



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21866—XXXX  
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 antibacterial of paints film

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本稿完成时间：2024.6.29)

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

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 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4~8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) 增加了规范性附录A。

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：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。

本文件主要起草人：

本文件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墙面、家具、玩具、车辆内饰件、电子电器、电梯、五金件等表面，具有抗病毒和/或抗菌功能的涂膜。

## 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—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 9278 涂料试样状态调节和试验的温湿度

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 41918—2022 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**

采用化学或物理方法杀灭细菌或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

### 3.2

**抗病毒 antiviral**

通过化学或物理方法使病毒失去活性的过程。

## 4 抗病毒活性试验

### 4.1 概述

将病毒接种于制备好的样品表面，经接触一定的时间后，通过比较试样和对照样中的存活病毒数量计算抗病毒率，以抗病毒率来表征抗病毒活性。

## 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 $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，压力能保持 $(103\pm 5)\text{kPa}$ 。
- 4.3.2 干热灭菌箱：温度能保持 $160^{\circ}\text{C}\sim 180^{\circ}\text{C}$ ，波动不超过 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3.3 天平：精度 $0.1\text{g}$ ；精度 $0.1\text{mg}$ 。
- 4.3.4 水浴箱：温度能保持 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(56\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 和 $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3.5 二氧化碳培养箱：能保持温度 $(34\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 和5%二氧化碳浓度。
- 4.3.6 冰箱：温度能保持 $2^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 、 $(-20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 和 $(-80\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3.7 过滤器：孔径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 。
- 4.3.8 倒置显微镜。
- 4.3.9 pH计：精度 $\pm 0.2$ 。
- 4.3.10 液氮罐。
- 4.3.11 培养箱：温度能保持 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。
- 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 $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 和离心力 $10\ 000\text{g}$ 。
- 4.3.15 微生物实验室用的涡旋器、镊子、量筒、烧瓶、试管、烧杯、离心管等。
- 4.3.16 覆盖膜：聚乙烯薄膜，标准尺寸为 $(40\pm 2)\text{mm}\times (40\pm 2)\text{mm}$ 、厚度为 $(0.05\sim 0.10)\text{mm}$ 。

## 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—2008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毫升/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 $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌15 min后备用。

### 4.4.3 最低基础培养基（EMEM）

配方见附录A。使用商品培养基时，若有任何成分缺失，按配方表（见表A.1）添加。

### 4.4.4 7.5%碳酸氢钠溶液

将75 g碳酸氢钠溶于1 000 mL水中配成7.5%（质量分数）碳酸氢钠溶液，使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 过滤器（4.3.7）过滤除菌。制备后如不立即使用，置于 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 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℃~25℃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℃~25℃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)℃冰箱(4.3.6)保存,使用前将冰冻的胎牛血清置于(37±1)℃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(4.3.4)温度调至56℃,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最低基础培养基(EMEM)(见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%(质量分数)碳酸氢钠溶液(见4.4.4)和100 mL胎牛血清(见4.4.7)充分均匀。配制后如不立即使用,置于5℃~10℃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最低基础培养基(EMEM)(见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%(质量分数)碳酸氢钠溶液(见4.4.4)充分混匀。制备后如不立即使用,置于5℃~10℃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最低基础培养基(EMEM)(见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℃~10℃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,溶解并混合均匀加水定容至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℃~10℃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(见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低于-80℃冰箱(4.3.6)里保藏。使用前,于(37±1)℃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)℃的冰箱中。使用前,置于(37±1)℃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（见4.4.11）中，溶解并充分混匀，混合液使用孔径0.22  $\mu\text{m}$ 过滤器（4.3.7）过滤除菌。将溶液分装于试管后保存在 $(-20\pm 2)^\circ\text{C}$ 的冰箱（4.3.6）中。使用前，置于 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 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  $\mu\text{m}$ 过滤器（4.3.7）过滤除菌。制备后如不立即使用，置于 $5^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 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（见4.4.14）和40 mL 7.5%（质量分数）碳酸氢钠溶液（见4.4.4）加入1 000 mL双倍浓度维持培养基（见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（见4.4.12）。使用前把溶液放 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 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 $(60\pm 1)^\circ\text{C}$ 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 洗脱液（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 $7.0\pm 0.2$ 。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 $5^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 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 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 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（见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，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， $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养24 h。使用显微镜观察细胞。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）旧培养基，添加5 mL PBS（见4.4.11）洗涤细胞2次。移除PBS，添加1 mL $\sim$ 2 mL胰蛋白酶EDTA溶液（见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 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 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（见4.4.8），轻轻吹打分散细胞，此过程应避免细胞损伤。

