



中华人民共和国国家标准

GB/T 21866—2025

代替 GB/T 21866—2008

涂膜抗病毒活性和抗菌性测定法

Test method for antiviral activity and antimicrobial of paints film

2025-08-01 发布

2026-02-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 前言 | III |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 抗病毒活性试验 | 1 |
| 4.1 概述 | 1 |
| 4.2 实验室要求 | 2 |
| 4.3 设备和材料 | 2 |
| 4.4 试剂和培养基 | 2 |
| 4.5 试验准备 | 4 |
| 4.6 试验程序 | 6 |
| 4.7 病毒感染滴度的计算 | 10 |
| 4.8 抗病毒耐久性试验 | 12 |
| 5 抗菌性能试验 | 12 |
| 5.1 概述 | 12 |
| 5.2 实验室要求 | 12 |
| 5.3 设备和材料 | 12 |
| 5.4 试剂和培养基 | 12 |
| 5.5 试验菌种 | 14 |
| 5.6 试样 | 14 |
| 5.7 试验程序 | 14 |
| 5.8 结果计算和试验有效性 | 16 |
| 5.9 抗菌耐久性试验 | 16 |
| 6 试验报告 | 17 |
| 附录 A (规范性) 多孔膜制备方法 | 18 |
| A.1 打孔器的结构和材质要求 | 18 |
| A.2 多孔膜制备方法 | 19 |
| 附录 B (规范性) EMEM 培养基 | 20 |
| 附录 C (规范性) 涂膜吸水性的判定及试样预处理方法 | 21 |
| C.1 涂膜吸水性的判定 | 21 |
| C.2 涂膜试样预处理方法 | 21 |
| 附录 D (资料性) 病毒感染滴度计算示例 | 22 |
| 参考文献 | 23 |

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 21866—2008《抗菌涂料(漆膜)抗菌性测定法和抗菌效果》，与 GB/T 21866—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了“范围”(见第 1 章,2008 年版的第 1 章)；
- b) 删除了“抑菌”“杀菌”“抗菌涂料”的术语和定义(见 2008 年版的 3.1、3.2 和 3.4)；更改了“抗菌”的术语和定义(见 3.1,2008 年版的 3.3)；增加了“抗病毒”的术语和定义(见 3.2)；
- c) 增加了“抗病毒活性试验”(见第 4 章)；
- d) 更改了“抗菌性能试验”(见第 5 章,2008 年版的第 4 章~第 8 章)；
- e) 删除了“抗菌涂料抗菌效果”(2008 年版的 9.1)；
- f) 将“试验结果记录”更改为“试验报告”，并更改了相应内容(见第 6 章,2008 年版的 9.2)；
- g) 增加了“多孔膜制备方法”(见附录 A)；
- h) 增加了“EMEM 培养基”(见附录 B)；
- i) 增加了“涂膜吸水性的判定及试样预处理方法”(见附录 C)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国石油和化学工业联合会提出。

本文件由全国涂料和颜料标准化技术委员会(SAC/TC 5)归口。

本文件起草单位：广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)、中国建筑材料科学研究总院有限公司、中海油常州涂料化工研究院有限公司、立邦涂料(中国)有限公司、德爱威(中国)有限公司、阿克苏诺贝尔漆油(上海)有限公司、北新嘉宝莉涂料(广东)有限公司、广东迪美生物技术有限公司、国恒信(常州)检测认证技术有限公司、广东巴德富新材料有限公司、上海保立佳化工股份有限公司、福建万安实业集团有限公司、浙江巨元涂料科技有限公司、雅士利涂料(苏州)有限公司、美巢集团股份有限公司、中国国检测试控股集团股份有限公司、惠州市百时达化工有限公司、广东睿智环保科技股份有限公司、新昌县槃古环保科技有限公司、汉宁化学(上海)有限公司、常州市天安特种涂料有限公司、上海建科检验有限公司、华南理工大学、冶建新材料股份有限公司、成都信达高分子材料有限公司、广东省华微检测股份有限公司、洛阳冠银生物科技有限公司、上海工微所科技有限公司。

本文件主要起草人：刘蕊蕊、谢小保、穆志超、彭如群、王静、刘琳、黎玉莲、冀志江、戴俊、潘秀伟、唐玫、蔡正伟、赵春艳、关红艳、袁宏宇、曾庆乐、徐健、史立平、邱显锋、夏斯琴、黄文、王立新、闪晓刚、徐宴华、陈杰、马春风、张皓栋、郝立腾、胡乐晖、高杰、史建群、陈君、赵培静、张玉清、王薇。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 21866—2008；

——本次为第一次修订。

涂膜抗病毒活性和抗菌性测定法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验,本文件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。

1 范围

本文件描述了一种通过比较试样和对照样中的存活病毒数量和/或活菌数来测定涂膜抗病毒活性和/或抗菌性的测试方法。

本文件适用于施涂于建筑和木器表面具有抗病毒和/或抗菌功能的涂膜。

其他用途涂膜抗病毒和/或抗菌性能的测定也可参照使用。

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/T 1727 漆膜一般制备法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 9278 涂料试样状态调节和试验的温湿度

GB/T 19258.1 杀菌用紫外辐射源 第1部分:低气压汞蒸气放电灯

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB 41918 生物安全柜

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌 antimicrobial

采用物理、化学等方法灭活细菌、真菌等微生物和/或抑制细菌、真菌等微生物生长繁殖及其活性的过程。

3.2

抗病毒 antiviral

采用物理、化学等方法灭活病毒或使病毒失去感染性的过程。

4 抗病毒活性试验

4.1 概述

将病毒接种于制备好的试样表面,经接触一定的时间后,通过比较抗病毒试样和对照样中的存活病

毒数量计算抗病毒率和抗病毒活性值,以抗病毒率或抗病毒活性值来表征抗病毒活性。

4.2 实验室要求

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操作,并确保实验室生物安全。

4.3 设备和材料

4.3.1 高压蒸汽灭菌器:温度能保持 (121 ± 2) °C,压力能保持 (103 ± 5) kPa。

4.3.2 电热恒温干燥箱:温度能保持 160 °C~180 °C,波动不超过 ± 2 °C。

4.3.3 天平:精度 0.1 g;精度 0.1 mg。

4.3.4 水浴箱:温度能保持 (37 ± 1) °C、 (50 ± 1) °C、 (56 ± 1) °C和 (60 ± 1) °C。

4.3.5 二氧化碳培养箱:能保持温度 (34 ± 1) °C、 (37 ± 1) °C和 $(5\pm 0.5)\%$ (体积分数)二氧化碳浓度。

4.3.6 冰箱:温度能保持 2 °C~10 °C、 (-20 ± 2) °C和 (-80 ± 2) °C。

4.3.7 过滤器:孔径 0.22 μm 。

4.3.8 倒置显微镜。

4.3.9 pH 计:分度值 0.01。

4.3.10 液氮罐。

4.3.11 培养箱:温度能保持 (25 ± 1) °C。

4.3.12 细胞培养瓶。

4.3.13 细胞培养板:6 孔板或 96 孔板。

4.3.14 离心机:能保持温度 (4 ± 2) °C和离心力 10 000 g。

4.3.15 培养皿:直径 90 mm~100 mm。

4.3.16 覆盖膜:低密度聚乙烯薄膜(密度值为 0.918 g/cm³~0.928 g/cm³),分无孔膜和 144 孔膜(按附录 A 规定的方法制备)两种,标准尺寸为 (40 ± 2) mm \times (40 ± 2) mm、厚度为 0.05 mm~0.10 mm。

