

HG

中华人民共和国化工行业标准

HG/T 3950—XXXX

代替 HG/T 3950-2007

抗菌和抗病毒涂料

Antibacterial and antiviral coating

（征求意见稿）

（本稿完成时间：2023.11.6）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 分类和标记 2

 4.1 分类分级 2

 4.2 标记 2

5 要求 2

6 试验方法 3

 6.1 一般规定 3

 6.2 试样 3

 6.3 试验环境 3

 6.4 试验样板的制备 3

 6.5 试验样板的预处理 4

 6.6 抗细菌性能试验 4

 6.7 抗霉菌性能试验 4

 6.8 抗病毒性能试验 4

 6.9 抗细菌、抗霉菌、抗病毒耐久性能试验 4

7 检验规则 4

8 检验结果的判定 4

9 标志、包装和贮存 4

 9.1 标志 5

 9.2 包装 5

 9.3 贮存 5

附录 A（规范性） 抗细菌性能试验方法 6

附录 B（规范性） 抗病毒性能试验方法——蚀斑法或 TCID₅₀ 法 10

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HG/T 3950—2007《抗菌涂料》，与HG/T 3950—2007相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了标准的名称；
- 更改了“范围”（见第1章，2007年版的第1章）；
- 更改了“规范性引用文件”（见第2章，2007年版的第2章）；
- 更改了“术语和定义”（见第3章，2007年版的第3章）；
- 更改了“分类和标记”（见第4章，2007年版的第4章）；
- 更改了抗菌涂料和抗霉菌涂料的性能要求，增加了抗病毒涂料的性能要求（见第5章，2007年版的第5章）；
- 更改了“试验方法”，增加了“试样”、“试验环境”、“试验样板的制备”和“试验样板的预处理”（见第6章，2007年版的第6章）；
- 删除了“检验分类”（2007年版的7.1）；
- 更改了“标志”（见9.1，2007年版的8.1）；
- 更改了“附录A（规范性）抗菌涂料——抗菌性能试验方法”（见附录A，2007年版的附录A）；
- 删除了“附录B（规范性）抗菌涂料——抗霉菌性能试验方法”（见2007版的附录B），抗霉菌性能试验方法按GB/T 1741—2020的规定进行；
- 增加了“附录B（规范性）涂料抗病毒性能试验方法——斑蚀法或TCID₅₀法”（见附录B）。

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/TC5）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2007年首次发布为HG/T 3950—2007；
- 本次为第一次修订。

抗菌和抗病毒涂料

1 范围

本文件规定了抗菌和抗病毒涂料的分类和标记、要求、试验方法、检验规则、检验结果的判定及标志、包装和贮存。

本文件适用于具有抗细菌、抗霉菌或抗病毒功能的一种及一种以上功能的涂料。

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 1741—2020 漆膜耐霉菌性测定法
GB/T 3186 色漆、清漆和色漆与清漆用原材料 取样
GB 4789.2—2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定
GB/T 9266—2009 建筑涂料 涂层耐洗刷性的测试
GB/T 9271—2008 色漆和清漆 标准试板
GB/T 9278 涂料试样状态调节和试验的温湿度
GB/T 9750 涂料产品包装标志
GB/T 13491 涂料产品包装通则
GB/T 19258.1—2022 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/T 20777 色漆和清漆 试样的检查和制备
YY 0569—2011 II级生物安全柜

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌 antibacterial

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。

3.3

抗细菌涂料 antibacterial coating

具有抗细菌作用的涂料称为抗细菌涂料。

3.4

抗霉菌涂料 antibacterial coating

具有抗霉菌作用的涂料称为抗霉菌涂料。

3.5

抗病毒涂料 antiviral coating

具有抗病毒作用的涂料称为抗病毒涂料。

- 3.6
吸水性涂料 water-absorbing coating
具有吸水性的涂料，如硅藻泥、贝壳粉、水泥基等无机干粉型涂料。
- 3.7
非吸水性涂料 non water-absorbing coating
不具有吸水性的涂料，如乳胶漆、无机液态涂料、木器漆、粉末涂料等。
- 3.8
病毒滴度 viral titer
病毒悬浮液中每单位体积所含的具有感染能力的病毒粒子的数量。
- 3.9
蚀斑形成单位 plaque forming unites
PFU
表示单位体积中病毒浓度的单位。
- 3.10
锈斑试验 plaque assay
通过梯度稀释法确定以PFU形式表示的病毒感染滴度的测试方法。
- 3.11
半数组织培养感染计量 50% tissue culture infective dose 50%
TCID₅₀
病毒洗脱液或病毒稀释液中引起50%细胞病变的可感染性病毒的浓度。

4 分类和标记

- 4.1 分类分级
按涂料功能性分为抗细菌涂料、抗霉菌涂料和抗病毒涂料。
按性能指标又分为I级和II级。

- 4.2 标记
抗菌和抗病毒涂料按文件号、产品名称、分类和分级的顺序进行标记。
示例：
产品：具有高效抗细菌功能的涂料。
标记：抗菌和抗病毒涂料HG/T 3950—抗细菌涂料—I级。

5 要求

- 5.1 抗菌和抗病毒涂料的常规性能：应符合相关产品标准规定的技术要求。
- 5.2 抗细菌涂料性能应符合表 1 的要求。

表 1 抗细菌涂料的性能要求

项目		抗细菌率/%	
		I	II
抗细菌性能 ≥	大肠埃希氏菌	99.9	95
	金黄色葡萄球菌		
抗细菌耐久性能 ≥	大肠埃希氏菌	99	90
	金黄色葡萄球菌		
根据使用要求，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，且所有微生物应由相应保藏机构提供并在报告中注明名称及保藏号。 可增加其他商定菌种作试验菌种。			

5.3 抗霉菌涂料性能应符合表2的要求。

表2 抗霉菌涂料的性能要求

项目	耐霉菌性等级/级	
	I	II
抗霉菌性能	0	0/1
抗霉菌耐久性能	0	1

5.4 抗病毒涂料性能应符合表3的要求。

表3 抗病毒涂料的性能要求

项目		抗病毒率/%	
		I	II
抗病毒性能	≥ H3N2	99.9	99
	≥ EV71	90	80
抗病毒耐久性能	≥ H3N2	99	90
	≥ EV71	85	75
<p>根据使用要求，也可选用其他低致病性或非致病性微生物作为试验毒株，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报告中注明名称及保藏号。</p> <p>可增加其他商定病毒作试验毒株。若选用其他毒株进行产品功能性验证，包膜病毒抗病毒效果分级按照H3N2进行，非包膜病毒按照EV71进行。</p>			

