+	+
		5%	++	+	+	+	++	+	+	+
	B3	1:500	+	+	—	—	+	+	—	—
		1:300	+	+	—	—	+	+	—	—
		1:200	+	+	—	—	+	+	—	—
	B4	1:800	+	+	+	—	+	+	+	—
		1:400	+	+	+	—	+	+	+	—
		1:200	+	+	+	—	+	+	+	—
	B5	1%	++	+	+	—	++	+	+	—
		2%	++	+	+	+/-	++	+	+	+/-
		5%	++	+	+	+	++	+	+	+
	B6	1:1000	+	+	—	—	+	+	—	—
		1:400	+	+	—	—	+	+	—	—
		1:100	+	+	—	—	+	+	—	—
含氯类	C1	0.3%	+	+	—	—	+	+	—	—
		1%	+	+	—	—	+	+	—	—
		1.6%	++	+	+/-	—	++	+	+/-	—
	C2	1:3000	—	—	—	—	—	—	—	—
		1:1000	—	—	—	—	—	—	—	—
		1:300	+/-	—	—	—	—	—	—	—
	C3	1:2000	—	—	—	—	—	—	—	—
		1:1000	—	—	—	—	—	—	—	—
		1:200	+/-	—	—	—	—	—	—	—
		1:2000	—	—	—	—	—	—	—	—
		1:400	+/-	—	—	—	—	—	—	—
		1:200	+/-	—	—	—	—	—	—	—

“++”:培养孔中出现细胞死亡,形态固定;“+”:培养孔中出现不同程度的细胞破碎、崩解;“+/-”:培养孔细胞状态相对较差,但形态未见明显异常;“—”:培养孔细胞状态未见明显异常

2.2 消毒剂对非洲猪瘟病毒灭活作用试验结果

阳性对照组培养 6 d 后发生显著细胞病变,猪肺泡巨噬细胞大量萎缩、死亡脱落,部分猪肺泡巨噬细胞聚团且附着大量猪红细胞,经 Reed – Muench 法计算病毒液滴度为 $10^{7.2}$ HAD₅₀/mL。阴性对照组中细胞形态无异常,猪肺泡巨噬细胞轮廓清晰,大多数呈圆形或椭圆形,均匀附着于 96 孔板底,猪红细胞均匀散落于猪肺泡巨噬细胞间隙中。

消毒剂对 ASFV 灭活检测结果详见表 3。6 种戊二醛类消毒剂和 6 种酚类消毒剂,在本试验中各工作浓度下原液及不同稀释度培养孔中均未发现 HAD 现象,与阳性对照相比,平均灭活对数为 7.2,表明有效灭活 ASFV。参照消毒剂说明书主要成分综合分析,戊二醛类消毒剂中,有效成分浓度 ≥ 0.1% 的戊二醛 (A1 的 1: 200 工作浓度),或 ≥ 0.05% 戊二醛 + 0.03% 苯扎氯铵 (A3 的 1: 300 工作浓度),或 ≥ 0.0025% 戊二醛 + 0.0025% 癸甲溴铵 (A5、A6 的 1: 2000 工作浓度),均可有效灭活 ASFV。酚类消毒剂中,有效成分浓度 ≥ 0.1% 的酚 41% ~ 49%、醋酸 22% ~ 26% 和十二烷基苯磺酸 (B5 的 1: 1000 工作浓度),或 ≥ 0.015% 邻苯基苯酚 + 0.015% 对氯间甲酚 (B3 的 1: 800 工作浓度),均可有效灭活 ASFV。3 种含氯类消毒剂 (成分二氯异氰脲酸钠)则需在说明标明浓度范围的较高工作浓度——C1 的 1: 300、C2 的 1: 200 及 C3 的 1: 200和 1: 400 才未发现 HAD 现象,综合分析有效成分浓度 ≥ 0.1% 有效氯时,平均灭活对数为 7.2,表明有效灭活 ASFV。

3 讨论与结论

目前,在非洲猪瘟疫情应急处置和养殖场日常防控工作中,主要依靠扑杀和执行高水平的生物安全措施,使用化学消毒剂杀灭病毒阻断传播,仍是现阶段非洲猪瘟防控依赖的重要手段。

本研究中所用消毒剂对 ASFV 均有灭活作用,但灭活效果因消毒剂的种类和工作浓度不同有所差异。相同工作浓度的同一消毒剂产品,在 4 ℃ 和 20 ℃ 这两种条件下的灭活效果基本一致。戊二醛类和酚类消毒剂,在说明书推荐的工作浓度下,均