4.3.17 微生物实验室用的涡旋器、镊子、量筒、烧瓶、试管、烧杯、离心管、移液器等。

4.4 试剂和培养基

4.4.1 一般规定

除另有规定外,在试验中仅使用化学纯及以上纯度的试剂和符合 GB/T 6682 中三级水要求的蒸馏水或去离子水。

使用的试剂和材料满足生物学实验室要求,即对病毒和宿主细胞无毒无害。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。

4.4.2 无菌水

将水按 10 mL/支分装到无色玻璃试管中,放入高压蒸汽灭菌器(4.3.1)中在 (121 ± 2) °C 条件下灭菌 15 min 后备用。

4.4.3 最低基础培养基(EMEM)

配方应符合附录 B 的规定。使用商品培养基时,若有任何成分缺失,按配方表(见表 B.1)添加。

4.4.4 7.5%碳酸氢钠溶液

将 75 g 碳酸氢钠溶于 925 g 水中制备碳酸氢钠溶液。使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。

制备后如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.5 甲醛溶液

将 100 mL 37% (质量分数) 甲醛溶液加入 900 mL 水中制备甲醛溶液。制备后如不立即使用,置于 20 °C~25 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.6 亚甲基蓝溶液

将 0.375 g 亚甲基蓝和 62.5 μL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液溶于 1 000 mL 水中制备亚甲基蓝溶液。制备后如不立即使用,置于 20 °C~25 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.7 胎牛血清(FBS)

将胎牛血清置于(-20±2) °C 冰箱(4.3.6)保存,使用前将冰冻的胎牛血清置于(37±1) °C 水浴箱(4.3.4)中水浴直至解冻。

如果需要自行进行胎牛血清灭活处理,应遵守水浴箱温度调至(56±1) °C,维持 30 min 灭活原则。

4.4.8 生长培养基

将 60 mg 硫酸卡那霉素和 9.53 g EMEM(4.4.3)溶于 800 mL 水中,溶解并混合均匀再加水至 1 000 mL,混合液使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。然后添加 15 mL 的 7.5% 碳酸氢钠溶液(4.4.4)和 100 mL FBS(4.4.7)充分均匀。配制后如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.9 维持培养基

将 60 mg 硫酸卡那霉素和 9.53 g EMEM(4.4.3)溶于 800 mL 水中,溶解并混合均匀再加水至 1 000 mL,混合液使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。然后添加 15 mL 的 7.5% 碳酸氢钠溶液(4.4.4)充分混匀。制备后如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.10 双倍浓度维持培养基

将 60 mg 硫酸卡那霉素和 19.06 g EMEM(4.4.3)溶于 800 mL 水中,溶解并混合均匀再加水至 1 000 mL,混合液使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。制备后如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.11 磷酸缓冲液(PBS)

将 8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、2.9 g 十二水合磷酸氢二钠和 0.2 g 磷酸二氢钾溶于水中,溶解并混合均匀再加水至 1 000 mL。用高压蒸汽灭菌器(4.3.1)灭菌。制备后如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.12 牛胰蛋白酶 PBS 溶液

将 1.0 g 牛胰蛋白酶溶于 100 mL PBS(4.4.11)中,溶解并充分混匀 2 h,混合液使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。如不立即使用,则分装于试管后放在(-80±2) °C 冰箱(4.3.6)里保藏。使用前,于(37±1) °C 水浴箱(4.3.4)中水浴解冻。

牛胰蛋白酶 PBS 溶液制备:将 1 mL 上述混合液加入 9 mL PBS 中,充分混合,分装于试管后保存在(-20±2) °C 的冰箱中。使用前,置于(37±1) °C 水浴箱中水浴解冻。

4.4.13 胰蛋白酶 EDTA 溶液

将 2.5 g 蛋白酶、0.1 g 硫酸卡那霉素、2 mg 两性霉素 B 和 0.014 mol/L EDTA 溶于 1 000 mL 的 PBS(4.4.11)中,溶解并充分混匀,混合液使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。将溶液分装于试管后保存在 (-20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱(4.3.6)中。使用前,置于 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱(4.3.4)中水浴解冻。

4.4.14 DEAE-葡聚糖溶液

将 20 g DEAE-葡聚糖溶于 1 000 mL 水中,溶解并充分混匀,混合液使用孔径 0.22 μm 过滤器(4.3.7)过滤除菌。制备后如不立即使用,置于 5 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.4.15 琼脂培养基

4.4.15.1 A 溶液

将 10 mL DEAE-葡聚糖溶液(4.4.14)和 40 mL 7.5%碳酸氢钠溶液(4.4.4)加入 1 000 mL 双倍浓度维持培养基(4.4.10)混合均匀。

仅在流感病毒试验时,添加 3 mL 牛胰蛋白酶 PBS 溶液(4.4.12)。使用前把溶液放 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱(4.3.4)温浴。

4.4.15.2 B 溶液

将 15 g 细胞培养琼脂溶于 1 000 mL 水中,混合均匀。使用高压蒸汽灭菌器(4.3.1)灭菌。使用前将溶液放 (60 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱(4.3.4)温浴。

用于噬斑试验,使用前等比混合 A 溶液和 B 溶液。

4.4.16 SCDLP 液体培养基

将 17.0 g 酪蛋白胨、3.0 g 大豆蛋白胨、5.0 g 氯化钠、2.5 g 磷酸氢二钾、2.5 g 葡萄糖和 1.0 g 卵磷脂溶于 1 000 mL 水中,溶解并充分混合后添加 7.0 g 非离子表面活性剂,充分混合。用氢氧化钠或盐酸调节 pH 为 7.0 ± 0.2 。使用高压蒸汽灭菌器(4.3.1)灭菌。制备后如不立即使用,置于 5 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

4.5 试验准备

4.5.1 复苏宿主细胞

将低温储存的宿主细胞置于 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱(4.3.4)中水浴,使其迅速解冻,将解冻的细胞加入含有 5 mL 细胞生长培养基(4.4.8)的离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,去除上清液,加入新的细胞生长培养基重悬离心管底部的细胞,再将其转移到含有 20 mL 细胞生长培养基的 T75 细胞培养瓶(4.3.12)里,使用移液器轻柔吹打混匀。将细胞培养瓶置于二氧化碳培养箱(4.3.5)中, (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。使用倒置显微镜(4.3.8)观察细胞。如证实增殖再进行下一步,如没有增殖则继续培养。

4.5.2 宿主细胞的传代培养

4.5.2.1 确认 4.5.1 宿主细胞生长到 90%以上后,弃掉细胞培养瓶(4.3.12)中旧培养基,添加 5 mL PBS(4.4.11)洗涤细胞 2 次。移除 PBS,添加 1 mL~2 mL 胰蛋白酶 EDTA 溶液(4.4.13),覆盖细胞表面,将细胞培养瓶置于二氧化碳培养箱(4.3.5)中,在 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下保持 5 min,随时观察瓶中的细胞,如果 70%细胞从瓶壁脱落,立即加入 5 mL 细胞生长培养基(4.4.8),使用移液器轻轻吹打分散细胞,得到细胞悬液,此过程宜避免细胞损伤。

4.5.2.2 取一个新的细胞培养瓶(4.3.12),加入 1 mL 细胞悬液(见 4.5.2.1),并补足细胞生长培养基(4.4.8)至 20 mL。可根据需要调整细胞悬浮液与生长培养基的比例。将细胞培养瓶置于二氧化碳培养箱(4.3.5)中,(37±1) °C 培养,视细胞生长情况可传代或换液。

4.5.3 细胞培养做病毒感染滴度测定

细胞传代后,可以铺板做病毒感染滴度的测定。噬斑法使用 6 孔板,TCID₅₀法使用 96 孔板。铺好细胞后,将培养板置于二氧化碳培养箱(4.3.5)中,在(37±1) °C 下培养 18 h~24 h,待细胞长满后即可进行下一步试验。