6 试验方法

6.1 一般规定

- 6.1.1 抗菌、抗病毒试验的实验室应符合 GB 19489 规定的生物安全管理和设施条件要求。
- 6.1.2 应配备试验人员的防护服、口罩、帽子等防护用品，并由经过培训的人员进行试验。
- 6.1.3 抗病毒试验应在 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；试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。

6.2 试样

按GB/T 3186的规定取样，也可按商定方法取样。取样量根据检验需要确定。

按GB/T 20777的规定，检查和制备每一个试验样品，准备“待测”状态下的最终试验样品。

6.3 试验环境

除另有规定外，试板的状态调节、试验的温度和相对湿度应符合GB/T 9278的规定。

6.4 试验样板的制备

- 6.4.1 按产品明示的配比或稀释比例，按规定的配比或稀释搅匀后制板。如产品未明示稀释比例时，搅拌均匀后制板。若产品明示了稀释比例范围时，应取其中间值。
- 6.4.2 除另有规定外，试验底材采用灭菌的不锈钢、铝、玻璃等不易生锈和吸潮的材质，尺寸为 50 mm × 50 mm。不锈钢板的材质和处理由有关方商定，铝板、玻璃板的材质和处理应符合 GB/T 9271—2008 的规定。除另有规定外，按照产品规定的配套体系品种、涂装道数、涂装时间间隔、涂膜厚度、养护条件等要求进行制板。
- 6.4.3 按 6.4.2 要求制备空白对照试板(B 样)，该空白对照试板(B 样)使用的涂料不含任何抗病毒剂、抗菌剂、防霉剂、防腐剂等助剂。试板尺寸为 50 mm × 50 mm。

注：空白对照板购买信息可从全国涂料和颜料标准化技术委员会秘书处获得。

6.4.4 抗细菌性能、抗霉菌性能和抗病毒性能测试用样品（C样）数量分别为3片、3片和9片。

6.4.5 抗细菌性能、抗霉菌性能和抗病毒性能测试用空白对照样（B样）数量分别为3片、3片和12片。

6.5 试验样板的预处理

6.5.1 针对非吸水性涂料，试验前试板需进行灭菌处理，一般可采用紫外照射30min的方式，也可以选择其他合适的方法。

6.5.2 针对吸水性涂料，试验前试板先进行灭菌处理再进行泡水处理，灭菌处理一般可采用紫外照射30min的方式，泡水处理是将50mm×50mm消毒过的样板倒置于装有20ml无菌水的平皿中，泡水1h后取出，正面朝上，简单用滤纸擦拭表面水分，待样品表面没有水珠后，再进行下一步试验。

6.6 抗细菌性能试验

抗细菌性能按照附录A规定的方法进行试验。

6.7 抗霉菌性能试验

按GB/T 1741—2020的规定进行。

6.8 抗病毒性能试验

抗病毒性能按照附录B规定的方法进行试验。

6.9 抗细菌、抗霉菌、抗病毒耐久性能试验

6.9.1 试板老化处理方法一：紫外照射

采用1支30 W、波长253.7 nm的符合GB/T 19258.1—2022的紫外灯，紫外灯距离试板0.8 m~1.0 m，照射100 h。

6.9.2 试板老化处理方法二：耐洗刷

试板按GB/T 9266—2009的方法进行耐洗刷试验，洗刷次数350次，室温晾干。

6.9.3 耐久性试验

针对非吸水性涂料，试板老化处理方法两种可选其一；针对吸水性涂料，试板老化处理方法仅选用紫外照射。

经老化处理后的试板，抗细菌耐久性能按附录A规定的方法进行试验，抗霉菌耐久性能按GB/T 1741—2020规定的方法进行试验，抗病毒耐久性能按附录B规定的方法进行试验。

7 检验规则

型式检验项目包括本文件所列的全部技术要求，有下列情况之一时需进行型式检验：

- a) 新产品的定型鉴定时；
- b) 生产配方、工艺及原材料有较大改变时；
- c) 正常生产时，每年至少检验一次；
- d) 停产半年以上恢复生产时。

8 检验结果的判定

8.1 检验结果的判定按GB/T 8170—2008中修约值比较法进行。

8.2 应检项目的检验结果均达到本文件要求时，则产品符合本文件要求。如有一项检验结果未达到本文件要求时，应对保存样品进行复验，如复验结果仍未达到本文件要求时，该产品为不符合本文件要求。

8.3 性能指标都到达Ⅰ级，则判定产品符合本文件Ⅰ级要求；如果1个性能指标达到Ⅰ级，另一个性能指标为Ⅱ级，则按Ⅱ级判定。

9 标志、包装和贮存

9.1 标志

9.1.1 产品包装标志除应符合 GB/T 9750 的规定外，检验合格的产品可在包装标志上明示。

9.1.2 标志或说明书应明确施工状态下的施工配比。

9.1.3 标志或说明书应清晰标明符合本文件的分类和产品等级。

9.2 包装

按GB/T 13491中各级包装要求的规定进行。

9.3 贮存

产品贮存时应保证通风、干燥，防止日光直接照射；应采取适当防冻、防潮或防火措施；产品应根据其类型定出贮存期，并在包装标志上明示。

附 录 A (规范性) 抗细菌性能试验方法

A.1 试验原理

本方法通过定量接种细菌于待检验试板上，用贴膜的方法使细菌均匀接触试板，经过一定时间的培养后，检测试板中的活菌数，并计算出试板的抗细菌率。

A.2 仪器设备和材料

A.2.1 生物安全柜：符合YY 0569—2011要求的Ⅱ级及以上生物安全柜。

A.2.2 恒温培养箱：温度 0℃~50℃、精度±1℃。

A.2.3 恒温恒湿培养箱：温度 0℃~50℃、精度±1℃，相对湿度范围20%~98%，精度±5%。

A.2.4 冷藏箱：温度0℃~5℃。

A.2.5 高压灭菌锅：温度(121±2)℃、压力(103±5) kPa。

A.2.6 覆盖膜：聚乙烯薄膜，分无孔膜和144孔膜（等间距，等孔径）两种，尺寸均为(40±2) mm×(40±2) mm×(0.05~0.10) mm。

A.2.7 其他微生物学试验耗材：灭菌平皿、灭菌试管、灭菌移液管、接种环、酒精灯等。

A.3 培养基和试剂

A.3.1 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—2008中三级水要求的蒸馏水或去离子水。

A.3.2 营养肉汤培养基(NB)

