

**СТАНДАРТЫ КИТАЙСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ В
САНИТАРНОЙ ОТРАСЛИ**

WS/T 775-2021

**СТАНДАРТ ПО ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИИ ОТ
НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 (2019-nCoV) В
ЛАБОРАТОРИИ**

Дата публикации: 20 февраля 2021 г.

Дата вступления в действие: 20 февраля 2021 г.

Опубликовано Государственной комиссией по здравоохранению Китайской Народной
Республики

Оглавление

Предисловие.....	II
1. Область применения.....	1
2. Нормативные ссылки.....	1
3. Термины и определения.....	1
4. Основные требования.....	1
5. Методика испытаний по инаktivации вируса.....	2
6. Оценка результатов.....	5
7. Особые замечания.....	6

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящий стандарт разработан в соответствии с положениями стандарта GB/T 1.1-2020.

Настоящий стандарт был разработан: Центром по контролю и профилактике заболеваний провинции Цзянсу, Национальным институтом санитарного состояния окружающей среды Китайского центра по контролю и профилактике заболеваний, Центром по контролю и профилактике заболеваний г. Сучжоу.

Основные составители настоящего стандарта: Сюй Янь, У Сяосун, Го Силян, Ван Лин, Цуй Луньбяо, Чэнь Инь, Шэнь Цзинь, Ван Вэй, Чу Хунлянь, Фань Цзинцзин, Сунь Хуэйхуэй, Шэнь Имин, Чи Ин, Ли Фан, Ян Хайбин.

СТАНДАРТ ПО ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИИ ОТ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 (2019-nCoV) В ЛАБОРАТОРИИ

1. Область применения

Настоящий стандарт регламентирует основные требования к дезинфекционным агентам для оценки эффективности дезинфекции от COVID-19 в лаборатории, методики испытаний по инаktivации вируса, оценку результатов, а также особые замечания.

Настоящий стандарт применяется для контроля и оценки эффективности дезинфекции от COVID-19 в лаборатории.

2. Нормативные ссылки

Нижеследующие документы, применяемые в настоящем стандарте, являются неотъемлемой частью настоящего стандарта. Для датированных нормативных документов в настоящем стандарте применяются только их версии с указанной датой. Для недатированных нормативных документов к настоящему стандарту применяются их последние версии (включая все изменения).

Технический регламент по дезинфекции (в редакции от 2002 года) Министерство здравоохранения (Опубликовано под контролем Департамента юридического контроля Министерства здравоохранения (2002) № 282)

3. Термины и определения

В настоящем стандарте используются следующие термины и определения.

3.1 Низкотемпературная дезинфекция

Дезинфекция предметов и окружающей среды при температуре ниже 0°C. При низкотемпературной дезинфекции необходимо использовать дезинфекционные агенты, чья эффективность при указанной температуре доказана.

4. Основные требования

4.1 Требования к лаборатории и персоналу

Испытания эффективности дезинфекции от COVID-19 должны проводиться в лабораториях BSL-3, получивших аккредитацию по культивированию COVID-19 и проведению соответствующих испытаний; в то же время, сотрудники лаборатории, осуществляющие оценку эффективности дезинфекции от COVID-19, должны обладать опытом работы в лаборатории в области дезинфекции и вирусологии; сотрудники в лаборатории BSL-3 должны пройти обучение и аттестацию по биологической безопасности, иметь квалификацию и допуск в лабораторию BSL-3.

4.2 Требования к испытанию

4.2.1 Лабораторные испытания делятся на испытания по инаktivации вируса суспензионным методом и испытания по инаktivации вируса с помощью переносчика. Если в основе лабораторного испытания используется

инактивация вируса суспензионным методом, то для дезинфицирующих средств и оборудования, непригодного для оценки испытания инаktivации вируса суспензионным методом, например, для лабораторных испытаний вязких дезинфицирующих средств, дезинфицирующих средств, в которых используется базовый раствор, инфракрасного и прочего дезинфицирующего оборудования можно использовать испытание по инаktivации вируса с помощью переносчика.