4.5.4 病毒悬液制备

4.5.4.1 病毒株和宿主细胞

试验使用的病毒株、宿主细胞和培养基见表 1。经有关方商定后,也可选用其他低致病性或非致病性微生物作为试验病毒株,实验室等级应满足相应微生物试验要求,且所有微生物应由相应保藏机构提供并在试验报告中注明名称及保藏号。如选用其他商定病毒作检验病毒,试验条件可根据选用的病毒进行相应的调整。

表 1 病毒、宿主细胞和培养基

| 病毒种类 | 甲型流感病毒 | 肠道病毒 |
|---|-----------------------------|---------------------------|
| 病毒株 | 甲型流感病毒 H3N2 ATCC VR-1679 | 肠道病毒 EV71 ATCC VR-1432 |
| 宿主细胞 | MDCK 细胞 | Vero 细胞 |
| 培养基 | EMEM 培养基 | EMEM 培养基 |
| 病毒株、宿主细胞应从有相应资质的机构获取。其他单位宿主细胞、培养基经验证后也可使用 | | |

4.5.4.2 甲型流感病毒 H3N2

4.5.4.2.1 移除已培养好单层细胞(见 4.5.2.2)中的培养基,使用新鲜的细胞维持培养基(4.4.9)或 PBS(4.4.11)清洗培养细胞表面 2 次。

4.5.4.2.2 将低温储存的病毒储备液取出,置于(37±1) °C 水浴箱(4.3.4)中迅速解冻。将解冻的病毒悬液转移至新的试管中,用维持培养基(见 4.4.9)将病毒稀释至 10³ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)~10⁴ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)。接种 1 mL~3 mL 稀释后的甲型流感病毒 H3N2 于培养好的细胞表面(见 4.5.4.2.1),并将其置于(34±1) °C 二氧化碳培养箱(4.3.5)中保持 1 h,使病毒吸附细胞,之后在细胞培养瓶内加入含 0.15% 牛胰蛋白酶 PBS 溶液(4.4.12)的维持培养基 20 mL。将细胞培养瓶置于二氧化碳培养箱中,在(34±1) °C 中培养 1 d~3 d 使病毒增殖。

4.5.4.2.3 使用倒置显微镜(4.3.8)观察,如果证实流感病毒增殖,80% 以上细胞出现细胞病变后,则将病毒混悬液放入离心管,于(4±2) °C 及 10 000 g 离心力离心 15 min。离心后取上清液,即为流感病毒混悬液。分装后储存在(-80±2) °C 低温冰箱(4.3.6)中。

4.5.4.2.4 测定病毒感染滴度是否大于 10⁷ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL),如滴度小于 10⁷ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL),则从 4.5.4.2.1 重新制备。使用前将冷冻的病毒放入(37±1) °C 水浴箱(4.3.4)中水浴,使其迅速解冻。解冻后稀释至合适滴度,即为检测用病毒悬液,如不立即使用,于 2 °C~8 °C 条件下保存不超过 4 h。

4.5.4.3 肠道病毒 EV71

4.5.4.3.1 移除已培养好单层细胞(见 4.5.2.2)中的培养基,使用新鲜的细胞维持培养基(4.4.9)或 PBS(4.4.11)清洗培养细胞表面 2 次。

4.5.4.3.2 将低温储存的病毒储备液取出,置于(37±1)℃水浴箱(4.3.4)中迅速解冻。将解冻的病毒悬液转移至新的试管中,用维持培养基(4.4.9)将病毒稀释至 10³ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)~10⁴ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)。接种 1 mL~3 mL 稀释后的肠道病毒 EV71 于培养好的细胞表面(见 4.5.4.3.1),并将其置于(37±1)℃二氧化碳培养箱(4.3.5)中保持 1 h,使病毒吸附细胞,补足维持培养基 20 mL。将细胞培养瓶(4.3.12)置于二氧化碳培养箱中,在(37±1)℃中培养 1 d~3 d 使病毒增殖。

4.5.4.3.3 使用倒置显微镜(4.3.8)观察,如果证实 EV71 病毒增殖,80%以上细胞出现细胞病变后,则病毒混悬液放入离心管,于(4±2)℃及 10 000 g 离心力离心 15 min。离心后取上清液,即为 EV71 病毒混悬液。分装后储存在(-80±2)℃低温冰箱(4.3.6)中。

4.5.4.3.4 测定病毒感染滴度是否大于 10⁷ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL),如滴度小于 10⁷ PFU/mL(或 TCID₅₀/mL),则从 4.5.4.3.1 重新制备。使用前将冷冻的病毒放入(37±1)℃水浴箱(4.3.4)中水浴,使其迅速解冻。解冻后稀释至合适滴度,即为检测用病毒悬液,如不立即使用,于 2℃~8℃条件下保存不超过 4 h。

4.5.5 试样

4.5.5.1 对照样

尺寸为(50±2) mm×(50±2) mm 的聚乙烯薄膜,至少准备 12 片。

4.5.5.2 抗病毒试样

添加抗病毒成分的涂膜。

除另有规定外,试验底材采用灭菌的铝、玻璃或不锈钢等不易生锈和不易吸潮的材质,尺寸为(50±2) mm×(50±2) mm,厚度至少为 1 mm,至少准备 9 片。

按 GB/T 1727 或产品说明书要求制备涂膜,涂膜应平整、无锈、无油污等。制备好的涂膜,应在 GB/T 9278 规定的条件下放置规定时间后作为试验样品。

4.5.5.3 试样前处理

按附录 C 的规定进行。

4.6 试验程序

4.6.1 预试验

4.6.1.1 预试验目的

确定检测样品中和剂(SCDLP 液体培养基)洗脱后的液体对细胞有无毒性及对样品抗病毒剂的抑制效果。

4.6.1.2 细胞毒性试验

细胞毒性试验步骤如下所述。

a) 取对照样及抗病毒试样各 3 片,放在培养皿中,测试面朝上,加入 10 mL 的 SCDLP 液体培养基(4.4.16)或其他适宜而有效的中和剂,使用移液器吹打,以确保试样经过充分洗脱。以该洗

脱液作为试验样液,接种 96 孔板并培养,用倒置显微镜(4.3.8)观察细胞有无病变。

- b) 若未观察到细胞毒性,继续下一步骤。
- c) 若观察到有细胞毒性,则需酌情修改中和剂配方或增加中和剂的使用量。
- d) 若修改中和剂配方或增加中和剂的使用量,则在后续试验中应使用相同的中和剂。

4.6.1.3 细胞对病毒的敏感性与中和效果验证试验

4.6.1.3.1 验证程序

取对照样及抗病毒试样各 3 片,放在培养皿中,加入 10 mL 的 SCDLP 液体培养基(4.4.16),使用移液器吹打,以确保试样经过充分清洗。从培养皿中取出 5 mL 的 SCDLP 液体培养基回收液到新试管中。另取 3 支试管,分别加入 5 mL 的 SCDLP 液体培养基作为阴性对照。加 50 μ L 制备好的浓度为 4×10^4 PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)~ 6×10^4 PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)的病毒悬液至上述 9 支试管中,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C 放置 30 min。作用结束后,测试阴性对照、对照样及抗病毒试样的洗脱回收液中病毒的滴度。

4.6.1.3.2 验证试验的有效性

将阴性对照、对照样及抗病毒试样回收得到的病毒感染滴度作比较,其对数值应满足公式(1)和公式(2)的要求。

$$|S_n - S_u| \leq 0.5 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$|S_n - S_t| \leq 0.5 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

