

ICS 13.340.30

分类号: C48

# 团体标准

T/CIAA XXX—202X

## 抗病毒口罩

Antiviral mask

(征求意见稿)

2020.9.6

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中关村汇智抗菌新材料产业技术创新联盟 发布

## 前 言

本标准按照GB/T1.1-2020给出的规则起草。

本标准由提出。

本标准由中关村汇智抗菌新材料产业技术创新联盟归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

# 抗病毒口罩

## 1 范围

本文件规定了抗病毒口罩的术语和定义、技术要求、试验方法、检验规则、包装、标志、运输和贮存等内容。

本文件适用于具有抗病毒功能的口罩。其他相关产品可以参考本标准执行。

本标准不适用于3周岁及以下的婴幼儿口罩。

## 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。

GB 15979 一次性使用卫生用品卫生标准

GB/T 16866.5 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验

GB/T 16886.10-2017 医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与皮肤致敏试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料

GB/T 26517 化妆品中二十四种防腐剂的测定 高效液相色谱法

YY/T 1497 医用防护口罩材料病毒过滤效率评价测试方法 Phi-X174噬菌体测试方法

ISO 18184 纺织品—纺织品抗病毒活性测定

《消毒技术规范》（2002年版）

《化妆品安全技术规范》（2015年版）

T/CIAA 003-2020 抗菌口罩

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**病毒 virus**

没有细胞结构、只能在宿主细胞内进行复制的微生物或遗传单元，通常由蛋白质和一种类型的核酸（DNA或RNA）组成。

### 3.2

**抗病毒 antiviral**

采用化学或物理方法灭活病毒的过程。

### 3.3

## 抗病毒口罩 antiviral mask

在现有的口罩的基础上赋予抗病毒功能的口罩。

### 4 技术要求

#### 4.1 一般要求

抗病毒口罩的质量及防护效果应符合其所属口罩类别的相应国家法律法规和标准的规定。

#### 4.2 安全性卫生要求

4.2.1 抗病毒口罩的安全性卫生要求应符合表1要求。

4.2.2 多次完整皮肤刺激试验、皮肤变态反应试验或致超敏试验可以用抗病毒部位或抗病毒材料（抗病毒剂）进行试验，急性经口毒性试验和急性吸入毒性试验用抗病毒剂（或浸提液）进行试验。

表1 安全性卫生要求

项目名称	指标要求
多次完整皮肤刺激试验	原发刺激计分不大于0.4
皮肤变态反应试验或皮肤致敏试验	未见皮肤变态反应或0级
急性经口毒性试验	实际无毒
急性吸入毒性试验	实际无毒