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（4.5.2.1），并补足细胞生长培养基（见 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）℃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 可使用6孔板，TCID<sub>50</sub>法可使用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）℃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，可增加选用其他商定病毒作检验病毒。

表 1 病毒、宿主细胞和介质

病毒种类	甲型流感病毒	肠道病毒
病毒株	H3N2	EV71
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的细胞培养瓶（4.5.2.2）中的培养基，使用 PBS（见 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）℃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 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 3 mL 稀释后的流感病毒于培养好的细胞表面（4.5.4.2.1），并将其置于（34±1）℃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 30 μL 胰蛋白酶 PBS 溶液（见 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）℃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）℃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）℃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 10<sup>7</sup> PFU/mL（或 TCID<sub>50</sub>/mL），如滴度小于 10<sup>7</sup> PFU/mL（或 TCID<sub>50</sub>/mL），则从头开始制备。使用前将冷冻的病毒放入（37±1）℃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℃冰箱（4.3.6）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的细胞培养瓶（4.3.12）中的培养基，使用 PBS（见 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（37±1）℃水浴迅速解冻。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 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 3 mL 稀释后的肠道病毒 EV71 于培养好的细胞表面 (4.5.4.3.1)，并将其置于  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  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  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  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  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$  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  $(-80 \pm 2)^\circ\text{C}$  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  $10^7$  PFU/mL (或 TCID<sub>50</sub>/mL)，如滴度小于  $10^7$  PFU/mL (或 TCID<sub>50</sub>/mL)，则从头开始制备。使用前将冷冻的病毒放入  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  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  $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$  冰箱 (4.3.6) 保存不超过 4 h。

## 4.5.5 试样

### 4.5.5.1 对对照样

尺寸为  $(50 \pm 2) \text{ mm} \times (50 \pm 2) \text{ mm}$  的 PE 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，试验底材采用铝、玻璃、塑料或不锈钢等不易生锈和吸潮的材质，尺寸为  $50 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ ，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

试验前，将 9 片抗病毒试样和 12 片对对照样用紫外灯处理 30 min，也可选择其他合适的消毒方法。

## 4.6 试验程序

### 4.6.1 预实验

预实验的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。

#### 4.6.1.1 细胞毒性实验

细胞毒性试验步骤如下：

- 取对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 (见 4.4.16)，使用移液器吹打，以确保试样经过充分清洗。以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；
- 若未观察到细胞毒性，继续下一步骤；
- 若观察到有细胞毒性，则需酌情修改中和剂配方或增加中和剂的使用量；
- 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洗脱液。

#### 4.6.1.2 细胞对病毒的敏感性与中和效果验证试验

##### 4.6.1.2.1 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（见4.4.16），使用移液器吹打，以确保试样经过充分清洗。从皿中取出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  $\mu$ L制备好的浓度为 $(4\sim6)\times 10^4$  PFU/mL（或TCID<sub>50</sub>/mL）的病毒悬液至上述9支试管中，25℃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。

#### 4.6.1.2.2 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：

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

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

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，单位为每毫升噬斑数量（PFU/mL）或每毫升半数组织感染量（TCID<sub>50</sub>/mL）；