A.3.2.1 营养肉汤培养基(NB)组分

营养肉汤培养基(NB)组分见表A.1。

表 A.1 营养肉汤培养基(NB)组分

试剂名称	添加量/g
牛肉膏	5.0
蛋白胨	10.0
氯化钠	5.0

A.3.2.2 制备方法

取上述成分依次加入1 000 mL蒸馏水中，加热溶解后，用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值为7.0~7.2，分装后置高压灭菌锅(A.2.5)内，(121±2)℃灭菌30min。

A.3.3 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氢氧化钠溶液调节pH值为7.0~7.2，分装后置高压灭菌锅(A.2.5)内，(121±2)℃灭菌30min。

A.3.4 消毒剂

70%（体积分数）乙醇溶液。

A.3.5 洗脱液

含0.85%（质量分数）氯化钠的生理盐水。为便于洗脱可加入0.2%（质量分数）无菌表面活性剂（如吐温80）。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7.0~7.2，分装后置高压灭菌锅（A.2.5）内，（121±2）℃灭菌30min。

A.3.6 培养液

营养肉汤（NB）和生理盐水的混合溶液。建议大肠杆菌培养液中营养肉汤（NB）和生理盐水溶液的体积比为1:500，金黄色葡萄球菌培养液中营养肉汤（NB）和生理盐水溶液的体积比为1:100。为便于细菌分散可加入少量无菌表面活性剂（如吐温80）。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7.0~7.2，分装后置高压灭菌锅（A.2.5）内，（121±2）℃灭菌30min。

A.4 试验菌种

抗菌性能试验所用菌种见表A.2。经有关方商定后，可增加其他试验菌种。

表 A.2 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	staphylococcus aureus	CGMCC 1.89
大肠埃希氏菌	escherichia coli	CGMCC 1.90
^a CGMCC 为中国普通微生物菌种保藏管理中心。		

A.5 样品

A.5.1 阴性对照样品

编号A，是直径90 mm或100 mm的灭菌培养皿的50 mm×50 mm内平板。

A.5.2 空白对照试板

编号B，是按6.4.2方法制备的未添加抗菌成分的涂料试板。

A.5.3 抗菌涂料试板

编号C，是按6.4.2方法制备的添加抗菌成分的涂料试板。

A.6 操作步骤

A.6.1 菌种保藏

将菌种接种于营养琼脂培养基（NA）（A.3.3）斜面上，在（37±1）℃的恒温培养箱（A.2.2）中培养24 h后，在（0~5）℃的冷藏箱（A.2.4）中保藏（不得超过1个月），作为斜面保藏菌。

A.6.2 菌种活化

使用保藏时间不超过2周的菌种，将斜面保藏菌转接到平板营养琼脂培养基（NA）（A.3.3）上，在（37±1）℃的恒温培养箱（A.2.2）中培养18 h~20 h，试验时应采用连续转接2次后的新鲜细菌培养物（24 h内转接的）。

A.6.3 菌悬液制备

在酒精灯火焰上方用接种环从A.6.2培养基上取少量（刮1环~2环）新鲜细菌，加入培养液（A.3.6）中，并依次做10倍递增稀释液至灭菌试管中，选择菌液浓度为（5.0~10.0）×10⁵ cfu/mL的稀释液作为试验用菌液，按GB 4789.2—2022的方法操作。

A.6.4 样品接种

分别用移液管取0.4 mL~0.5 mL试验用菌液A.6.3滴加在阴性对试样(A)、空白对试样(B)和抗菌涂料试样(C)上。

将覆盖膜(A.2.6)用消毒剂(A.3.4)浸泡10min,再用灭菌后的去离子水冲洗,自然干燥后用灭菌镊子夹起覆盖膜(A.2.6),分别覆盖在试样(A)、试样(B)和试样(C)菌液上,针对吸水性涂料采用多孔膜覆盖,针对非吸水性涂料采用无孔膜覆盖。轻压覆盖膜(A.2.6)使膜下的菌液铺平并分散到膜的各个边缘,使膜下无气泡、菌液均匀接触样品,置于灭菌平皿中,在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度不小于90%的恒温恒湿培养箱(A.2.3)中培养24 h。

A.6.5 洗脱、计数

A.6.5.1 “0”接触时间试片的洗脱、计数

将阴性对试样(A)和3片“0”接触时间的空白对试样(B)分别加入10 mL洗脱液(A.3.5)充分洗脱,洗液按10倍梯度稀释至合适浓度,并接种于平板计数琼脂(NA)中,在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱(A.2.2)中培养24 h~48 h后,按照GB 4789.2—2022的方法进行活菌计数。

A.6.5.2 培养后试样的洗脱、计数

取出培养24 h后的样品,分别加入10 mL洗液,反复冲洗试样(B)、试样(C)及覆盖膜(A.2.6)(可将覆盖膜冲洗到灭菌聚乙烯袋中混匀),充分摇匀后,洗液按10倍梯度稀释至合适浓度并接种于平板计数琼脂(NA)中,在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱(A.2.2)中培养24 h~48 h后,按照GB 4789.2—2022的方法进行活菌计数。

A.7 检验结果计算

A.7.1 试验有效条件

只有下述3个条件全部成立,试验被判定有效。反之,则试验无效,须重新进行试验。

a) 空白对试样(B)“0”接触时间的菌落数满足公式(A.1)给出的条件:

$$\frac{L_{\text{最大}} - L_{\text{最小}}}{L_{\text{平均}}} \leq 0.2 \quad (\text{A.1})$$

式中:

$L_{\text{最大}}$ ——菌落数的最大对数值;

$L_{\text{最小}}$ ——菌落数的最小对数值;

$L_{\text{平均}}$ ——三个试样的菌落数对数的平均值。

b) “0”接触时间阴性对试样(A)的活菌值和空白对试样(B)的活菌平均值应为 $3\times 10^3\text{ CFU}\sim 9\times 10^3\text{ CFU}$ 。

c) 3个空白对试样(B)经24 h培养后的菌落数均不小于 $1.0\times 10^2\text{ CFU}$ 。

A.7.2 抗细菌率的计算

试验有效条件下,抗细菌率按公式(A.2)进行计算:

$$R = \frac{B-C}{B} \times 100\% \quad (\text{A.2})$$

式中:

R ——抗细菌率,数值取四位有效数字,以百分数表示, %;

B ——空白对试样培养24 h后平均菌落计数的数值,单位为菌落数(CFU);

C ——抗菌涂料试样培养24 h后平均菌落计数的数值,单位为菌落数(CFU)。

A.8 检验报告

试验报告至少应包括以下信息:

- 注明采用本文件;
- 试验起始日期及试验环境等基本信息;
- 空白对试样及抗菌试样的制备过程及底材;
- 试验菌种、细菌的菌株号;