4.2.3 抗病毒部位不宜放在贴合面颊层，若设计上必须，则需进行细胞毒性试验，且细胞毒性不大于1级。

#### 4.3 抗病毒性能

4.3.1 抗病毒口罩的抗病毒活性值（H1N1和EV71）应达到1.0（病毒灭活率90%）或以上。根据产品特殊用途，可增加其他病毒。

4.3.2 抗病毒稳定性能在室温下至少须保持一年，并与产品的有效期相同。

### 5 试验方法

#### 5.1 一般要求试验

抗病毒口罩的质量及防护效果按相应标准规定的方法执行。

#### 5.2 安全性卫生要求试验

##### 5.2.1 多次完整皮肤刺激试验

按照16886.10-2017中6.3规定的方法执行。

##### 5.2.2 皮肤变态反应试验

按照《消毒技术规范》（2002年版）中2.3.6规定的方法执行。

##### 5.2.3 皮肤致敏试验

按照GB/T 16886.10-2017中7.6规定的方法执行。

#### 5.2.4 急性经口毒性试验

使用抗病毒剂或按GB/T 16886.12中10.3.1 a)规定的方法制备口罩浸提液进行测试,按《消毒技术规范》(2002年版)中2.3.1规定的方法执行。

#### 5.2.5 急性吸入毒性测试

使用抗病毒剂或按GB/T 16886.12中10.3.1 a)规定的方法制备口罩浸提液进行测试,按照《消毒技术规范》(2002年版)2.3.2规定的方法执行。

#### 5.2.6 细胞毒性试验

按照GB/T 16886.5规定的方法执行。

#### 5.3 抗病毒性能试验

用口罩抗病毒部位或抗病毒材料按照附录A或ISO 18184规定执行。

#### 5.4 抗病毒稳定性试验

##### 5.4.1 测试方法

按照GB 15979规定进行自然留样或加速试验(将原包装样品置54~57℃恒温箱内14天或37~40℃恒温箱内3个月,保持相对湿度>75%),抗病毒性能试验按5.3执行。

##### 5.4.2 评价标准

产品经自然留样,其抗病毒活性值达到4.3.1规定的标准值,产品的抗病毒作用在室温下的保持时间即为自然留样时间。

产品经54℃加速试验,其抗病毒活性值达到4.3.1规定的标准值,产品的抗病毒作用在室温下至少保持一年。

产品经37℃加速试验,其抗病毒活性值达到4.3.1规定的标准值,产品的抗病毒作用在室温下至少保持二年。

### 6 检验规则

#### 6.1 检验分类

产品检验分出厂检验和型式检验。

#### 6.2 出厂检验

6.2.1 每批产品须经制造厂检验部门检验合格后方可出厂,应附有产品质量合格证明。

6.2.2 出厂检验项目为基本要求和外观。

6.2.3 出厂检验规则按相应产品标准规定执行。

#### 6.3 型式检验

6.3.1 型式检验项目为本标准规定的全部项目。在有下列情况之一时,应进行型式检验:

- a) 首次上市时;
- b) 抗病毒材料或配方发生变更时;

- c) 生产工艺流程有变化时;
- d) 转厂迁址后恢复生产时。

6.3.2 型式检验规则按相应产品标准规定执行。

## 7 标志、包装、运输 贮存

7.1 标志、包装、运输、贮存按相关规定执行。

7.2 抗病毒口罩的标志至少应注明如下信息：

- 1) 抗病毒口罩;
  - 2) 抗病毒部位;
  - 3) 抗病毒性能指标;
  - 4) 执行的产品标准。
-

## 附录 A (规范性附录)

### 抗病毒性能测试方法

警告—使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验，本标准并未指出所有可能的安全问题，使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。实验室应满足 GB 19489 要求，试验应在 BSL-2 或以上安全级别的生物安全实验室中操作，并确保实验室生物安全，实验过程中产生的废弃物，按生物危害废弃物处理，以保证操作人员的安全。

#### A.1 试剂和材料

此处使用的试剂和材料需满足生物学实验要求，即对病毒及宿主细胞无毒无害。实验室可以选用按照下列配方制备试剂，也可以按照所操作的病毒及宿主的情况自行购买适用的等效商品化试剂。

##### A.1.1 水

所用的水应为符合 GB/T 6682 规定的三级水。

##### A.1.2 最低必需培养基 (EMEM)

在市场上可买到。使用前

##### A.1.3 7.5% NaHCO<sub>3</sub>溶液

A.1.4 NaHCO <sub>3</sub>	75 g
无菌水	1000 mL

溶解分装备用。

##### A.1.5 福尔马林溶液

37%的甲醛溶液	100 mL
无菌水	900 mL

混匀备用。

##### A.1.6 亚甲基蓝溶液

亚甲基蓝	0.375 g
1mol/L NaOH溶液	62.5 μL
三级水	1000 mL

上述成分溶解并搅拌均匀。

##### A.1.7 灭活胎牛血清：FBS

把低温贮藏的胎牛血清放37℃水浴解冻后置56℃水浴30 min灭活，分装并于 -20℃冰箱里保存。

使用前，37℃水浴融化。

#### A. 1. 8 生长培养基

硫酸卡那霉素	60 mg
最低必需培养基	9.53 g
三级水定容至	1000 mL
用0.22μm的滤器除菌	
7.5% NaHCO <sub>3</sub>	15 mL
灭活的胎牛血清	100 mL
混匀使用。	