- 4.2.2 При испытании по инаktivации вируса суспензионным методом органическим интерферирующим веществом является бычий сывороточный альбумин. В отношении дезинфицирующих средств для неочищенных или загрязненных объектов дезинфекции, концентрация бычьего сывороточного альбумина составляет 3,0%; в отношении дезинфицирующих средств для очищенных или относительно чистых объектов дезинфекции, концентрация бычьего сывороточного альбумина составляет 0,3%; в отношении дезинфицирующих средств для очень чистых объектов дезинфекции или объектов дезинфекции, прошедших тщательную очистку, не нужно использовать органическое интерферирующее вещество. Испытание можно начать при тепловом равновесии ($20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) растворов, вирусных векторов, с которыми контактирует вирус. При испытании в лаборатории инаktivации вируса с помощью переносчика используется переносчик с соответствующим титром питательной среды вируса.
- 4.2.3 При оценке эффективности дезинфекционного агента низкотемпературной дезинфекции необходимо подтвердить эффективность дезинфекции при установленных температурных условиях, обычно используется векторный метод. Испытание проводится после того, как дезинфицирующее средство и вирусные векторы будут находиться в тепловом равновесии при низкой температуре как минимум 30 мин, дальнейшая последовательность испытания такая же, как и при нормальной температуре ($20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 4.2.4 Испытание повторить 3 раза, последующие испытания проводятся поочередно. Необходимые приборы и реактивы должны быть заново приготовлены и простерилизованы во избежание системных погрешностей.

5. Методика испытаний по инаktivации вируса

5.1 Материалы для испытаний

5.1.1 Вирусы и клетки для испытаний

Вирусом для испытаний является культура COVID-19, разделенная на порции для хранения и определения титра вируса, клеточной линией являются клетки почки зеленой африканской мартышки (Vero-E6) или прочие клеточные линии, подходящие для размножения или культивирования вируса COVID-19.

5.1.2 Органическое интерферирующее вещество

Бычий сывороточный альбумин

5.1.3 Реактивы

Дезинфекционный агент, нейтрализующее средство, буфер для диссоциации клеток, поддерживающая среда и культуральная жидкость.

5.1.4 Приборы

СО₂-инкубатор, инверсионный микроскоп, холодильник, водяная баня, бокс биологической безопасности 2 класса или выше.

5.1.5 Расходные материалы

Стерильный наконечник для пипетки с фильтром, аспирационная трубка, центрифужная пробирка, криогенная пробирка, пробирка, многолуночный культуральный планшет, одноканальная пипетка, многоканальная пипетка.

5.1.6 Переносчик

Можно выбрать лоскут, стеклянную пластинку, пластинку из нержавеющей стали.

5.2 Подготовка клеток

В комнате культивирования осуществляется рутинное субкультивирование клеток Vero-E6 или прочих клеток, используемых при испытании, поместить в СО₂-инкубатор (36°C±1°C, 5%±1% углекислого газа) и культивировать до мономолекулярного слоя.

5.3 Подготовка вирусной суспензии

Извлечь вирус COVID-19, который хранился при температуре -80°C, после размораживания при комнатной температуре, смешать с органическим интерферирующим веществом в установленной концентрации для использования в качестве вирусной суспензии при испытании дезинфицирующих средств на инактивацию вирусов.

5.4 Подготовка переносчика

5.4.1 Необходимо подобрать материал в качестве переносчика, соответствующий объекту дезинфекции. Часто используемыми материалами являются лоскут, стеклянная пластинка, пластинка из нержавеющей стали, в качестве металлического переносчика обычно используют металлическую пластинку с диаметром окружности 12 мм (толщина 0,5 мм), переносчики из прочих материалов обычно квадратной формы размером 10x10 мм, для дезинфекционных агентов особого назначения можно использовать переносчики из других совместимых материалов.

5.4.2 До загрязнения переносчика вирусом необходимо провести обезжиривание. Процесс обезжиривания должен строго выполняться в соответствии с нижеследующими этапами:

- a) переносчик поместить в воду с моющим средством и кипятить 30 мин;
- b) промыть в водопроводной воде;
- c) прокипятить в дистиллированной воде в течение 10 мин;
- d) промывать в дистиллированной воде до среднего уровня рН;
- e) высушить, держать наготове.

5.4.3 Подвергнуть переносчик горячей сушке после стерилизации насыщенным паром под давлением, перед испытанием нанести вирусную суспензию капельным методом.

5.4.4 Логарифмическое значение титра вируса на загрязненном переносчике должно составлять ≥ 4.0 .