- e) 试验接种液的体积；
- f) 接种液的细菌浓度；
- g) 试验接触时间；
- h) 试验中空白对照样及抗菌试样上回收得到的活菌数；
- i) 结果，抗细菌率、抗细菌耐久性能、及对应的耐久老化处理方法；
- j) 试板尺寸（与文件不同时）；
- k) 任何与本文件的偏离。

附录 B

(规范性)

抗病毒性能试验方法——蚀斑法或 TCID₅₀ 法

B.1 试验原理

本方法将病毒接种于制备好的样品上,经特定的接触时间后,通过比较试样和对照样中计数到的存活病毒的值来计算病毒的减少率。可以采用蚀斑法或TCID₅₀法来计算感染性病毒滴度。

注:实验室能根据自身的实验条件和实验技术选择合适的病毒计算方法。

B.2 仪器设备和材料

- B.2.1 高压灭菌锅: 温度 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$, 压力 (103 ± 5) kPa。
- B.2.2 CO₂培养箱: $(5 \pm 0.5)\%$ CO₂、温度 $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。
- B.2.3 干热灭菌箱: 温度 $(160 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 $(180 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。
- B.2.4 生物安全柜: 符合YY 0569—2011要求的II级及以上生物安全柜。
- B.2.5 水浴锅: 温度 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、 $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ 或 $(56 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。
- B.2.6 冰箱: 温度 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 、 $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 $(-80 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。
- B.2.7 离心机: 温度 $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, 1 000 g。
- B.2.8 倒置显微镜: 用于培养细胞的观察。
- B.2.9 恒温恒湿培养箱: 温度 $0^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 、精度 $\pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度范围20%~98%, 精度 $\pm 5\%$ 。
- B.2.10 细胞培养板: 用于蚀斑试验的6孔板, 用于TCID₅₀试验的96孔板。
- B.2.11 细胞培养瓶: 经 γ 射线灭菌后具有一定培养面积和带过滤膜瓶盖的细胞培养瓶。瓶盖的滤膜用0.2 μm 滤膜来交换空气。
- B.2.12 可调移液器: 量程10 $\mu\text{L} \sim 100 \mu\text{L}$, 100 $\mu\text{L} \sim 1\,000 \mu\text{L}$, 1 mL~5 mL。
- B.2.13 过滤器: 过滤膜的孔径为 0.22 μm 。
- B.2.14 覆盖膜: 聚乙烯薄膜, 分无孔膜和144孔膜(等间距, 等孔径)两种, 尺寸均为 $(40 \pm 2) \text{ mm} \times (40 \pm 2) \text{ mm} \times (0.05 \sim 0.10) \text{ mm}$ 。
- B.2.15 其他微生物学试验耗材: 培养皿、量筒、试管、烧杯、离心管等。

B.3 培养基和试剂

B.3.1 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—2008中三级水要求的蒸馏水或去离子水。

使用的试剂和材料需满足生物学实验室要求,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。

B.3.2 最低必须培养基

EMEM培养基。

B.3.3 7.5%碳酸氢钠溶液

将75 g碳酸氢钠溶于800 mL水中,定容至1 000 mL配成7.5% (质量分数) 碳酸氢钠溶液。使用过滤器(B.2.13)对溶液进行过滤除菌。配制后如不立即使用,应置于 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 环境下保存。保存期限不超过1个月。

B.3.4 甲醛溶液

将100 mL 37%（质量分数）甲醛溶液加到900 mL的水中制备甲醛溶液。配制后如不立即使用，应置于20℃～25℃环境下保存。保存期限不超过1个月。

注：能使用其他经验证合格的细胞固定液。

B.3.5 亚甲基蓝溶液，用于细胞染色

取0.375 g亚甲基蓝和62.5 μL 1 mol/L氢氧化钠溶液，溶于1 000 mL的水中制备亚甲基蓝溶液。配制后如不立即使用，应置于20℃～25℃环境下保存。保存期限不超过1个月。

B.3.6 亚灭活胎牛血清（FBS）

把低温贮藏的胎牛血清于(37±2)℃水浴解冻溶解。然后，将水浴锅(B.2.5)的水温升温至(56±2)℃后再维持30min灭活，分装后置于(-20±2)℃冰箱(B.2.6)里保存。使用前，于(37±2)℃水浴解冻。

B.3.7 生长培养基

分别取9.53 g最低必需培养基(B.3.2)、60 mg硫酸卡那霉素，在800 mL水中充分溶解，定容至1 000 mL，使用过滤器(B.2.13)对溶液进行过滤除菌。在上述溶液里加入15 mL7.5%（质量分数）碳酸氢钠溶液(B.3.3)和100 mL热灭活胎牛血清，充分混匀。配制后如不立即使用，应置于2℃～8℃环境下保存。保存期限不超过1个月。如购买的商品化EMEM培养基配方中不含L-谷氨酰胺，需先将L-谷氨酰胺过滤除菌，并添加至培养基中。

B.3.8 维持培养基

取9.53 g最低必需培养基(B.3.2)、60 mg硫酸卡那霉素溶于800 mL水中，定容至1 000 mL。使用过滤器(B.2.13)对溶液进行过滤除菌。在上述溶液里加入15 mL7.5%（质量分数）碳酸氢钠溶液(B.3.3)，充分混匀。配制后如不立即使用，应置于2℃～8℃环境下保存。保存期限不超过1个月。如购买的商品化EMEM培养基配方中不含L-谷氨酰胺，需先将L-谷氨酰胺过滤除菌，并添加至培养基中。

B.3.9 双倍浓度维持培养基

取19.06 g最低必需培养基(B.3.2)、120 mg硫酸卡那霉素溶于800 mL水中，定容至1 000 mL。使用过滤器(B.2.13)对溶液进行过滤除菌。配制后如不立即使用，应置于2℃～8℃环境下保存，保存期限不超过1个月。如购买的商品化EMEM培养基配方中不含L-谷氨酰胺，需先将L-谷氨酰胺过滤除菌，并添加至培养基中。

B.3.10 0.01 mol/L磷酸缓冲液PBS（一）

将氯化钠8.0 g，氯化钾0.2 g，十二水合磷酸氢二钠2.9 g，磷酸二氢钾0.2 g溶解于800 mL水中并混合均匀，定容至1 000 mL。在温度(121±2)℃，压力(103±5) kPa的高压灭菌锅(B.2.1)中保持15min。配制后如不立即使用，应置于2℃～8℃环境下保存，保存期限不超过1个月。