#### A. 1. 9 维持培养基

硫酸卡那霉素	60 mg
最低必需培养基	9.53 g
三级水定容至	1000 mL
用0.22μm的滤器除菌	
7.5% NaHCO <sub>3</sub>	15 mL
混匀使用。	

#### A. 1. 10 双倍浓度的维持培养基

硫酸卡那霉素	120 mg
最低必需培养基	19.06 g
三级水定容至	1000 mL
用0.22μm的滤器除菌	

#### A. 1. 11 0.01 mol/L PBS (-)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.9 g
磷酸二氢钾	0.2 g
三级水定容至	1000 mL
分装后，121℃、103 kPa、15 min高压灭菌。	

#### A. 1. 12 从牛胰腺分离的胰蛋白酶和PBS溶液 (TPCK)

##### A. 1. 12. 1 胰蛋白酶母液

0.01 mol/L PBS溶液	100 mL
从牛胰腺分离到的胰蛋白酶	1.0 g
溶解并用振荡器震荡2 h混匀，用0.22μm滤器过滤除菌。分装后置-80℃保存。	

##### A. 1. 12. 2 TPCK

0.01 mol/L PBS (-)	9 mL
胰蛋白酶	1 mL
溶解混匀，分装好于-20℃保存。使用前，37℃水浴溶解。	

## A. 1. 13 胰蛋白酶-EDTA溶液

0.01 mol/L PBS (-)	1000 mL
胰蛋白酶	2.5 g
硫酸卡那霉素	0.1 g
硫酸链霉素	0.1 g
两性霉素B	2 mg
EDTA	0.014 mol

溶解混匀后，用0.22 $\mu$ m滤器过滤除菌。将溶液分装并保存在低于-20℃的冰箱，使用之前，在37℃水浴锅溶解。

注：胰蛋白酶EDTA溶液可以购买。使用前确认好产品的成分。

## A. 1. 14 DEAE-葡聚糖溶液

DEAE-葡聚糖	20 g
三级水	1000 mL

溶解后，使用0.22 $\mu$ m滤器过滤除菌。

## A. 1. 15 琼脂培养基

分别配制溶液A和溶液B，使用前等体积比混匀。

## A. 1. 15. 1 溶液A

双浓度的维持培养基	1000 mL
DEAE-葡聚糖溶液	10 mL
7.5% Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> 溶液	40 mL
胰酶	3.0 mL (仅对流感病毒)

使用前先置37℃水浴。

## A. 1. 15. 2 溶液B

细胞培养琼脂	15 g
三级水	1000ml

用高压锅(7.1) 121℃、103 kPa、15 min高压灭菌。  
使用前先置50℃水浴。

## A. 1. 16 含胰蛋白酶的维持培养基

维持培养基	1000 mL
不含 EDTA 的胰蛋白酶溶液	3 mL

使用前混匀备用。

## A. 1. 17 SCDLP液体培养基

水	1 000 mL;
酪蛋白胨	17.0 g;
大豆蛋白胨	3.0 g;
NaCl	5.0 g;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g;
葡萄糖	2.5 g;