5.5 Контрольные испытания нейтрализующего средства

5.5.1 Принцип расчета

Под контрольными испытаниями подразумевается определение пригодности выбранного нейтрализатора для планируемого испытания по инаktivации вируса методом загрязнения клетками. Контрольные испытания нейтрализующего средства включают в себя пробные испытания и официальные испытания, через пробные испытания определяется, оказывают ли влияние дезинфицирующее средство, нейтрализующий продукт и нейтрализующее средство на рост клеток; через комплексный анализ результатов всех групп испытаний определяется, осуществляет ли нейтрализующее средство удовлетворительную нейтрализацию проверяемых дезинфицирующих средств, оказывает ли оно вред или отрицательное влияние на испытуемый вирус или клеточные линии; концентрация отравляющих веществ дезинфицирующего средства при испытании нейтрализации должна быть максимальной согласно официальным испытаниям дезинфекции, минимальное время действия должно быть не менее 30 сек. Испытание повторить 3 раза.

5.5.2 Подгруппы испытания

5.5.2.1 Подгруппы пробного испытания

При испытании инаktivации вируса методом загрязнения клетками необходимо провести пробное испытание каждой нижеуказанной группы, используемой при контрольных испытаниях нейтрализующего средства. Если нейтрализующее средство и нейтрализующий продукт не оказывают влияния на рост клеток, тогда можно проводить официальные испытания.

а) нейтрализующее средство + клетки → культивирование: наблюдать, оказывает ли используемое нейтрализующее средство влияние на рост клеток.

б) (дезинфицирующее средство + нейтрализующее средство) + клетки → культивирование: наблюдать, оказывает ли раствор нейтрализующего продукта влияние на рост клеток.

с) дезинфицирующее средство + клетки → культивирование: наблюдать, оказывает ли дезинфицирующее средство влияние на рост клеток.

После определения, что нейтрализующее средство и нейтрализующий продукт не оказывают влияния на рост клеток, можно проводить официальные испытания.

5.5.2.2 Подгруппы официального испытания

а) нейтрализующее средство + вирусная суспензия/переносчик вируса → посев культуры клеток: наблюдать, оказывает ли нейтрализующее средство ингибирующий эффект на вирус.

б) (дезинфицирующее средство/переносчик дезинфицирующего средства + нейтрализующее средство) + вирусная суспензия/переносчик вируса → посев культуры клеток: наблюдать, оказывают ли нейтрализующий продукт или не полностью нейтрализованное оставшееся дезинфицирующее средство ингибирующий эффект на вирус, или есть ли препятствия для методики испытаний.

с) вирусная суспензия/переносчик вируса → посев культуры клеток: наблюдать, есть ли цитопатическое действие у вируса, а также является ли логарифмическое значение титра данной группы вирусов значением положительного контроля.

д) клетки, в которые не был инокулирован вирус, → культивирование: наблюдать, является ли рост клеток нормальным.

5.5.3 Последовательность процедуры

5.5.3.1 Контрольные испытания нейтрализующего средства суспензионным методом

а) Группа 1. В системе испытаний проводятся испытания вируса и нейтрализующего средства (объемное соотношение 1:4). Взять 0,2 мл вирусной суспензии и поместить в пробирку, разместить при температуре $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 5 минут, взять 0,8 мл нейтрализующего средства, равномерно смешать. Время воздействия 10 минут, провести десятикратное серийное разведение поддерживающей среды, взять 100 μL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. Культивировать 3-4 дня в CO_2 -инкубаторе ($36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ углекислого газа).

б) Группа 2. В системе испытаний проводятся испытания вируса и нейтрализующего продукта (объемное соотношение 1:4). Взять 0,2 мл вирусной суспензии и поместить в пробирку, разместить при температуре $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 5 минут, взять 0,8 мл нейтрализующего продукта, равномерно смешать. Время воздействия 10 минут, провести десятикратное серийное разведение поддерживающей среды, взять 100 μL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. Культивировать 3-4 дня в CO_2 -инкубаторе ($36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ углекислого газа).

с) Группа 3. В системе испытаний проводятся испытания вируса и поддерживающей среды (объемное соотношение 1:4). Взять 0,2 мл вирусной суспензии и поместить в пробирку, разместить при температуре $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 5 минут, взять 0,8 мл поддерживающей среды, равномерно смешать. Время воздействия 10 минут, провести десятикратное серийное разведение поддерживающей среды, взять 100 μL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. Культивировать 3-4 дня в CO_2 -инкубаторе ($36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ углекислого газа).

д) Группа 4. К клеткам, используемые в испытании, добавить поддерживающую среду, поместить в CO_2 -инкубатор ($36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ углекислого газа) для культивирования.