S_n ——3 个 SCDLP 液体培养基阴性对照回收的平均病毒感染滴度对数值,单位为噬斑形成单位每毫升(PFU/mL)或半数组织感染量每毫升(TCID₅₀/mL);

S_u ——3 片对照样回收的平均病毒感染滴度对数值,单位为噬斑形成单位每毫升(PFU/mL)或半数组织感染量每毫升(TCID₅₀/mL);

S_t ——3 片抗病毒试样回收的平均病毒感染滴度对数值,单位为噬斑形成单位每毫升(PFU/mL)或半数组织感染量每毫升(TCID₅₀/mL)。

若以上任何一个结果超过 0.5,应修改中和剂的配方或增加中和剂的量。

若修改中和剂的配方或增加中和剂的使用量,则在正式试验中应使用相同的中和剂。

4.6.2 试验步骤

4.6.2.1 试验准备

取制备好的对照样 6 片,抗病毒试样 3 片,分别单独放于无菌培养皿中,测试面朝上。

4.6.2.2 试验接种

选取覆盖膜(4.3.16)类型,若低吸水性涂膜则应采用无孔膜,若高吸水性涂膜则应采用 144 孔膜;用 75%(体积分数)乙醇溶液将所选覆盖膜浸泡 10 min,再用无菌水(4.4.2)冲洗,自然干燥后,获得灭菌后的覆盖膜,备用。

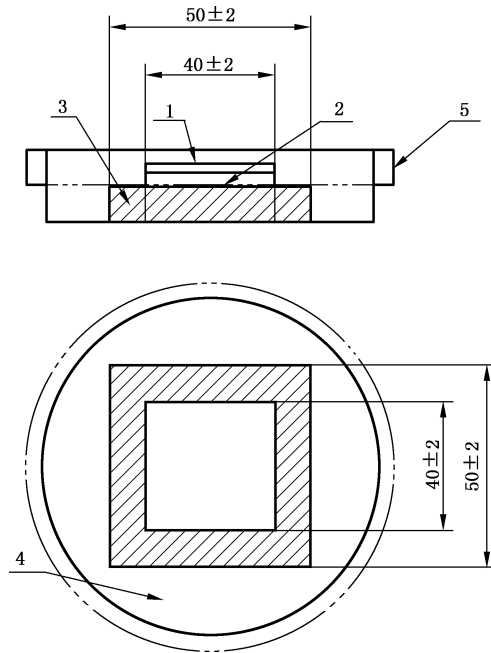
将冷冻的病毒悬液(见 4.5.4)置于(37 \pm 1) $^{\circ}$ C 水浴箱(4.3.4)中水浴,使其迅速融化。用无菌水(4.4.2)将病毒悬液浓度调整为 1×10^7 PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)~ 5×10^7 PFU/mL(或 TCID₅₀/mL)作接种液,若接种液不立即使用,可于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 条件下保存不超过 4 h。

用移液管吸取 0.4 mL 接种液,滴到每个试样表面。并将制备好的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(见图 1)。

接种液不能从覆盖膜(4.3.16)边缘溢出。如有接种液溢出时,适量减少接种液体积,但体积不小于 0.1 mL。当接种液体积减小时,可增加接种液病毒感染滴度,以保证测试时与标准规定的病毒感染滴度相同。也可通过添加惰性增稠剂(例如琼脂)来增加试验培养物的黏度,以防止泄漏。相应的处理方法应在试验报告中注明。

单位为毫米



标引序号说明:

- 1——覆盖膜;
- 2——接种液(0.4 mL);
- 3——试样;
- 4——培养皿;
- 5——培养皿盖。

图 1 试样接种与覆盖膜放置

4.6.2.3 接种后试样的培养

除另有规定外,接种后的试样,应在(25±1)℃、相对湿度不小于 90%的条件下培养 24 h。也可商定采用不超过 24 h 的其他培养时间,并在报告中注明。如试样接种培养后出现表干情况,则试验无效。

4.6.2.4 病毒的洗脱回收

4.6.2.4.1 接种后,立即对已接种的 3 片对对照进行回收。在各培养皿中加入 10 mL 的 SCDLP 液体培养基(4.4.16)或其他适宜而有效的中和剂,充分吹打后回收病毒。对回收得到的病毒洗脱液进行滴度测定。测定方法见 4.6.3。

4.6.2.4.2 若中和剂的体积或成分更改,在试验报告中记录。中和剂的体积更改时在计算时予以考虑。也可使用其他回收洗脱方法。回收方法的变更可能会影响所测得的抗病毒活性结果,其有效性充分证实才能够使用,并在报告中注明。

4.6.2.4.3 接种样品培养后(见 4.6.2.3),按照 4.6.2.4.1 处理 3 片对对照和 3 片抗病毒试样,然后立即测

定洗脱液的病毒感染滴度。

4.6.3 病毒感染滴度测定

4.6.3.1 噬斑法

4.6.3.1.1 操作步骤

病毒的培养温度应符合表 2 的要求,操作步骤如下所述。

- 在 6 孔板的每个孔内培养单层细胞(见 4.5.3),并用倒置显微镜(4.3.8)观察细胞的生长状态。当观察到长满的单层细胞时,弃掉旧的培养基。使用维持培养基(4.4.9)清洗细胞表面 2 次。
- 将洗脱病毒悬液和稀释后的测试病毒悬液分别接种于 2 孔中,每孔接种 0.1 mL 的病毒悬液。如将初始病毒悬液接种到前 2 孔,将 1/10 稀释后的病毒悬液接种到后 2 孔。在最后 2 孔中接种维持培养基,做阴性对照。
- 将接种后的 6 孔板放二氧化碳培养箱(4.3.5)孵育 1 h,使病毒吸附到细胞上。每隔 15 min 摇一下 6 孔板,让病毒悬液充分和细胞接触。接种规定时间后取 2 mL~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(4.4.15)做噬斑试验,甲型流感病毒 H3N2 需加入含 0.15%牛胰蛋白酶 PBS 溶液(4.4.12)的琼脂培养基,盖上盖子并放室温 10 min 左右让琼脂培养基凝固。待琼脂培养基凝固后,倒置 6 孔板,放入二氧化碳培养箱(4.3.5)中,甲型流感病毒 H3N2 于(34±1) °C 培养 4 d~7 d,肠道病毒 EV71 于(37±1) °C 培养 2 d~3 d。然后从培养箱中把 6 孔板拿出来,放正,添加 3 mL 的甲醛溶液(4.4.5)以固定细胞,置于室温下至少 1 h。然后移除甲醛溶液和琼脂培养基,加 3 mL 亚甲基蓝溶液(4.4.6),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。确认细胞染色。记录噬斑的数量。

表 2 培养条件

| 病毒 ^a | 甲型流感病毒 H3N2 | 肠道病毒 EV71 |
|---------------------------|-------------|-----------|
| 吸附温度 | (34±1) °C | (37±1) °C |
| 培养温度 | | |
| ^a 适用于本文件规定的病毒。 | | |

4.6.3.1.2 PFU 计算

从接种了不同稀释度病毒液的培养孔计数得到的噬斑数量(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)。以每个稀释度的两个平行数据的平均值作为空斑的数量。

对合适的稀释度上的噬斑进行计数,其空斑数量计算如表 3 所示。

表 3 稀释系列表

| 稀释 | 洗出病毒悬液 | 第 1 组稀释 | 第 2 组稀释 | 第 3 组稀释 | 第 N 组稀释 |
|-------|--------|---------|---------|---------|-------------------|
| 稀释率 | 1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10 ⁿ |
| 斑块平均数 | C1 | C2 | C3 | C4 | CN |

本文件中规定如下:

——如果 C1~CN 系列中有一个噬斑数为 6~60,则 6~60 作为试验的 PFU 值;

- 如果 $C_1 < 6$ 时,则使用 C_1 作为试验的 PFU 值;
- 如果 $C_1 < 1$,包括 0,则以 1 作为试验的 PFU 值。

4.6.3.2 TCID₅₀ 法

病毒的培养温度应符合表 2 的要求,操作步骤如下所述。

- a) 在 96 孔板的每个孔内培养单层细胞,并用倒置显微镜(4.3.8)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(4.4.8)。加 0.1 mL 细胞维持培养基(4.4.9)清洗细胞表面,重复洗 2 次。
- b) 将洗脱病毒悬液和稀释后的测试病毒悬液分别接种于 8 孔中,每孔接种 0.1 mL 的病毒悬液。如将初始病毒悬液接种至前 8 孔,将 1/10 稀释后的病毒悬液接种至接下来的 8 孔,以此类推。在最后 8 孔中接种维持培养基,做阴性对照。
- c) 把 96 孔板放二氧化碳培养箱(4.3.5)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。
- d) 加入 0.1 mL 细胞维持培养基后将 96 孔板放入二氧化碳培养箱中,甲型流感病毒 H3N2 加入含 0.15% 牛胰蛋白酶 PBS 溶液(4.4.12)的维持培养基。甲型流感病毒 H3N2 于(34±1) °C 培养 4 d~7 d,肠道病毒 EV71 于(37±1) °C 培养 2 d~3 d。通过倒置显微镜(4.3.8)观察细胞病变。确认细胞病变之后用 Behren—Karber 法计算 TCID₅₀,得到每毫升采样液中的病毒数量(TCID₅₀/mL)。

4.7 病毒感染滴度的计算

4.7.1 噬斑法病毒感染滴度计算

噬斑法病毒感染滴度 N_a 按公式(3)计算。

$$N_a = \frac{10 \times C_a \times D \times V}{S} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- N_a ——病毒感染滴度,单位为噬斑形成单位每平方厘米(PFU/cm²);
- 10 ——噬斑形成单位每 0.1 毫升(PFU/0.1 mL)换算成噬斑形成单位每毫升(PFU/mL)的换算系数;
- C_a ——两孔噬斑数的平均数,单位为噬斑形成单位每 0.1 毫升(PFU/0.1 mL);
- D ——稀释倍数;
- V ——洗脱液体积,单位为毫升(mL);
- S ——覆盖膜的面积,单位为平方厘米(cm²)。

4.7.2 TCID₅₀ 法病毒感染滴度计算(Behren—Karber 法)

病毒感染滴度 Y 按公式(4)计算。

$$Y = X \times 10^{\sum P - 0.5} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- Y ——病毒感染滴度,单位为半数组织感染量每 0.1 毫升(TCID₅₀/0.1 mL);
- X ——原始病毒洗脱液(非稀释液)的稀释倍数;
- P ——各稀释度细胞病变率,%。

病毒感染滴度 C_b 按公式(5)计算。

$$C_b = Y \times 10 \dots\dots\dots(5)$$

式中：

C_b ——病毒感染滴度，单位为半数组织感染量每毫升(TCID₅₀/mL)；

Y ——病毒感染滴度，单位为半数组织感染量每 0.1 毫升(TCID₅₀/0.1 mL)；

10——半数组织感染量每 0.1 毫升(TCID₅₀/0.1 mL)换算成半数组织感染量每毫升(TCID₅₀/mL)的换算系数。

病毒感染滴度 N_b 按公式(6)计算。

$$N_b = \frac{C_b \times V}{S} \dots\dots\dots (6)$$

式中：

N_b ——病毒感染滴度，单位为半数组织感染量每平方厘米(TCID₅₀/cm²)；

C_b ——病毒感染滴度，单位为半数组织感染量每毫升(TCID₅₀/mL)；

V ——洗脱液体积，单位为毫升(mL)；

S ——覆盖膜的面积，单位为平方厘米(cm²)。

病毒感染滴度计算的示例见附录 D。也可使用其他的 TCID₅₀ 计算方法，使用其他方法应在试验报告中注明。

4.7.3 结果计算和试验有效性

4.7.3.1 试验有效性

试验结果满足以下要求，否则试验无效：

- a) 对对照样接种后即时测得的平均值应在 2.5×10^5 PFU/cm² (或 TCID₅₀/cm²) \sim 1.2×10^6 PFU/cm² (或 TCID₅₀/cm²) 的范围内。
- b) 对对照样接种 24 h 测得的平均值不应小于 6.2×10^2 PFU/cm² (或 TCID₅₀/cm²)。

4.7.3.2 抗病毒率的计算

抗病毒率按公式(7)计算，数值保留小数点后两位，按 GB/T 8170 中规定进行修约。

$$R_1 = \frac{U_t - A_t}{U_t} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

式中：

R_1 ——抗病毒率；

U_t ——3 片对对照样接种 24 h 后回收的平均滴度值，单位为噬斑形成单位每平方厘米(PFU/cm²)或半数组织感染量每平方厘米(TCID₅₀/cm²)；

A_t ——3 片抗病毒试样接种 24 h 后回收的平均滴度值，单位为噬斑形成单位每平方厘米(PFU/cm²)或半数组织感染量每平方厘米(TCID₅₀/cm²)。

4.7.3.3 抗病毒活性值的计算

抗病毒活性值按公式(8)计算，数值保留至小数点后一位。

$$R'_1 = (U'_0 - A'_1) - (U'_0 - U'_1) = U'_1 - A'_1 \dots\dots\dots (8)$$

式中：

R'_1 ——抗病毒活性值；

U'_0 ——3 片对对照样接种后即时回收测得的平均滴度常用对数，单位为噬斑形成单位每平方厘米(PFU/cm²)或半数组织感染量每平方厘米(TCID₅₀/cm²)；

A'_1 ——3 片抗病毒试样接种 24 h 后回收的平均滴度常用对数，单位为噬斑形成单位每平方厘米

(PFU/cm²)或半数组织感染量每平方米(TCID₅₀/cm²);

U'_i ——3片对照样接种 24 h 后回收的平均滴度常用对数,单位为噬斑形成单位每平方米 (PFU/cm²)或半数组织感染量每平方米(TCID₅₀/cm²)。

4.8 抗病毒耐久性试验

采用 1 支 30 W、波长为 253.7 nm 的符合 GB/T 19258.1 的紫外灯,紫外灯距离试样 0.8 m~1.0 m,照射 100 h,经处理后的涂膜抗病毒耐久性按 4.6 和 4.7 进行试验。

5 抗菌性能试验

5.1 概述

通过定量接种细菌于试样上,用贴膜的方法使细菌均匀接触试样表面,经过一定时间的培养后,检测试样表面的活菌数,通过比较抗菌试样和对照样中的活菌数计算抗菌率和抗菌活性值,以抗菌率或抗菌活性值来表征抗菌性能。

5.2 实验室要求

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操作,并确保实验室生物安全。

5.3 设备和材料

5.3.1 恒温恒湿培养箱:温度能保持(37±1)℃,相对湿度能保持(90±5)%。

5.3.2 冰箱:温度能保持 0℃~5℃和 5℃~10℃。

5.3.3 生物安全柜:符合 GB 41918 要求的 II 级及以上生物安全柜。

5.3.4 高压蒸汽灭菌器:温度能保持(121±2)℃,压力能保持(103±5)kPa。

5.3.5 电热恒温干燥箱:温度能保持 160℃~180℃,温度波动不超过±2℃。

5.3.6 pH 计:分度值 0.01。

5.3.7 天平:精度 0.01 g。

5.3.8 培养皿:直径 90 mm~100 mm。

5.3.9 移液管:10 mL、1 mL。

5.3.10 覆盖膜:低密度聚乙烯薄膜(密度值为 0.918 g/cm³~0.928 g/cm³),分无孔膜和 144 孔膜(制备方法见附录 A)两种,标准尺寸为(40±2) mm×(40±2) mm、厚度为 0.05 mm~0.10 mm。