卵磷脂 1.0 g。

上述物质混合溶解，然后添加非离子表面活性剂（吐温80）7.0 g。

## A.2 仪器设备

### A.2.1 二氧化碳培养箱

控温范围 室温~50℃，温度准确度1℃，可维持5%的二氧化碳浓度。

### A.2.2 高压蒸汽灭菌锅

可以满足温度(121±2)℃和压力(103±5)kPa下的操作。

### A.2.3 干热灭菌箱

A.2.4 可以满足温度(180±2)℃和(160±2)℃下的操作。

### A.2.5 天平

A.2.6 可用量程范围100g±0.1 g 至0.01 g ±0.0001 g之间。

### A.2.7 离心机

控速范围 500 r/min~10000 r/min，转速准确度1%。

### A.2.8 生物安全柜

应为符合YY 0569规定的II级及以上生物安全柜。

### A.2.9 倒置显微镜

用于培养细胞的观察。

### A.2.10 冰箱

控温范围2℃~8℃，-(20±2)℃，-(80±2)℃。

### A.2.11 可调移液器枪

量程：10μL~100μL，100μL~1000μL，1 mL~5 mL。

### A.2.12 水浴锅

控温范围：25℃~55℃，温度准确度1℃。

### A.2.13 细胞培养板

经γ-射线灭菌的6孔及96孔细胞培养板。

### A.2.14 细胞瓶

经γ-射线灭菌后具有一定培养面积和带滤膜瓶盖的细胞培养瓶，瓶盖可拧紧。用于贴壁细胞培养。瓶盖的滤膜用0.2μm滤膜来交换空气。

### A.2.15 生化培养箱

控温范围20℃~50℃，温度准确度1℃

## A.2.16 培养皿、试管、锥形瓶等其它微生物学试验耗材

微生物培养和实验的各个规格。

## A.3 试验方法

### A.3.1 样品制备与试验方法

取样品的抗病毒处理面作为测试面。

若样品吸水，则称取检测样品 $0.40g \pm 0.05g$ ，剪成约每片 $20mm \times 20mm$ 大小，放入样品瓶中。共制备9个对对照样，6个抗病毒检测样品。若样品不吸水，则将样品剪成尺寸为 $50mm \times 50mm$ 的片（如果形制不适合，则剪成相应面积的测试样片），共制备12个对对照样，6个抗病毒检测样品。试验前抗病毒面向上，采取适合的消毒方法进行消毒。

注1：吸水性样品对对照样可以为未处理的检测样品布或100%棉布。检测前，使用自来水机洗10次（洗涤程序为用不含清洁剂、荧光、漂白剂的洗涤剂在60℃洗涤10min，然后漂洗2次，每次5min）。不吸水的样品对对照样可以采用同等规格的覆盖膜制成。

注2：吸收性样品试验接种时采用吸收法，即直接接种病毒悬液至样品上作用，作用结束至规定时间后，加入洗脱液后，用涡旋器震荡5次，每次5s，得到洗脱液；不吸水的样品采用贴膜法，即将病毒悬液接种至样品上后，覆膜使分散均匀，作用至规定时间后，加入洗脱液后，使用移液器反复吹打4次以上，得到洗脱液。使用病毒回收液进行预实验及病毒计数。洗脱液一般可以使用SCDLP，或其它合适的具有中和成分的液体。

### A.3.2 试验病毒

测试用病毒见表A.1.

表A.1 测试用病毒

病毒种类	流感病毒	肠道病毒
病毒株	甲型流感病毒(H1N1)	EV 71
宿主细胞	MDCK 细胞	Vero 细胞
介质	EMEM 培养基	EMEM 培养基
培养条件	34℃，5% CO <sub>2</sub>	37℃，5% CO <sub>2</sub>
注1：病毒株、细胞应从有相应资质的机构获取。		
注2：其他宿主细胞、培养基经验证后也可使用。		

也可以选择其他病毒进行试验，如甲型流感病毒H3N2、猫杯状病毒、噬菌体等，同时选择相应的病毒宿主细胞及培养条件，并保证整个操作过程满足实验室生物安全要求。

### A.3.3 宿主细胞和病毒悬液的制备

#### A.3.3.1 从低温中复苏宿主细胞

将低温储存的宿主细胞置37℃水浴，使其迅速融化。准备一个新的有通气帽盖的细胞瓶，加入20mL维持培养基，将融化的全部细胞转入细胞瓶中。将细胞瓶放进细胞CO<sub>2</sub>培养箱（37℃±1℃，5% CO<sub>2</sub>），培养（24±2）h，用显微镜观察细胞是否贴壁。若细胞长满，进行下一步操作，若没有，继续放入培养箱培养。

弃掉细胞瓶内剩余的培养基，加入20mL新的生长培养基到细胞瓶中。将细胞瓶放进细胞CO<sub>2</sub>培养箱（37℃±1℃，5% CO<sub>2</sub>），培养（48±2）h。倒置显微镜下观察细胞瓶内细胞，确定细胞是否全部贴壁。若细胞尚未长满，继续培养直至细胞长满。然后，按照宿主细胞传代培养的步骤开始连续传代。