表 3 消毒剂对非洲猪瘟病毒灭活试验结果

Tab 3 Inactivation results of ASFV by disinfectants				
消毒剂种类	商品代号	工作浓度	病毒滴度/(HAD ₅₀ · mL ⁻¹)	
			20 ℃作用 30 min	4 ℃作用 30 min
戊二醛类	A1	1: 200	—	—
		1: 140	—	—
		1: 80	—	—
	A2	1: 10	—	—
		1: 8	—	—
		1: 4	—	—
	A3	1: 300	—	—
		1: 150	—	—
		1: 80	—	—
	A4	1: 300	—	—
		1: 150	—	—
		1: 80	—	—
	A5	1: 2000	—	—
		1: 1000	—	—
		1: 500	—	—
	A6	1: 2000	—	—
		1: 1000	—	—
		1: 500	—	—
酚类	B1	1%	—	—
		2%	—	—
		5%	—	—
	B2	1: 500	—	—
		1: 300	—	—
		1: 200	—	—
	B3	1: 800	—	—
		1: 400	—	—
		1: 200	—	—
	B4	1%	—	—
		2%	—	—
		5%	—	—
	B5	1: 1000	—	—
		1: 400	—	—
		1: 100	—	—
	B6	0.3%	—	—
		1%	—	—
		1.6%	—	—
含氯类	C1	1: 3000	10 ^{6.8}	10 ^{7.1}
		1: 1000	10 ^{5.4}	10 ^{5.6}
		1: 300	—	—
	C2	1: 2000	10 ^{7.0}	10 ^{7.2}
		1: 1000	10 ^{6.8}	10 ^{6.6}
		1: 200	—	—
	C3	1: 2000	10 ^{5.5}	10 ^{5.5}
		1: 400	—	—
		1: 200	—	—

“—”:在原液及系列稀释细胞培养孔中均未出现 HAD 现象

可有效灭活 ASFV;含氯类消毒剂需在其说明书标明浓度范围的较高工作浓度时,即有效氯浓度 ≥

0.1% 时,可有效灭活 ASFV。

与含氯类消毒剂相比,戊二醛类和酚类消毒剂对细胞毒性作用更加明显,临场使用保证消毒效果的同时,应注意控制工作浓度并减少人员暴露。含氯类消毒剂毒性相对较小,但消毒效果易受到环境有机物影响。Shirai 等^[4]研究表明,有效氯浓度为 0.03% ~ 0.0075% 的次氯酸钠,即可在细胞水平上有效灭活 ASFV,平均灭活对数为 4.5。Krug 等^[6]研究显示,浓度为 2000 ppm 次氯酸钠才可有效灭活木材表面上的 ASFV,平均灭活对数为 4.43,其所用工作浓度显著高于细胞水平验证浓度。本研究测试有效成分为二氯异氰脲酸钠的消毒剂,有效氯浓度为 0.1% 时,可有效灭活细胞培养物中的 ASFV,临场使用时可根据消毒对象性质适当提高其工作浓度。

本研究从细胞水平上评价了戊二醛类、酚类、含氯类消毒剂对 ASFV 的灭活效力,结果表明在适当工作浓度下三类消毒剂均可有效灭活 ASFV。临场消毒时,除选择适当的消毒剂种类和工作浓度外,在消毒前进行有效机械清洁,并确保适当作用温度和时间,方可获得较好消毒效果^[7]。本研究将为生猪养殖、运输调运、屠宰加工、检验检疫等工作中的消毒剂选择和使用提供参考。

参考文献:

- [1] 陈 腾, 张守峰, 周鑫韬, 等. 我国首次非洲猪瘟疫情的发现和流行分析[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(9): 1831 - 1832.

Chen T, Zhang S F, Zhou X T, *et al.* First emergency of African swine fever in China and the epidemic analysis[J]. Chin J Vet Sci, 2018, 38(9): 1831 - 1832.

- [2] Gallina L, Scagliarini A, *et al.* Virucidal efficacy of common disinfectants against orf virus[J]. Vet Rec, 2010, 166(23): 725 - 726.
- [3] Mazur - P N, Zmudzki J, Wozniakowski G, *et al.* African swine fever virus - persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission[J]. J Vet Res, 2019, 63(3): 303 - 310.
- [4] Shirai J, Kanno T, Tsuchiya Y, *et al.* Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses[J]. J Vet Med Sci, 2000, 62(1): 85 - 92.
- [5] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2002.
- Department of health legal and supervision. Disinfection technology standard[M]. Beijing: Ministry of Health of the People's Republic of China, 2002.
- [6] Krug P W, Larson C R, Eslami A C, *et al.* Disinfection of foot - and - mouth disease and African swine fever viruses with citric acid and sodium hypochlorite on birch wood carriers[J]. Vet Microbiol, 2012, 156(1/2): 96 - 101.
- [7] Juskiewicz M, Walczak M, Wozniakowski G, *et al.* Characteristics of selected active substances used in disinfectants and their virucidal activity against ASFV[J]. J Vet Res, 2019, 63(1): 17 - 25.

(编辑:李文平)