B.3.11 牛胰蛋白酶PBS溶液（一）

B.3.11.1 取0.01 mol/L磷酸缓冲液PBS（一）(B.3.10)100 mL，从牛胰腺提取的牛胰蛋白酶1.0 g，溶解充分混合2 h，混合液使用过滤器(B.2.13)过滤，过滤后未使用的分装在试管保存于(-80±2)℃的冰箱(B.2.6)中。

B.3.11.2 牛胰蛋白酶PBS溶液（一）制备：取0.01 mol/L磷酸缓冲液PBS（一）(B.3.10)9 mL，上述混合液(B.3.11.1)1 mL，溶解充分混合2 h，保存在(-20±2)℃的冰箱(B.2.6)中。使用前，置于(37±2)℃的水浴锅(B.2.5)中直至解冻。

B.3.12 胰蛋白酶-EDTA溶液

将0.01 mol/L磷酸缓冲液PBS（一）(B.3.10)1 000 mL、蛋白酶2.5 g、硫酸卡那霉素0.1 g、两性霉素B 2 mg、0.014 mol EDTA，溶解充分并混合。混合液使用过滤器(B.2.13)过滤，保存在(-20±2)℃的冰箱(B.2.6)中。使用前，置于(37±2)℃的水浴锅(B.2.5)中直至解冻。

注：胰蛋白酶-EDTA溶液能使用商品化成品。配方不同的经验证合格后使用。

B. 3. 13 DEAE-葡萄糖溶液

20 g DEAE-葡萄糖溶于1 000 mL水中制备DEAE葡萄糖溶液。使用过滤器(B. 2. 13)过滤除菌。配制后如不立即使用, 应置于2℃~8℃环境下保存, 保存期限不超过1个月。

B. 3. 14 用于蚀斑试验的琼脂培养基**B. 3. 14. 1 A 溶液**

将10 mL DEAE-葡萄糖溶液(B. 3. 13)和40 mL 7. 5%碳酸氢钠溶液(B. 3. 3)加入1 000 mL双倍浓度维持培养基(B. 3. 9)中, 充分混匀。对流感病毒蚀斑试验时, 添加3 mL牛胰蛋白酶PBS溶液(一)(B. 3. 11)。使用前, 把溶液放(37±2)℃的水浴锅(B. 2. 5)温浴。

B. 3. 14. 2 B 溶液

取细胞培养琼脂15 g, 加水1 000 mL, 混合均匀。使用高压灭菌锅(B. 2. 1)灭菌, 温度(121±2)℃, 压力(103±5) kPa, 15min。上述溶液在水浴锅(B. 2. 5)中保持50℃~60℃至使用。

B. 3. 14. 3 琼脂培养基的制备

琼脂培养基用于斑蚀试验, 使用前, 等比混合A溶液和B溶液(体积比1:1)。

B. 3. 15 卵磷脂吐温大豆酪蛋白培养液(SCDLP培养基)

将酪蛋白胨17. 0 g, 大豆蛋白胨3. 0 g, 氯化钠5. 0 g, 磷酸氢二钾2. 5 g, 葡萄糖2. 5 g, 卵磷脂1. 0 g, 溶解于1 000 mL水中并充分混合, 添加7. 0 g非离子表面活性剂吐温80, 充分混合。在水浴保持25℃并用氢氧化钠或盐酸调节pH为7. 0±0. 2。使用高压灭菌锅(B. 2. 1)灭菌, 温度(121±2)℃, 压力(103±5) kPa, 15min。配制后如不立即使用, 应置于2℃~8℃环境下保存, 保存期限不超过1个月。

B. 4 试验准备**B. 4. 1 细胞复苏**

将低温储存的宿主细胞置于(37±2)℃水浴, 使其迅速融化。在T75细胞培养瓶(B. 2. 11)里加入20 mL细胞生长培养基(B. 3. 7), 再加入解冻的宿主细胞。将细胞培养瓶(B. 2. 11)置于CO₂培养箱(B. 2. 2)中, (37±2)℃培养24 h。使用倒置显微镜(B. 2. 8)观察细胞是否贴壁长满。若细胞长满后按照宿主细胞传代培养的步骤开始连续传代, 若没长满, 继续培养。

B. 4. 2 宿主细胞传代培养

B. 4. 2. 1 确认 B. 3. 1 宿主细胞生长到 90%以上后, 弃掉培养瓶旧培养基, 添加 5 mL 牛胰蛋白酶 PBS 溶液(一)(B. 3. 11)洗涤细胞, 洗涤 2 次。添加 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 溶液(B. 3. 12), 将细胞培养瓶(B. 2. 11)置于 CO₂ 培养箱(B. 2. 2)中, 在(37±1)℃环境下保持(5±1)min, 随时观察瓶中的细胞, 如果从瓶壁脱落, 加入 5 mL 细胞生长培养基(B. 3. 7), 轻轻吹打分散细胞, 此过程应避免细胞损伤。

B. 4. 2. 2 取一个新的细胞培养瓶(B. 2. 11), 加入 1 mL 细胞悬液(B. 4. 2. 1), 并补足细胞生长培养基(B. 3. 7)至 20 mL。将细胞培养瓶(B. 2. 11)置于 CO₂ 培养箱(B. 2. 2)中, (37±1)℃培养, 视细胞生长情况可传代或换液。

B. 4. 3 试验用细胞预培养

样品测试前一天, 将传代细胞铺板用于病毒滴度的测定。蚀斑法使用6孔板, 铺好细胞后, 将细胞培养板(B. 2. 10)置于CO₂培养箱(B. 2. 2)中, 在(37±1)℃环境下培养18 h~24 h, 待细胞长满后备用。TCID₅₀法使用96孔板, 将宿主细胞接种至96孔细胞培养板(B. 2. 10)中, 待细胞生长汇合至单层时备用。

B. 4. 4 测试病毒的准备**B. 4. 4. 1 病毒株和宿主细胞**

本文件使用的病毒、宿主细胞、介质和培养条件见表B.1。依据使用要求，可增加选用其他商定病毒作检验病毒。

表 B.1 本文件使用的病毒、宿主细胞和介质

病毒种类	流感病毒	肠道病毒
病毒株	甲型流感病毒 (H3N2)	EV71
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±1) °C, (5±0.5)% CO ₂	(37±1) °C, (5±0.5)% CO ₂
病毒株、细胞可从有相应资质的机构获取。其他宿主细胞、培养基经验证后也可使用。		