### A.3.3.2 宿主细胞传代培养

弃掉细胞瓶中剩余的培养基，加入5mL PBS缓冲液冲洗长满的单层细胞2次。弃掉PBS，加入0.5mL 胰酶EDTA溶液，覆盖细胞表面。将细胞瓶放入37℃ CO<sub>2</sub>培养箱孵育10min~20min。然后，观察细胞瓶中细胞是否开始脱落，若开始，轻拍细胞瓶边缘使细胞分离。加5mL生长培养基到细胞瓶中，用移液器温和吹打培养基以充分混匀，避免破坏细胞。用移液器吸取1mL细胞悬液到新的含20mL生长培养基的细胞瓶中。可根据需要调整细胞密度及培养基。将细胞瓶放入CO<sub>2</sub>培养箱，37℃培养3~5天直至细胞长满。细胞培养周期可根据实际情况调整。然后，重复宿主细胞传代培养的步骤开始连续传代。

### A.3.3.3 检测病毒的制备

在细胞瓶中准备好宿主细胞。将冷冻的病毒放入（36±1）℃水浴，使其迅速解冻，并将其转移到一个新的试管中，用维持培养基将其稀释到10<sup>3</sup> PFU/mL（或TCID<sub>50</sub>/mL）~10<sup>4</sup>PFU/mL（或TCID<sub>50</sub>/mL）。接种1 mL稀释好的病毒液到细胞瓶中的细胞表面，使其覆盖均匀。将细胞瓶放入CO<sub>2</sub>培养箱，培养1 h使病毒吸附入细胞。补足适量至细胞瓶，并将细胞瓶放入CO<sub>2</sub>培养箱培养1d~3d，增殖病毒，其中流感病毒采用含10%牛胰腺提取胰蛋白酶的维持培养基，EV71采用维持培养基，培养条件见表1。逐日观察细胞病变，判断流感病毒的增殖情况。若细胞已发生3/4病变后，将含有病变细胞及病毒的培养液放入离心管中，于（4±1）℃，1000 g 离心15 min。离心后，取上清，即得到病毒液。按适当体积将病毒液分装，置-（80±2）℃保存。通过蚀斑或TCID<sub>50</sub>方法检测病毒滴度是否超过10<sup>7</sup> PFU/mL（或TCID<sub>50</sub>/mL），若滴度低于10<sup>7</sup> PFU/mL（或TCID<sub>50</sub>/mL），则从头开始重新制备。使用前，将冷冻的病毒放入（36±1）℃水浴，使其迅速解冻。解冻后即即为检测用的病毒悬液，若不立即使用，可暂存于2℃~8℃冰箱。

注：实验室可以根据实验技术能力和经验，选择其它文献报道的有效的病毒繁殖方法。

注：实验室可以根据实验技术能力和经验，选择其它文献报道的有效的病毒繁殖方法。

## A.3.4 预实验

### A.3.4.1 总则

对照实验的目的是确定检测样品洗脱液对样品抗病毒剂的抑制效果。检测样品洗脱液抑制效果是指洗脱后的液体对细胞无毒，也不会降低细胞对病毒的敏感性和可终止样品杀病毒的作用。

### A.3.4.2 通过病毒的敏感性和终止杀病毒的性能实验验证细胞毒性

7.1.1.1 将制备好的3块对照样与3块抗病毒检测样品置于合适的容器中，加适量洗脱液，按病毒接种后洗脱方法进行洗脱，得到洗脱液。以洗脱液接种细胞培养板，观察细胞有无损伤。