5.3.11 微生物实验室用的试管、涡旋器、镊子、量筒、烧瓶、烧杯、接种环、移液器等。

5.4 试剂和培养基

5.4.1 一般要求

除另有规定外,在试验中仅使用化学纯及以上纯度的试剂和符合 GB/T 6682 中三级水要求的蒸馏水或去离子水。

5.4.2 无菌水

将水按 10 mL/支分装到无色玻璃试管中,放入高压蒸汽灭菌器(5.3.4)中在(121±2)℃条件下灭菌 15 min 后备用。

5.4.3 营养肉汤培养基(NB)

5.4.3.1 组分

组分见表 4。

表 4 组分

| 试剂名称 | 添加量/g |
|------|-------|
| 牛肉膏粉 | 3.0 |
| 蛋白胨 | 10.0 |
| 氯化钠 | 5.0 |

5.4.3.2 制备方法

取上述组分按比例依次加入 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解后,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.4 ± 0.2 ,分装后置高压蒸汽灭菌器(5.3.4)内, (121 ± 2) °C 灭菌 15 min。如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

5.4.4 营养琼脂培养基(NA)

1 000 mL 营养肉汤(NB)中加入 15 g 琼脂,加热熔化,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.3 ± 0.2 ,分装后置高压蒸汽灭菌器(5.3.4)内, (121 ± 2) °C 灭菌 15 min。如不立即使用,置于 5 °C~10 °C 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

5.4.5 菌种稀释液

1/500(体积分数)营养肉汤培养基(NB)和 1/100(体积分数)营养肉汤培养基(NB)。1/500(体积分数)NB 用于大肠杆菌接种液浓度的稀释,1/100(体积分数)NB 用于金黄色葡萄球菌接种液浓度的稀释。

5.4.6 SCDLP 液体培养基

5.4.6.1 组分

组分见表 5。

表 5 组分

| 试剂名称 | 添加量/g |
|-------|-------|
| 酪蛋白胨 | 17.0 |
| 大豆蛋白胨 | 3.0 |
| 氯化钠 | 5.0 |
| 磷酸氢二钾 | 2.5 |
| 葡萄糖 | 2.5 |
| 卵磷脂 | 1.0 |
| 吐温 80 | 7.0 |

5.4.6.2 制备方法

将酪蛋白胨、大豆蛋白胨、氯化钠、磷酸氢二钾、葡萄糖与卵磷脂溶于 1 000 mL 蒸馏水或去离子水中,搅拌均匀后加入 7.0 g 吐温 80,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液将 pH 值调整至 7.2 ± 0.2 ,分装后置高压蒸汽灭菌器(5.3.4)内, $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min。如不立即使用,置于 $5^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

5.4.7 生理盐水

含 0.85% (质量分数) 氯化钠的生理盐水。用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 $7.0 \sim 7.2$,分装后置高压蒸汽灭菌器(5.3.4)内, $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min。如不立即使用,置于 $5^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 条件下保藏。保存期不超过 30 d。

5.5 试验菌种

抗菌性能试验所用菌种见表 6。经有关方商定后,也可选用其他低致病性或非致病性微生物作为试验菌种,实验室等级应满足相应微生物试验要求,且所有微生物均应由相应保藏机构提供,并在试验报告中注明名称及保藏号。如选用其他商定菌种作检验菌种,试验条件可根据选用的菌种进行相应的调整。

表 6 抗菌性能试验菌种

| 菌种的中文名 | 菌种的拉丁名 | 菌株号 ^a |
|---------|------------------------------|------------------|
| 金黄色葡萄球菌 | <i>Staphylococcus aureus</i> | CGMCC 1.89 |
| 大肠埃希氏菌 | <i>Escherichia coli</i> | CGMCC 1.90 |

^a CGMCC 为中国普通微生物菌种保藏管理中心。

5.6 试样

5.6.1 对试样

尺寸为 $(50 \pm 2) \text{ mm} \times (50 \pm 2) \text{ mm}$ 的聚乙烯薄膜,至少准备 6 片。

5.6.2 抗菌试样

添加抗菌成分的涂膜。

除另有规定外,试验底材采用灭菌的铝、玻璃或不锈钢等不易生锈和不易吸潮的材质,尺寸为 $(50 \pm 2) \text{ mm} \times (50 \pm 2) \text{ mm}$,厚度至少为 1 mm,至少准备 6 片。

按 GB/T 1727 或产品说明书要求制备涂膜,涂膜应平整、无锈、无油污等。制备好的涂膜,应在 GB/T 9278 规定的条件下放置规定时间后作为试验样品。

5.6.3 试样前处理

按附录 C 的规定进行。

5.7 试验程序

5.7.1 菌种保藏

将菌种接种于营养琼脂培养基(NA)(5.4.4)斜面上,在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 24 h 后,在 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 下

保藏(不应超过 30 d),作为斜面保藏菌种。应使用 3 代~8 代的菌种。

5.7.2 菌种活化

将斜面保藏菌种转接至斜面或培养皿营养琼脂培养基(NA)(5.4.4)上,于(37±1)℃下培养 16 h~24 h,再将培养好的细菌用无菌接种环转至斜面或培养皿营养琼脂培养基,于(37±1)℃下培养 16 h~20 h。

5.7.3 接种液的制备

用无菌接种环从 5.7.2 培养基上取少量(刮 1 环~2 环)培养好的细菌,加入至菌种稀释液(5.4.5)中,并用菌种稀释液制备 10 倍梯度系列稀释液,选择浓度为 5.0×10^5 CFU/mL~ 10.0×10^5 CFU/mL 的菌液作为接种液。如不立即使用,于 2℃~8℃条件下保存不超过 4 h。

5.7.4 试样接种

选取覆盖膜(5.3.10)类型,试验采用无孔膜,对于高吸水性涂膜,也可采用 144 孔膜;用 75%(体积分数)乙醇溶液将所选覆盖膜浸泡 10 min,再用无菌水(5.4.2)冲洗,自然干燥后,获得灭菌后的覆盖膜,备用。

分别取 0.4 mL 接种液(见 5.7.3)滴加在对照样和抗菌试样上。

用无菌镊子夹起无菌覆盖膜(5.3.10)分别覆盖在对照样和抗菌试样上,轻压覆盖膜使接种液向四周扩散,确保接种液不从覆盖膜边缘渗出且无气泡,使菌均匀接触样品,将 3 片对照样和 3 片抗菌试样置于无菌平皿中,盖上培养皿盖(见图 1)。于(37±1)℃、相对湿度≥90%条件下培养 24 h。同时对另外 3 片对照样立即进行细菌回收试验。

因样品表面性质可适量减少或增加接种液体积,相应增加或减少接种液细菌浓度,以保证测试时与规定的细菌数量相同。也可通过添加惰性增稠剂(例如琼脂)来增加试验培养物的黏度,以防止泄漏。相应的处理方法在试验报告中说明。如试样接种培养后出现表干情况,则试验无效。

5.7.5 试样上的细菌回收

5.7.5.1 接种后样品立即(“0”h)洗脱

接种后,立即对已接种的 3 片对照样进行洗脱,在这 3 个培养皿中分别加入 10 mL SCDLP 液体培养基(5.4.6)。用移液管吸取和释放 SCDLP,冲洗对照样和覆盖膜(5.3.10)至少 4 次,充分洗脱对照样和抗菌试样上的细菌,得到回收菌液。也可采用其他洗脱方法(如均质袋振动和旋动等)。