5.5.3.2 Контрольные испытания нейтрализующего средства с помощью переносчика

а) Группа 1. Переносчик вируса разместить при температуре $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 5 минут, погрузить в 1,0 мл нейтрализующего средства, время воздействия 10 минут. Полностью очистить, провести десятикратное серийное разведение поддерживающей среды, взять 100 μL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным

слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. Культивировать 3-4 дня в CO₂-инкубаторе (36°C±1°C, 5%±1% углекислого газа).

б) Группа 2. Переносчик вируса разместить при температуре 20°C±1°C на 5 минут, погрузить в 1,0 мл раствора нейтрализующего продукта (переносчик с дезинфицирующим средством + нейтрализующее средство, время воздействия 10 минут), равномерно смешать. Полностью очистить, провести десятикратное серийное разведение поддерживающей среды, взять 100 µL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. Культивировать 3-4 дня в CO₂-инкубаторе (36°C±1°C, 5%±1% углекислого газа).

с) Группа 3. Переносчик вируса разместить при температуре 20°C±1°C на 5 минут, погрузить в 1,0 мл поддерживающей среды, полностью очистить, провести десятикратное серийное разведение поддерживающей среды, взять 100 µL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. Культивировать 3-4 дня в CO₂-инкубаторе (36°C±1°C, 5%±1% углекислого газа).

д) Группа 4. К клеткам, используемые в испытании, добавить поддерживающую среду, поместить в CO₂-инкубатор (36°C±1°C, 5%±1% углекислого газа) для культивирования.

5.5.3.3 Оценка результатов

Если результаты испытания полностью соответствуют нижеследующим условиям, то все испытываемые нейтрализующие средства можно признать удовлетворительными:

- а) рост вируса из группы 1, 2, 3 очень близок к изначальному количеству посевного материала;
- б) рост клеток из группы 4 нормальный;
- с) при максимальной концентрации нейтрализующее средство или нейтрализующий продукт не оказывают влияние на рост клеток;
- д) 3 последовательных испытания получили удовлетворительную оценку.

5.6 Испытания по инаktivации вируса

5.6.1 Принцип испытания

Методом загрязнения клеток определить количество вируса в образце до и после воздействия дезинфицирующего агента (или контрольной группы и испытываемой группы). Цитопатическое действие является определяющим показателем, определить цитопатическое действие для каждой группы вирусов, наблюдать за эффектом дезинфекционного агента по инаktivации COVID-19.

5.6.2 Испытания по инаktivации вируса суспензионным методом

5.6.2.1 Последовательность процедуры

- а) Взять анализируемое дезинфицирующее средство, разбавить в стерилизованной жесткой воде в 1,25 раза до необходимой концентрации, держать наготове в водяной бане при температуре 20°C±1°C.
- б) Приготовление вирусной суспензии: извлечь вирус COVID-19, который хранился при температуре -80°C, после размораживания при

комнатной температуре, смешать с органический интерферирующим веществом в пропорции 1:1 для использования в качестве вирусной суспензии при испытании дезинфицирующих средств на инактивацию вирусов.

с) Испытание на дезинфекцию: взять 1 дозу вышеуказанной вирусной суспензии и добавить 4 дозы анализируемого дезинфицирующего средства, немедленно смешать и записать время. Оставить на определенное время, сразу же взять 0,1 мл, добавить 0,9 мл нейтрализующего средства, удовлетворительно прошедшего контрольные испытания, и смешать; или провести обработку методом выведения лекарственных веществ, удовлетворительно прошедшего контрольные испытания.

д) Испытание контрольной группы: группой положительного контроля является вирусная контрольная группа, наблюдать, является ли рост вируса положительным, достиг ли титр вируса требований испытания; для группы отрицательного контроля используется поддерживающая среда в качестве отрицательного контроля, наблюдать, есть ли загрязнение, является ли рост клеток положительным.

е) Для каждой вышеуказанной группы провести измерение титра вируса методом конечного разведения, соответственно.

ф) Метод конечного разведения: провести десятикратное серийное разведение образца, ожидающего титрования, используя поддерживающую среду, взять 100 μL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. При температуре $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ поместить на 1-2 часа, вытащить культуральный планшет, сменить поддерживающую среду. Культивировать 3-4 дня в CO_2 -инкубаторе ($36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ углекислого газа), под микроскопом наблюдать состояние роста клеток, записать цитопатическое действие.