注：若无细胞损伤，则进行下一步验证；若发现细胞损伤，洗脱液的成分应该酌情修改或更改，或应增加洗脱液的量。

### A.3.4.3 验证细胞对病毒的敏感性和终止杀病毒的性能

7.1.1.2 将制备好的3块对照样与3块抗病毒检测样品置于容器中，加适量洗脱液，按病毒接种后洗脱方法进行洗脱，得到洗脱液。取5mL洗脱液到新的试管中。加50μl制备好的浓度为（4~6）×10<sup>4</sup> PFU/mL 或 TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒悬液至试管中。25℃放置30min。使用蚀斑法或TCID<sub>50</sub>法确定感染滴度。

### A.3.4.4 验证结果判定

$1g \text{ (PFU/mL 或 } TCID_{50} /mL \text{ 对对照样)} - 1g \text{ (PFU/mL 或 } TCID_{50} /mL \text{ 抗病毒检测样品)} \leq 0.5$

注：若以上结果超过0.5，洗脱液的成分应该酌情修改或更改，或增加洗脱液的量。

若洗脱液的成分发生改变或洗脱液体积增加时，正式的实验中应使用同样的洗脱液。

### A.3.5 正式试验

#### A.3.5.1 病毒接种

实验用病毒悬液的浓度调至 $1 \times 10^7$ PFU ( $TCID_{50}$ ) /mL $\sim 5 \times 10^7$ PFU ( $TCID_{50}$ ) /mL。

吸水性样品接种时，微量移液器量取0.2mL病毒悬液多点点种到样品瓶中的样品上，盖上盖子

不吸水的样品，接种时，微量移液器量取0.2mL病毒悬液滴到每个试样表面。并将制备好的40mm $\times$ 40mm薄膜盖于接种好的病毒悬液上，并向下轻轻压薄膜使病毒悬液向四周扩散，确保病毒悬液不要从薄膜边溢出。在试样接种完并盖上薄膜后，盖上培养皿盖。

#### A.3.5.2 孵育培养

接种后，放在25℃培养箱孵育2 h。培养过程中主要保持培养箱湿度。

注：根据需要，孵育时间可由各方协商后改变，但不能超过24小时。

#### A.3.5.3 接种后立即洗脱

3个对照样品接种病毒后，立即进行回收洗脱，得到0时接触洗脱液。

#### A.3.5.4 孵育后洗脱病毒

样品孵育2 h后，往容器里加入适量洗脱液，以将病毒从样品中洗脱下来。此病毒悬液是抗病毒样品和对照样品孵育后洗脱下来的原始病毒悬液。以原始病毒悬液进行病毒计数。

### A.3.6 病毒的计数

实验室可以根据自身的实验条件和实验技术，选择蚀斑法或 $TCID_{50}$ 法进行病毒的计数。

#### A.3.6.1 噬斑法

##### a) 实验步骤

在6孔细胞培养板的每个孔内培养单层细胞，并用显微镜观察细胞的生长状态。当观察到长满的单层细胞时，弃掉生长培养基。加适量双倍细胞维持培养基洗掉残留的生长培养基，重复洗2次。病毒液原液及每个梯度的稀释液均接种2孔用于测试，接种量0.1mL。如果原液接种到第一个2孔，则接下来的2孔接种1/10稀释液，以此类推。最后一个2孔，接种双倍维持培养基，做阴性对照。把6孔板放入 $CO_2$ 培养箱（ $34^\circ C \pm 1^\circ C$ ，5%  $CO_2$ ）孵育1 h，以便让病毒吸附到细胞上。每隔15 min摇一下细胞板，让病毒悬液充分和细胞接触。取2 mL $\sim$ 3 mL维持培养基加到6孔板上，清洗表面，然后弃掉多余的培养基。加入3 mL琼脂培养基做蚀斑实验，盖上盖子并放室温10min左右让琼脂培养基凝固。待琼脂培养基凝固后，倒置细胞板，放入 $CO_2$ 培养箱中（ $34^\circ C \pm 1^\circ C$ ，5%  $CO_2$ ）培养 2 d $\sim$ 3 d。然后，从培养箱中把细胞板拿出来，放正，添加3 mL的福尔马林溶液以固定细胞，令其在室温下固定至少1 h。弃掉的琼脂培养基，添加3 mL亚甲基蓝溶液，室温下保持15 min对细胞染色。染色完毕，弃掉亚甲基蓝溶液，用水冲洗一下。确认细胞染色。计算斑的数量（白色斑点），取两个孔的平均值。