B.4.4.2 病毒悬液制备

B.4.4.2.1 移除已培养好单细胞的培养瓶中的培养基，使用新鲜的细胞维持培养基 (B.3.8) 清洗培养细胞表面 2 次。

B.4.4.2.2 准备好长满的宿主细胞。将冷冻的病毒放入 (37±2) °C 的水浴锅 (B.2.5) 中使其迅速解冻，并将其转移到一个新的试管中，用维持培养基 (B.3.8) 将其稀释到 10³ PFU/mL (或 TCID₅₀/mL) ~ 10⁴ PFU/mL (或 TCID₅₀/mL)。接种 1 mL 稀释好的病毒液置于细胞培养瓶 (B.2.11) 中的细胞表面 (B.4.4.2.1)，使其覆盖均匀。将细胞培养瓶 (B.2.11) 放入 CO₂ 培养箱 (B.2.2) 培养 1 h~2 h，使病毒吸附细胞，补足适量维持培养基 (B.3.8) 至细胞培养瓶 (B.2.11)，并将细胞培养瓶 (B.2.11) 放入 CO₂ 培养箱 (B.2.2) 培养 1 d~3 d 增殖病毒，其中流感病毒采用含 0.15% 牛胰腺提取胰蛋白酶的维持培养基 (B.3.8)，EV71 采用维持培养基 (B.3.8) 培养 (其余培养条件见表 B.1)。

B.4.4.2.3 逐日观察细胞病变，判断病毒的增殖情况，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，使用离心机 (B.2.7) 于 (4±1) °C、1 000 g 离心力下离心 15min。离心后取上清液，即为病毒混悬液。按适当体积将病毒液分装置 (-80±2) °C 环境下保存。

B.4.4.2.4 通过蚀斑或 TCID₅₀ 方法检测病毒滴度，测定病毒滴度是否大于 10⁷ PFU/mL (或 TCID₅₀/mL，部分病毒滴度可小于 10⁷ PFU/mL)，如滴度小于 10⁷ PFU/mL (或 TCID₅₀/mL)，则从头开始重新制备。使用前将冷冻的病毒放入 (37±2) °C 的水浴锅 (B.2.5) 中使其迅速解冻，解冻后即检测用的病毒悬液，若不立即使用可暂存于 2 °C~8 °C 冰箱 (B.2.6)，但不得超 12 h。

注1：若选用的其它病毒 (如人冠状病毒 HCoV-229E) 滴度无法满足 10⁷ PFU/mL (或 TCID₅₀/mL)，则至少满足对照组回收病毒滴度不小于 10⁵ PFU/mL (或 TCID₅₀/mL)。

注2：实验室能够根据实验技术能力和经验，选择其他文献报道的有效的病毒繁殖方法。

B.4.5 样品

B.4.5.1 阴性对照样品

编号A，是直径 90 mm 或 100 mm 的灭菌培养皿的 50 mm×50 mm 内平板。

B.4.5.2 空白对照试板

编号B，是按 6.4.2 制备的未添加抗病毒成分的涂料试板。

B.4.5.3 抗病毒涂料试板

编号C，是按 6.4.2 制备的添加抗病毒成分的涂料试板。

B.5 试验程序

B.5.1 预试验

B.5.1.1 预试验目的

预实验目的是确定检测样品洗脱液（中和剂）吸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。

B.5.1.2 细胞毒性试验

细胞毒性试验步骤如下：

- 取空白对照试板（B样）及抗病毒试板（C样）各3片，分别放在灭菌培养皿中，测试面朝上，加入10 mL SCDLP培养基（B.3.15）或其他经验证有效的中和剂，使用移液器吹打4次以上，以确保试样经过充分清洗。以洗脱液作为试验样液，采用蚀斑法或TCID₅₀法测试，观察细胞有无病变；
- 若未观察到细胞毒性，继续下一步骤；
- 若观察到有细胞毒性，则需酌情更改、修改培养基配方或增加中和剂的使用量。若采用10 mL中和剂回收洗脱有困难，则可增加中和剂溶液用量；
- 若中和剂配方修改、更改或增加，则在后续试验中应使用相同的洗脱液或中和剂。

B.5.1.3 细胞对病毒的敏感性和中和效果验证试验

B.5.1.3.1 试验步骤

取空白对照试板（B样）及抗病毒试板（C样）各3片，放在培养皿中，加入10 mL SCDLP培养基（B.3.15）或其他经验证有效的中和剂，使用移液器吹打，以确保试样经过充分清洗。从各皿中分别取出5 mL SCDLP肉汤回收液到6支新试管中。另取3支试管，分别加入5 mL SCDLP培养基（B.3.15）作为阴性对照。加50 μL制备好的浓度为 $(4\sim6) \times 10^4$ PFU/mL（或TCID₅₀/mL）的病毒悬液至上述9支试管中， $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 放置30 min。作用结束后，采用蚀斑法或TCID₅₀法测试阴性对照、空白对照试板（B样）及抗病毒试板（C样）的洗脱回收液中病毒的滴度。

B.5.1.3.2 试验有效性的条件

将阴性对照与空白对照试板（B样）及抗病毒试板（C样）回收得到的病毒滴度做比较，其对数值应满足公式（B.1）和公式（B.2）的要求：

$$|S_n - S_u| \leq 0.5 \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

$$|S_n - S_t| \leq 0.5 \dots\dots\dots (\text{B.2})$$

式中：

S_n ——三个SCDL培养基（B.3.15）阴性对照组回收的平均病毒滴度对数值，单位为lg(PFU/mL)或lg(TCID₅₀/mL)；

S_u ——三个空白对照试板（B样）回收的平均病毒滴度对数值，单位为lg(PFU/mL)或lg(TCID₅₀/mL)；

S_t ——三个抗病毒试板（C样）回收的平均病毒滴度对数值，单位为lg(PFU/mL)或lg(TCID₅₀/mL)。

若以上结果超过0.5，中和剂的配方应该酌情修改或者更改，或增加中和剂的量。

若中和剂的配方修改或更改，或增加用量，则在正式试验中应用相同的中和剂。

B.5.2 正式实验

B.5.2.1 试验准备

取制备好的空白对照试板（B样）6片，抗病毒试板（C样）3片，分别放入灭菌培养皿中，测试面朝上。空白对照试板3片用于接种后立即回收测试病毒滴度，另3片用于测定接种后24 h的病毒滴度。