$S_u$ ——3片对照样回收的平均病毒感染滴度对数值，单位为每毫升噬斑数量（PFU/mL）或每毫升半数组织感染量（TCID<sub>50</sub>/mL）；

$S_t$ ——3片抗病毒试样回收的平均病毒感染滴度对数值，单位为每毫升噬斑数量（PFU/mL）或每毫升半数组织感染量（TCID<sub>50</sub>/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

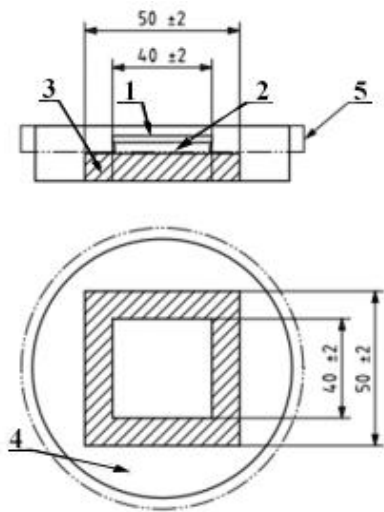
将冷冻的病毒悬液（4.5.4）置于 $(37\pm 1)$ ℃水浴，使其迅速融化。用无菌水（见4.4.2）将病毒悬液浓度调整为 $(1\sim 5)\times 10^7$  PFU/mL（或TCID<sub>50</sub>/mL）作接种液，若接种液不立即使用，可保存于 $(4\pm 2)$ ℃冰箱（4.3.6）。

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40 mm×40 mm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。

对吸水性涂膜，为保证培养24 h后涂膜表面菌液不干燥，先将涂膜放入无菌水中浸泡1 h，然后取出试样，用无菌滤纸吸干涂膜表面水分。

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。

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 片对对照样进行回收。在各培养皿中加入 10 ml 的 SCDLP 液体培养基（见 4.4.16）或其他适宜而有效的中和剂，在充分吹打以洗脱回收病毒。对回收得到的病毒洗脱液进行滴度测定。测定方法见 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（4.6.2.3），按照 4.6.2.4.1 处理 3 片对对照样和 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：

- a) 在 6 孔板的每个孔内培养单层细胞（4.5.3），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，弃掉旧的培养基。使用维持培养基（见 4.4.9）清洗细胞表面 2 次；
- b) 洗脱液原液及每个梯度的稀释液均接种 2 孔，接种量 0.1 mL。同时用维持培养基接种 2 孔，做阴性对照；
- c) 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；
- d) 加入 3 mL 琼脂培养基（见 4.4.15）做噬斑试验，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 5%二氧化碳培养箱（4.3.5）中，流感病毒于  $(34\pm1)^{\circ}\text{C}$  培养 4 d~7 d，肠道病毒于  $(37\pm1)^{\circ}\text{C}$  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（见 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（见 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 <sup>a</sup>	甲型流感病毒（H3N2）	肠道病毒（EV71）
吸附温度	34 ℃	37 ℃
培养温度		
<sup>a</sup> 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 <sup>n</sup>
斑块平均数	C1	C2	C3	C4	CN

本文件中规定如下：

- 如果C1~CN系列中有一个蚀斑数为6~60，则6~60作为试验的PFU值；
- 如果C1<6时，则使用C1作为试验的PFU值；
- 如果C1<1，包括0，则以1作为试验的PFU值。

4.6.3.2 TCID<sub>50</sub> 法

病毒的培养温度应符合表2的要求，操作步骤如下：

- a) 在 96 孔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（见 4.4.8）。加 0.1 mL 细胞维持培养基（见 4.4.9）清洗细胞表面，重复洗 2 次；
- b) 洗脱液原液及每个梯度的稀释液均接种 8 孔用于测试，接种量 0.1 mL，并以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 孔板放二氧化碳培养箱培养 3 d~7 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 TCID<sub>50</sub>, 得到每毫升采样液中的病毒数量 (TCID<sub>50</sub>/mL)。