##### b) PFU 的计算

从接种了不同稀释度病毒液的培养孔计数得到蚀斑的数量(空斑的数量宜在60个以内,超过60个时,空斑的边界将不清晰)。空斑的数量以每个稀释度上两个数据的平均值计。对合适的稀释度上的蚀斑进行计数,其空斑数量如下标准进行:

- 1) 如果不同稀释度中的一个出现了6~60,则取6~60进行计算;
- 2) 如果原液的空斑数<6,则取原液孔上的空斑作为测试的PFU;
- 3) 如果原液的空斑数<1,包括0,则以1计算测试的PFU。
- 4) **TCID<sub>50</sub>法**

在96孔细胞培养板的每个孔内培养单层细胞,并用显微镜观察细胞的生长状态。当观察到长满的单层细胞时,弃掉生长培养基。加0.1 mL双倍细胞维持培养基洗细胞表面,重复洗2次。病毒原液及每个梯度的稀释液均接种8孔用于测试,接种量0.1mL,并以双倍维持培养基做阴性对照。把96孔板放二氧化碳培养箱(34℃±1℃,5% CO<sub>2</sub>) 孵育1 h,以便让病毒吸附到细胞上。之后弃掉96孔板的上清液,取0.1 mL细胞维持培养基,洗板,弃掉多余的细胞维持培养基。加入0.1 mL细胞维持培养基后将96孔板放CO<sub>2</sub>培养箱(34℃±1℃,5% CO<sub>2</sub>)培养7 d。通过倒置显微镜观察细胞病变。确认细胞病变之后用 Behren和Karber方法计算TCID<sub>50</sub>,得到每毫升采样液中的病毒数量(TCID<sub>50</sub>/mL)。

注:培养时间及温度可以随测试病毒的种类进行改变。

### A.3.6.2 测试结果

#### a) 结果有效性判断

本实验中病毒接种液的感染滴度需满足:

- 1) 病毒悬液>10<sup>7</sup> PFU/mL 或 TCID<sub>50</sub>/mL; 或>6.25×10<sup>6</sup> PFU/cm<sup>2</sup>或 TCID<sub>50</sub>/cm<sup>2</sup>;
- 2) 对照布样品的病毒滴度对数减少值≤1.0。

如果孵育时间为24h,其对照样品的病毒滴度对数减少值可小于2.0。

- 3) 空白对照样接种后即时测得的蚀斑数的对数值应满足式(1)的要求:

$$(L_{\max} - L_{\min}) / L_{\text{mean}} \leq 0.2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$L_{\max}$ —试样上最大病毒滴度的常用对数值(以10为底的对数值);

$L_{\min}$ —试样上最小病毒滴度的常用对数值;

$L_{\text{mean}}$ —三个试样平均病毒滴度的常用对数值。

#### b) 抗病毒活性值的计算

使用公式(2)计算抗病毒活性值。

$$Mv = \lg(Va/Vc) = \lg(Va) - \lg(Vc) \quad \dots\dots\dots (2)$$

其中:

$Mv$ —抗病毒活性值;

$\lg(Va)$ —3块对照样接种0h后洗脱的病毒感染滴度对数平均值;

$\lg(Vc)$ —3块被试样接种2h后洗脱的病毒感染滴度对数平均值。

#### c) 病毒灭活率的计算

使用公式(3)计算病毒灭活率。

$$R(\%) = \frac{B-C}{B} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

其中：

R (%)——病毒灭活率 (%)；

B —— 3个空白对照样接种0h后回收的平均滴度值，单位为PFU/cm<sup>2</sup>（或TCID<sub>50</sub>/cm<sup>2</sup>）；

C —— 3个抗病毒试样接种2h后回收的平均滴度值，单位为PFU/cm<sup>2</sup>（或TCID<sub>50</sub>/cm<sup>2</sup>）。