5.6.2.2 Оценка результатов

Если результаты испытания полностью соответствуют нижеследующим условиям, то их можно признать удовлетворительными:

- а) Рост клеток группы отрицательного контроля нормальный;
- б) Логарифмическое значение титра вируса группы положительного контроля должно составлять ≥ 5.0 .
- с) Клетки группы испытаний по дезинфекции без патологических изменений, рост клеток такой же, как и у группы отрицательного контроля.

5.6.3 Испытания по инактивации вируса с помощью переносчика

5.6.3.1 Последовательность процедуры

- а) Взять анализируемое дезинфицирующее средство, держать наготове в водяной бане при температуре $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- б) Подготовка переносчика: взять стерилизованный переносчик, нанести вирус COVID-19 капельным методом, просушить и держать наготове.

с) Испытание на дезинфекцию: взять переносчик вируса и поместить в дезинфекционный агент, оставить на определенное время, вытащить и поместить в 0,1 мл нейтрализующего средства, удовлетворительно прошедшего контрольные испытания, или элюиционного раствора, время действия 10 минут, смешать и очистить. Переносчик должен быть расположен в трудных местах для инактивации вируса в дезинфекционном оборудовании, точную методику см. в «Техническом регламенте по дезинфекции».

д) Испытание контрольной группы: группой положительного контроля является вирусная контрольная группа, наблюдать, является ли рост вируса положительным, достиг ли титр вируса требований испытания; для группы отрицательного контроля используется поддерживающая среда в качестве отрицательного контроля, наблюдать, есть ли загрязнение, является ли рост клеток положительным.

е) Для каждой вышеуказанной группы провести измерение титра вируса методом конечного разведения, соответственно.

ф) Метод конечного разведения: провести десятикратное серийное разведение образца, ожидающего титрования, используя поддерживающую среду, взять 100 μL образца, осуществить посев на культуральный планшет с мономолекулярным слоем, каждый титр посеять в 4 отверстия. При температуре $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ поместить на 1-2 часа, вытащить культуральный планшет, сменить поддерживающую среду. Культивировать 3-4 дня в CO_2 -инкубаторе ($36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ углекислого газа), под микроскопом наблюдать состояние роста клеток, записать цитопатическое действие.

5.6.3.2 Оценка результатов

Если результаты испытания полностью соответствуют нижеследующим условиям, то их можно признать удовлетворительными:

- а) Рост клеток группы отрицательного контроля нормальный;
- б) Логарифмическое значение титра вируса группы положительного контроля должно составлять ≥ 4.0 .
- с) Клетки группы испытаний по дезинфекции без патологических изменений, рост клеток такой же, как и у группы отрицательного контроля.

6. Оценка результатов

Дезинфицирующее действие признается удовлетворительным, если дезинфекционные агенты одновременно соответствуют пунктам а и б, указанным ниже:

- а) контрольные испытания нейтрализующего средства, которое устраняет действие оставшегося дезинфицирующего средства, удовлетворительные;
- б) при каждом испытании инактивации вируса суспензионным методом осуществляется эффективная инактивация COVID-19, логарифмическое значение титра вируса группы положительного контроля должно составлять ≥ 5.0 или при каждом испытании инактивации вируса с помощью переносчика осуществляется

эффективная инактивация COVID-19, логарифмическое значение титра вируса группы положительного контроля должно составлять ≥ 4.0 .

7. Особые замечания

- 7.1 Сотрудники лаборатории должны соблюдать правила индивидуальной защиты в соответствии с требованиями регламента по эксплуатации индивидуальной защиты в лабораториях BSL-3. Сотрудникам, участвующим в испытаниях, рекомендуется сделать вакцину от COVID-19.
- 7.2 Операции, связанные с живым вирусом COVID-19, должны выполняться строго в соответствии с надлежащим регламентом биологической безопасности в лабораториях BSL-3.
- 7.3 Перед использованием стерилизованных материалов необходимо проверить цельность их упаковки, при наличии повреждений такие материалы нельзя использовать.
- 7.4 Питательные культуры для клеток и реактивы, используемые в испытаниях по дезинфекции, должны быть стерильными.
- 7.5 Операции в лабораториях, связанные с живым вирусом COVID-19, должны выполняться в боксе биологической безопасности лаборатории BSL-3. Если в процессе испытаний произошли такие нештатные ситуации, как утечка, необходимо принять меры безопасности строго в соответствии с регламентом по чрезвычайным мерам при нештатных ситуациях в лаборатории BSL-3.
- 7.6 Лабораторные отходы должны быть утилизированы в соответствии с надлежащим регламентом по утилизации отходов.