注: 培养时间及温度能随测试病毒的种类进行改变。

## 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按公式 (3) 计算:

$$N = 10 \times C \times D \times V/S \quad (1)$$

式中:

$N$ ——试样上病毒感染滴度, 单位为每平方厘米噬斑数量 (PFU/cm<sup>2</sup>);

10——换算系数;

$C$ ——两孔蚀斑数的平均值, 单位为每 0.1 毫升的噬斑数量 (PFU/0.1 mL);

$D$ ——稀释倍数;

$V$ ——病毒洗脱液体积, 单位为毫升 (mL);

$S$ ——覆盖膜的面积, 单位为平方厘米 (cm<sup>2</sup>)。

### 4.7.2 TCID<sub>50</sub>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:

$$Y = X \times 10^{\Sigma P - 0.5} \quad (1)$$

式中:

$Y$ ——病毒感染滴度, 单位为每 0.1 毫升的半数组织感染量 (TCID<sub>50</sub>/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, %;

$\Sigma p$ —— $p$ 值的和。

病毒感染滴度  $C$  按公式 (5) 计算:

$$C = Y \times 10 \quad (2)$$

式中:

$C$ ——病毒感染滴度, 单位为每毫升的半数组织感染量 (TCID<sub>50</sub>/mL);

$Y$ ——病毒感染滴度, 单位为每 0.1 毫升的半数组织感染量 (TCID<sub>50</sub>/0.1 mL);

10——换算系数。

病毒感染滴度  $N$  按公式 (6) 计算:

$$N = C \times V/S \quad (3)$$

式中:

$N$ ——试样上病毒感染滴度, 单位为每平方厘米半数组织感染量 (TCID<sub>50</sub>/cm<sup>2</sup>);

$C$ ——病毒感染滴度，单位为每毫升的半数组织感染量（ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ）；

$V$ ——病毒洗脱液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$S$ ——覆盖膜的面积，单位为平方厘米（ $\text{cm}^2$ ）。

病毒感染滴度计算的示例见附录B。也可使用其他的 $\text{TCID}_{50}$ 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

试验结果应满足以下要求，否则试验无效：

- a) 对照样接种后即时测得的平均值应在  $2.5 \times 10^5 \text{ PFU}/\text{cm}^2$ （或  $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ） $\sim 1.2 \times 10^6 \text{ PFU}/\text{cm}^2$ （或  $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）的范围内。
- b) 对照样接种 24 h 测得的平均值不应小于  $6.2 \times 10^2 \text{ PFU}/\text{cm}^2$ （或  $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）。

##### 4.7.3.2 抗病毒率的计算

抗病毒率按式（7）计算，数值保留小数点后两位，按GB/T 8170—2008中规定进行修约。

$$R = (N_B - N_C) / N_B \times 100 \quad (1)$$

式中：

$R$ ——抗病毒率，%；

$N_B$ ——3片对照样接种24 h后回收的平均滴度值，单位为每平方厘米噬斑数量（ $\text{PFU}/\text{cm}^2$ ）或每平方厘米半数组织感染量（ $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）；

$N_C$ ——3片抗病毒试样接种24 h后回收的平均滴度值，单位为每平方厘米噬斑数量（ $\text{PFU}/\text{cm}^2$ ）或每平方厘米半数组织感染量（ $\text{TCID}_{50}/\text{cm}^2$ ）；

100——换算系数。

#### 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—2022的紫外灯，紫外灯距离试样0.8 m $\sim$ 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对照样和试样上，用贴膜的方法使细菌均匀接触样品表面，经过一定时间的培养后，检测样品表面的活菌数，通过比较试样和对照样中的活菌数计算抗菌率，以抗菌率来表征抗菌性能。

#### 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（ $37 \pm 1$ ） $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度能保持（ $90 \pm 5$ ）%。