注：在对同一材料进行一系列不同抗病毒处理时，若所有抗病毒试样都同时采用相同病毒液进行检测，则每种抗病毒处理只要一组空白对照样作为对照。

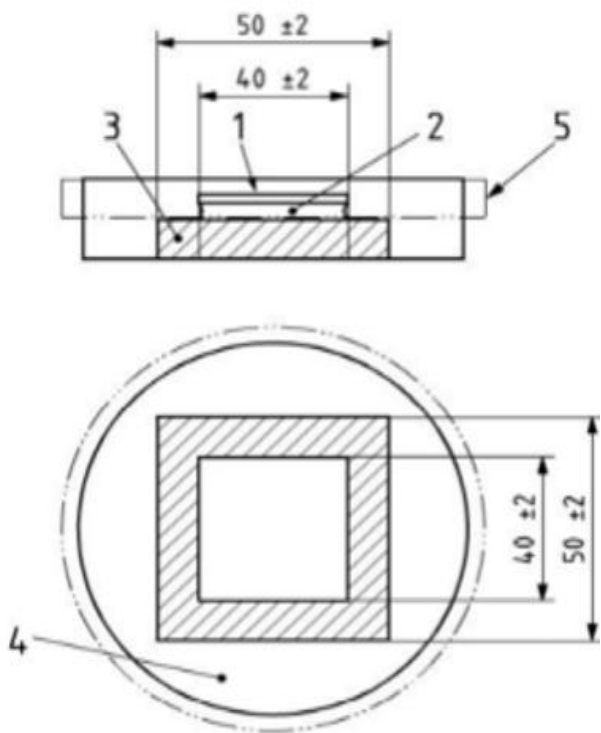
B.5.2.2 试验接种

按照检测病毒的制备步骤，制备试验用病毒。试验前，将冷冻的病毒置于 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的水浴锅（B.2.5）中，使其迅速融化。用维持培养基（B.3.8）将病毒悬液浓度调整在 1×10^7 PFU/mL（或TCID₅₀/mL） $\sim 5 \times$

10⁷ PFU/mL（或TCID₅₀/mL）之间作接种液，若接种液不立即使用，可暂存于（4±1）℃的冰箱（B. 2. 6）中，不得超过12 h。

用可调移液管（B. 2. 12）吸取0. 4 mL接种液，滴到每个试样表面。将144孔覆盖膜（B. 2. 14）用70%（体积分数）乙醇溶液浸泡10min，再用灭菌后的去离子水冲洗，自然干燥后将制备好的覆盖膜（B. 2. 14）（尺寸为40 mm×40 mm）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。试样培养和覆盖膜（B. 2. 14）的放置见图B. 1。

单位为毫米



标引序号说明：

- 1——144孔覆盖膜；
- 2——试验培养物（0. 4 mL）；
- 3——试样；
- 4——培养皿；
- 5——培养皿盖。

- 注1：覆盖膜的标准尺寸为（40±2）mm×（40±2）mm，呈正方形。若试样不是标准尺寸，则按比例修改薄膜的尺寸，但覆盖膜的尺寸不小于400 mm²，且覆盖膜与和试样之间各个边缘的间隙始终为2. 5 mm至5. 0 mm，在测试报告中说明覆盖膜实际使用尺寸。若根据覆盖膜，正比调节所用培养物的体积和浓度，则在测试报告中说明相关内容。
- 注2：试验培养物不能泄漏出覆盖膜的边缘。若在亲水表面防止此类泄漏有困难，则可根据下述方法进行处理：
- a) 减少应用于试验表面的试验培养物的体积，但是不能使用少于0. 1 mL的试验培养物。当减少试验培养物的体积时，增加培养物中的病毒感染性滴度的浓度，以提供与使用正常体积试验培养物相同的病毒传染性滴度；
 - b) 通过添加惰性增稠剂（例如琼脂）来增加试验培养物的粘度，以防止泄漏。相应的处理方法在测试报告中说明。

图 B. 1 试样培养和覆盖膜的放置图

B. 5. 2. 3 接种后试样的培养

除另有规定外，接种后的试板（包括空白对照试板）的培养皿，在恒温恒湿培养箱（B.2.9）中于（25±1）℃、相对湿度不小于90%的条件下培养24 h。也可以选择其他培养时间，但不超过24 h，并在报告中注明。

B.5.2.4 病毒的洗脱回收

B.5.2.4.1 接种后，立即对已接种的3片空白对照试板（B样）进行病毒回收。在各培养皿中加入10 mL SCDLP 培养基（B.3.15）或其他适宜而有效的中和剂，在充分吹打（4次以上）以洗脱回收病毒。对回收得到的病毒洗脱液进行滴度测定。测定方法见 B.5.3。

注1：若中和剂的体积或成分更改，在试验报告中注明。中和剂的体积更改时在计算时予以考虑。

注2：能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，其有效性充分证实后才能使用，并在报告中注明。

B.5.2.4.2 按 B.5.2.3 的规定培养 24h 后，按 B.5.2.4.1 处理 3 片空白对照试板（B 样）和 3 片抗病毒试板（C 样），然后立即对试样上的病毒滴度进行测定。

B.5.3 病毒滴度的计数

B.5.3.1 病毒滴度计数方法

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TCID₅₀法等试验方法进行病毒滴度的计数。

B.5.3.2 蚀斑法

B.5.3.2.1 操作步骤如下：

- 在6孔细胞培养板（B.2.10）的每个孔内培养单层细胞，并用倒置显微镜（B.2.8）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（B.3.7）。加适量细胞维持培养基（B.3.8）洗掉残留的生长培养基（B.3.7），重新洗2次；
- 洗脱液原液及每个梯度的稀释液均接种2孔用于测试，接种量0.1 mL。如果原液接种到第一个孔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，接种维持培养基（B.3.8），做阴性对照；
- 将接种后的6孔板置于表（B.2）所列温度的CO₂培养箱（B.2.2）中，孵育1 h，以便使病毒吸附到细胞上。每隔15min摇一下细胞板，让病毒悬液充分和细胞接触。培养后，取2 mL～3 mL 维持培养基（B.3.8）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（B.3.14）做蚀斑试验，盖上盖子并放室温10min左右让琼脂培养基（B.3.14）凝固。待琼脂培养基（B.3.14）凝固后，倒置细胞板，放入5% CO₂培养箱（B.2.2）中，流感病毒于（34±1）℃环境下培养4 d～7 d，肠道病毒于（37±1）℃环境下培养2 d～3 d。然后，从培养箱中把细胞板拿出来，放正，添加3 mL的甲醛溶液（B.3.4）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（B.3.14），添加3 mL 亚甲基蓝溶液（B.3.5），室温下保持15min对细胞染色。染色完毕，弃掉亚甲基蓝溶液（B.3.5），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。

表 B.2 CO₂培养箱条件

病毒	流感病毒	EV71
吸附温度/℃	34	37
培养温度/℃		
注：适用于本文件规定的病毒及蚀斑法。		

B.5.3.2.2 PFU 的计算：从接种了不同稀释度病毒液的培养孔计数得到的蚀斑数量（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）。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，其空斑数量计算如表 B.3 所示，且其空斑数量按如下规定进行：