5.7.5.2 接种培养后洗脱

取出培养 24 h 的抗菌试样和对照样,按照 5.7.5.1 进行洗脱。如果因试样性质的原因,采用 10 mL SCDLP 回收细菌有困难,则可增加其用量。若 SCDLP 的体积不是 10 mL,则应在报告中记录,并应用于活菌计算。

5.7.6 活菌数测定

用生理盐水(5.4.7)对 SCDLP 回收液进行 10 倍梯度稀释。将试样上的回收液及其 10 倍稀释液各取 1 mL,分别放入无菌培养皿中,每个稀释度应做两个培养皿。每个培养皿中注入 15 mL 营养琼脂培养基(5.4.4),轻轻旋转以分散细菌。盖上皿盖,倒置培养皿,于(37±1)℃培养 40 h~48 h。

培养后,对培养皿中菌落数在 30~300 之间的菌落进行计数。记下每个稀释度培养皿上的菌落数

并保留两位有效数字,记录稀释倍数。若 1 mL 回收液中的细菌数小于 30,则对该培养皿直接计数。如所有培养皿中均没有菌落,则记录为“<1”。

5.8 结果计算和试验有效性

5.8.1 活菌数计算

对每个试样的活菌数,按公式(9)进行计算。

$$N_c = C_c \times D \times V \quad \dots\dots\dots(9)$$

式中:

N_c ——每个试样的活菌数,单位为菌落形成单位(CFU);

C_c ——两个培养皿的菌落数的平均数,单位为菌落形成单位每毫升(CFU/mL);

D ——稀释倍数;

V ——洗脱液的体积,单位为毫升(mL)。

5.8.2 试验有效的条件

对对照样品回收菌数满足以下要求,否则试验无效:

——对对照“0”h 的 3 个平行活菌数应在 2.0×10^5 CFU~ 4.0×10^5 CFU;

——对对照“0”h 的 3 个平行活菌数应符合(最高对数值—最低对数值)/平均活菌数值对数值 ≤ 0.3 ;

——对对照 24 h 的 3 个平行活菌数均不小于 1.0×10^5 CFU。

5.8.3 抗菌率的计算

按公式(10)计算抗菌率,结果保留小数点后两位,按 GB/T 8170 中规定进行修约。

$$R_2 = \frac{N_A - N_B}{N_A} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(10)$$

式中:

R_2 ——抗菌率;

N_A ——3 片对对照 24 h 后回收菌数的平均数,单位为菌落形成单位(CFU);

N_B ——3 片抗菌试样 24 h 后回收菌数的平均数,单位为菌落形成单位(CFU)。

5.8.4 抗菌活性值的计算

抗菌活性值按公式(11)计算,数值保留至小数点后一位。

$$R'_2 = (N'_A - N'_0) - (N'_B - N'_0) = N'_A - N'_B \quad \dots\dots\dots(11)$$

式中:

R'_2 ——抗菌活性值;

N'_A ——3 片对对照 24 h 后回收菌落数的平均数的常用对数,单位为菌落形成单位(CFU);

N'_0 ——3 片对对照接种后立即回收菌落数的平均数的常用对数,单位为菌落形成单位(CFU);

N'_B ——3 片抗菌试样 24 h 后回收菌落数的平均数的常用对数,单位为菌落形成单位(CFU)。

5.9 抗菌耐久性试验

采用 1 支 30 W、波长为 253.7 nm 的符合 GB/T 19258.1 的紫外灯,紫外灯距离试样 0.8 m~1.0 m,照射 100 h,经处理后的涂膜抗菌耐久性按 5.7 和 5.8 进行试验。

6 试验报告

试验报告至少应包括以下信息：

- a) 识别受试产品的所有必要的细节；
- b) 注明本文件编号；
- c) 试验方法(抗病毒活性试验、抗菌性能试验)；
- d) 试验起始日期及试验环境等基本信息；
- e) 试样的制备过程及底材类型等(如需制板)；
- f) 试验用毒株与宿主细胞的类型和编号、试验菌种及菌种的菌株号；
- g) 试验接种液的体积；
- h) 覆盖膜的类型；
- i) 接种液的试验菌浓度与病毒感染滴度；
- j) 试验接触时间；
- k) 试验中对照样及抗病毒试样上回收得到的病毒感染滴度、试验中对照样及抗菌试样上回收得到的活菌数；
- l) 抗菌率或抗菌活性值、抗病毒率或抗病毒活性值；
- m) 与规定试验方法的任何不同之处；
- n) 试验过程中观察到的任何异常现象。