- 如果 C1~CN 系列中有一个蚀斑数为 6~60，则使用 6~60 作本测定的 PFU 值；
- 如果 C1<6 时，则使用 C1 作本测定的 PFU 值；
- 如果 C1<1，包括 0，则以 1 计算测试的 PFU 值。

表 B.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

B.5.3.3 TCID₅₀法

操作步骤如下：

- 在 96 孔细胞培养板 (B.2.10) 的每个孔内培养单层细胞，并用倒置显微镜 (B.2.8) 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 (B.3.7)。加 0.1 mL 细胞维持培养基 (B.3.8) 洗细胞表面，重复洗 2 次。
- 洗脱液原液及每个梯度的稀释液均接种 4~8 孔用于测试，接种量 0.1 mL，并以维持培养基 (B.3.8) 做阴性对照。
- 把 96 孔板放入 5% CO₂ 培养箱 (B.2.2) 孵育 1 h~2 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 (B.3.8)，洗板，弃掉多余的细胞维持培养基 (B.3.8)。
- 加入 0.1 mL 细胞维持培养基 (B.3.8) 后将 96 孔板放入 5% CO₂ 培养箱 (B.2.2) 培养 3 d~7 d。通过倒置显微镜 (B.2.8) 逐日观察细胞病变。确认细胞病变之后用 Behren-Karber 方法计算 TCID₅₀，得到每毫升采样液中的病毒数量 (TCID₅₀/mL)。

注：培养时间和温度能够随测试的病毒株不同而作出改变。

B.5.4 测试结果计算

B.5.4.1 病毒滴度计算

B.5.4.1.1 蚀斑法病毒滴度计算

对于每个试样，都按式 (B.3) 来计算病毒滴度：

$$N = \frac{10 \times C \times D \times V}{A} \dots\dots\dots (B.3)$$

式中：

N ——每个试样每平方厘米的病毒滴度，单位为每平方厘米噬斑数 (PFU/cm²)；

C ——两个孔的平均蚀斑数，单位为每 0.1 mL 形成的噬斑数 (PFU/0.1 mL)；

D ——稀释倍数；

V ——用于洗脱的 SCDLP 培养基 (B.3.15) 的体积，单位为毫升 (mL)；

A ——覆盖膜的表面积，单位为平方厘米 (cm²)。

计算每组试样回收病毒滴度的算术平均数，保留 2 位有效数字。

B.5.4.1.2 TCID₅₀病毒滴度计算

对于每个试样，都按照式 (B.4) 来计算病毒滴度：

$$N = \frac{10 \times C \times V}{A} \dots\dots\dots (B.4)$$

式中：

N ——每个试样每平方厘米的病毒滴度 (TCID₅₀/cm²)；

C ——TCID₅₀ 值；

V ——用于洗脱的 SCDLP 培养基 (B.3.15) 的体积，单位为毫升 (mL)；

A ——覆盖膜的表面积，单位为平方厘米（ cm^2 ）。

计算每组试样回收病毒滴度的算术平均数，保留2位有效数字。

B.5.4.2 试验有效条件

B.5.4.2.1 当以下给定的3个条件均得到满足时，试验才被认定为有效。反之，则试验无效，应重新进行试验。

B.5.4.2.2 空白对照试板（B样）接种后即时测得的蚀斑数的对数值应满足式（B.5）的要求：

$$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\text{mean}}} \leq 0.2 \quad (\text{B.5})$$

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），单位为 $\lg(\text{PFU}/\text{cm}^2)$ 或 $\lg(\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2)$ ；

L_{\min} ——试样上最小病毒滴度的常用对数值，单位为 $\lg(\text{PFU}/\text{cm}^2)$ 或 $\lg(\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2)$ ；

L_{mean} ——三个试样平均病毒滴度的常用对数值，单位为 $\lg(\text{PFU}/\text{cm}^2)$ 或 $\lg(\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2)$ 。

B.5.4.2.3 空白对照试板（B样）接种后即时测得的平均蚀斑数应在 $2.5 \times 10^5 \text{ PFU}/\text{cm}^2$ （或 $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）至 $1.2 \times 10^6 \text{ PFU}/\text{cm}^2$ （或 $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）的范围内。

B.5.4.2.4 当作用时间为2 h，0 h和24 h空白对照组对数降低值应 <1.0 ，当作用时间为24 h，0 h和24 h空白对照组对数降低值应 <2.0 。

B.5.4.3 抗病毒活性的计算

B.5.4.3.1 在试验被认为有效的情况下，用式（B.6）计算其抗病毒率，结果保留至小数点后两位：

$$R' = \frac{B' - C'}{B'} \times 100\% \quad (\text{B.6})$$

式中：

R' ——抗病毒率，%；

B' ——三个空白对照试板（B样）接种24 h后回收的平均滴度值，单位为每平方厘米噬斑数（ PFU/cm^2 ）或单位为每平方厘米半数组织培养感染剂量（ $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）；

C' ——三个抗病毒试板（C样）接种24 h后回收的平均滴度值，单位为每平方厘米噬斑数（ PFU/cm^2 ）或单位为每平方厘米半数组织培养感染剂量（ $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）。

B.5.4.3.2 在试验被认为有效的情况下，用式（B.7）计算其抗病毒活性值，结果保留至小数点后一位：

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (\text{B.7})$$

式中：

R ——抗病毒活性值；

U_t ——三个空白对照试板（B样）接种24 h后回收的平均滴度的常用对数值，单位为 $\lg(\text{PFU}/\text{cm}^2)$ 或 $\lg(\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2)$ ；

U_0 ——三个空白对照试板（B样）接种后即时回收测得的平均滴度的常用对数值，单位为 $\lg(\text{PFU}/\text{cm}^2)$ 或 $\lg(\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2)$ ；

A_t ——三个抗病毒试板（C样）接种24 h后回收的平均滴度的常用对数值，单位为 $\lg(\text{PFU}/\text{cm}^2)$ 或 $\lg(\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2)$ 。

B.6 试验报告

试验报告至少应包括以下信息：

- a) 注明采用本文件；
- b) 试验起始日期及试验环境等基本信息；

- c) 空白对照样及抗病毒试样的制备过程及底材；
 - d) 试验用毒株与宿主细胞类型和编号，如采用其他毒株和宿主细胞需说明原因；
 - e) 试验接种液的体积；
 - f) 接种液的病毒滴度；
 - g) 试验接触时间；
 - h) 试验中空白对照样及抗病毒试样上回收得到的病毒滴度；
 - i) 抗病毒活性值或抗病毒率；
 - j) 耐久老化处理方法；
 - k) 任何与本文件的偏离。
-