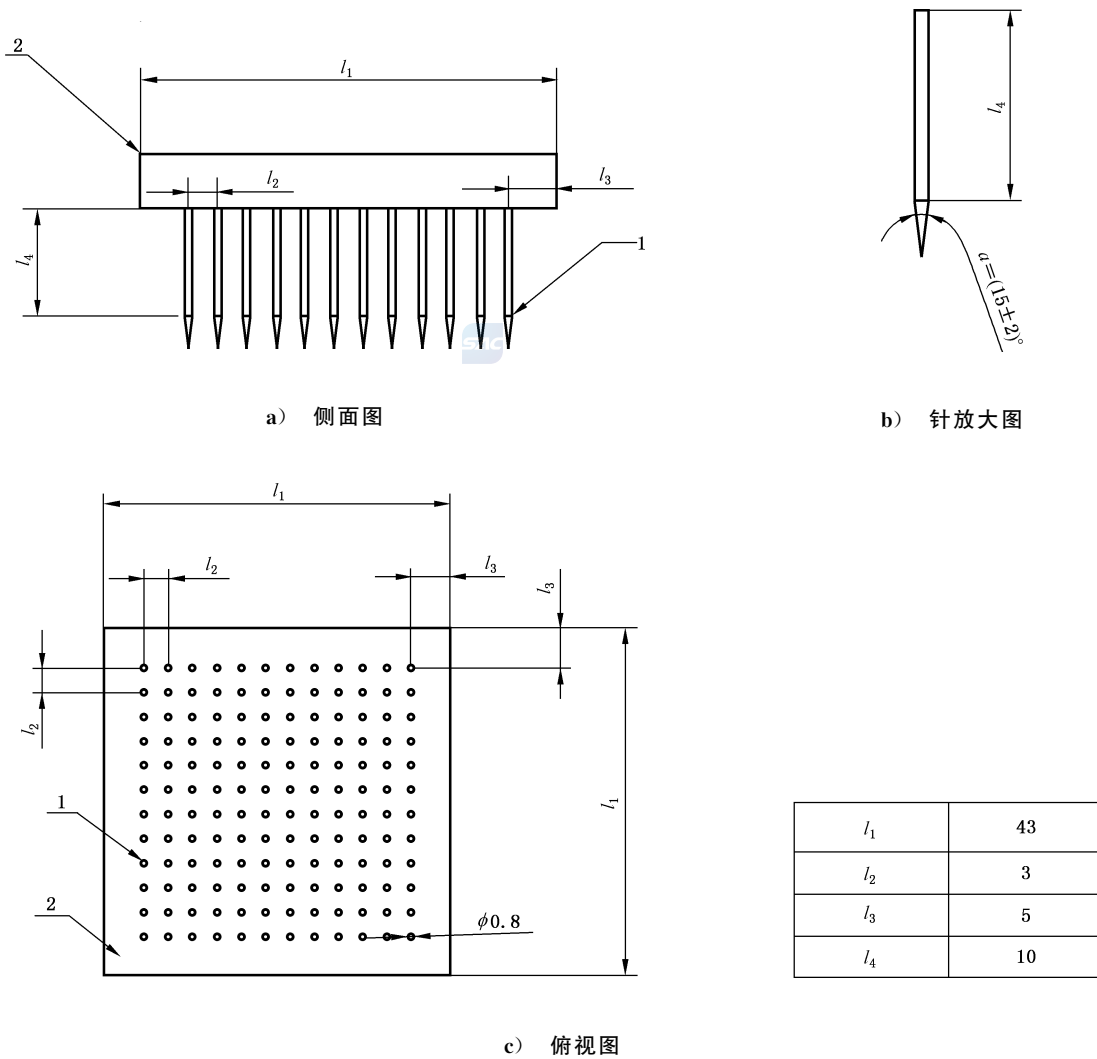
附录 A
(规范性)
多孔膜制备方法

A.1 打孔器的结构和材质要求

A.1.1 打孔器的结构图

打孔器的结构图见图 A.1。

单位为毫米



标引序号说明：

- 1——针；
- 2——针板。

图 A.1 打孔器的结构图

A.1.2 材质要求

针的材质为不锈钢,针板的材质为 PP 塑料。

A.2 多孔膜制备方法

将覆盖膜平放于挤塑聚苯乙烯(XPS)泡沫板上,将打孔器(见 A.1)的针尖对准覆盖膜垂直向下按压,使得针尖完全贯穿膜内,制备成 144 孔覆盖膜。



附 录 B
(规范性)
EMEM 培养基

表 B.1 给出了 EMEM 培养基配方。可以使用市售的 EMEM 培养基。

表 B.1 EMEM 培养基配方

| 每 1 000 mL 水中组分 | | 组分含量/mg |
|-----------------|---|----------|
| 氨基酸 | L-精氨酸盐酸盐 | 126.40 |
| | L-胱氨酸二盐酸盐 | 31.20 |
| | L-谷氨酰胺 | 292.00 |
| | L-组氨酸盐酸盐单水合物 | 41.90 |
| | L-异亮氨酸 | 52.50 |
| | L-亮氨酸 | 52.50 |
| | L-赖氨酸盐酸盐 | 72.50 |
| | L-蛋氨酸 | 15.00 |
| | L-苯丙氨酸 | 32.50 |
| | L-苏氨酸 | 47.60 |
| | L-色氨酸 | 10.00 |
| | L-酪氨酸二钠二水物 | 51.90 |
| | L-缬氨酸 | 46.80 |
| 维生素 | 氯化胆碱 | 1.00 |
| | D-泛酸钙 | 1.00 |
| | 叶酸 | 1.00 |
| | 肌醇 | 2.00 |
| | 烟酰胺 | 1.00 |
| | 盐酸吡哆辛 | 1.00 |
| | 核黄素 | 0.10 |
| | 盐酸硫胺 | 1.00 |
| 无机盐 | 氯化钙[CaCl ₂] | 200.00 |
| | 硫酸镁[MgSO ₄] | 97.70 |
| | 氯化钾[KCl] | 400.00 |
| | 氯化钠[NaCl] | 6 800.00 |
| | 磷酸二氢钠(一水)[NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O] | 140.00 |
| 其他 | D-葡萄糖 | 1 000.00 |
| | 苯酚红钠盐 | 10.00 |

附录 C

(规范性)

涂膜吸水性的判定及试样预处理方法

C.1 涂膜吸水性的判定

C.1.1 试验步骤

制板前,称出底材的质量 G_0 ,精确至 0.01 g。按 4.5.5.2 或 5.6.2 的规定制备并养护试样。试样浸水前称其质量 G_1 ,精确至 0.01 g,然后将试样垂直地全部浸入盛有 (23 ± 2) °C 蒸馏水的玻璃容器中,其表面不应附有气泡,且与其他试样和容器壁接触。浸水 1 h 后,将试样用镊子取出,迅速用滤纸吸干涂膜表面及试样周边的水分,立即称其质量 G_2 ,精确至 0.01 g,每片试样自水中取出至称量完毕的时间不应超过 2 min。

C.1.2 涂膜吸水性的判定方法

涂膜的吸水性通过吸水率判定,按公式(C.1)计算每片试样的吸水率。

$$W = \frac{G_2 - G_1}{G_1 - G_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

W ——涂膜的吸水率,保留 1 位小数;

G_2 ——试样浸水后的质量,单位为克(g);

G_1 ——试样浸水前的质量,单位为克(g);

G_0 ——底材的质量,单位为克(g)。

取 5 片试样的数据,去掉一个最大值和一个最小值,以剩余 3 个数据的算术平均值作为最终结果。

吸水率小于或等于 30.0% 的涂膜判定为低吸水性涂膜,吸水率大于 30.0% 的涂膜判定为高吸水性涂膜。

C.2 涂膜试样预处理方法

C.2.1 低吸水性涂膜试样预处理方法

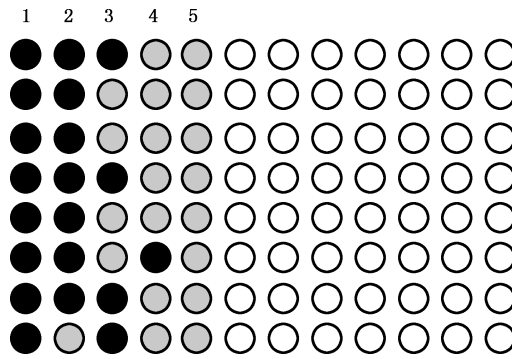
抗病毒、抗菌试验前试样需进行消毒、灭菌处理,一般可采用符合 GB 41918 要求的 II 级及以上生物安全柜的紫外照射 30 min 的方式,也可采用其他商定的方法。

C.2.2 高吸水性涂膜试样预处理方法

抗病毒、抗菌试验前试样先进行消毒、灭菌处理再进行泡水处理,消毒、灭菌处理一般可采用符合 GB 41918 要求的 II 级及以上生物安全柜的紫外照射 30 min 的方式,泡水处理采用 (50 ± 2) mm \times (50 ± 2) mm 消毒过的试样,涂层面朝下平放于装有 20 mL 无菌水的平皿中,浸泡 1 h 后取出,试样正面朝上,用滤纸擦拭,待试样表面没有水珠后,再进行下一步试验。每片试样自水中取出擦拭表面至进行下一步试验的时间间隔不超过 10 min。

附 录 D
(资料性)
病毒感染滴度计算示例

病毒感染及稀释度见图 D.1。



标引序号说明：

- 1 —— 接种剂为初始洗脱病毒悬液；
- 2 —— 接种剂为初始洗脱病毒悬液的 1/10 稀释液；
- 3 —— 接种剂为第 2 行病毒悬液的 1/10 稀释液；
- 4 —— 接种剂为第 3 行病毒悬液的 1/10 稀释液；
- 5 —— 接种剂为第 4 行病毒悬液的 1/10 稀释液；
- 黑色 —— 感染；
- 灰色 —— 未感染；
- 白色 —— 未接种。

图 D.1 病毒感染及稀释度

病毒感染滴度计算如下：

$$\begin{aligned}
 X &= 10^0 = 1; \\
 \sum p &= 8/8 + 7/8 + 4/8 + 1/8 + 0/8 = 2.5; \\
 Y &= 10^{2.0} = 1.0 \times 10^2; \\
 C_b &= Y \times 10 = 1.0 \times 10^3; \\
 N_b &= \frac{C_b \times V}{S} = \frac{1.0 \times 10^3 \times 10}{16} = 6.2 \times 10^2.
 \end{aligned}$$



参 考 文 献

- [1] 消毒技术规范(卫法监发〔2002〕282号)
-