- 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 41918-2022 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 电热干燥箱：温度能保持 160℃~180℃，温度波动不超过±2℃。
- 5.3.6 pH 计：精度±0.2。
- 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：聚乙烯薄膜，标准尺寸为 (40±2) mm×(40±2) mm、厚度为 (0.05~0.10) 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—2008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毫升/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 营养肉汤培养基（NB）组分

营养肉汤培养基（NB）组分见表4。

表 4 营养肉汤培养基（NB）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）℃灭菌15 min。如不立即使用，置于5℃~10℃条件下保藏。

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）℃灭菌15 min。如不立即使用，置于5℃~10℃条件下保藏。

5.4.5 消毒剂

75%（体积分数）乙醇溶液。

5.4.6 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。

5.4.7 洗脱液(SCDLP 液体培养基)

5.4.7.1 洗脱液(SCDLP 液体培养基)组分

洗脱液(SCDLP液体培养基)组分见表5。

表 5 洗脱液(SCDLP 液体培养基)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

5.4.7.2 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，用氢氧化钠溶液或盐酸溶液将pH值调整至 $7.2 \pm 0.2$ ，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。

5.4.8 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7.0~7.2，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。

5.5 试验菌种

抗细菌性能试验所用菌种见表6。经有关方商定后，可增加其他试验菌种。

表 6 抗细菌性能试验菌种

菌种的中文名	菌种的拉丁名	菌株号 <sup>a</sup>
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

菌种的中文名	菌种的拉丁名	菌株号 <sup>a</sup>
<sup>a</sup> CGMCC 为中国普通微生物菌种保藏管理中心。		

5.6 试样

5.6.1 对照样

尺寸为(50±2) mm×(50±2) mm的PE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，试验底材采用铝、玻璃、塑料或不锈钢等不易生锈和吸潮的材质，尺寸为50 mm×50 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。

5.6.2.1 试样前处理

试验前，将3片抗菌试样和6片对照样用紫外灯处理30 min，也可选择其他合适的消毒方法。

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）（见5.4.4）斜面上，在（37±1）℃下培养24 h后，在0℃～5℃下保藏（不得超过1个月），作为斜面保藏菌种。不应使用超过5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（见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（见5.4.6）中，并用菌种稀释液制备10倍梯度系列稀释液，选择浓度为（5.0～10.0）×10<sup>5</sup> CFU/mL的菌液作为接种菌液。

5.7.4 试样接种

分别取0.4 mL接种液（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RH≥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。

因样品表面性质能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。

对吸水性涂膜，为保证培养24 h后涂膜表面菌液不干燥，先将涂膜放入无菌水中浸泡1 h，然后取出试样，用无菌滤纸吸干涂膜表面水分。

### 5.7.5 试样上的细菌回收

#### 5.7.5.1 接种后样品立即（“0”时）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 洗脱液（见5.4.7）。用移液管吸取和释放洗脱液，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、旋动和超声波振动等）。

#### 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 洗脱液回收细菌有困难，则可增加洗脱液用量。若洗脱液的体积不是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（见5.4.8）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（见5.4.4），轻轻旋转以分散细菌。盖上皿盖，倒置培养皿，于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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洗脱液中的细菌数小于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（8）进行计算：

$$N = C \times D \times V \cdots \cdots (1)$$

式中：

$N$ ——每个试样的活菌数，单位为菌落形成单位（CFU）；

$C$ ——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

对照样品回收菌数应满足以下要求，否则试验无效：

——对照样“0”h的3个平行活菌数应在 $(2.0 \sim 4.0) \times 10^5$  CFU/片；

——对照样“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 $\leq 0.3$ ；

——对照样24 h的3个平行活菌数均不小于 $1.0 \times 10^5$  CFU/片。

### 5.8.3 抗菌率的计算

按公式（9）计算抗菌率，结果保留小数点后两位，按GB/T 8170—2008中规定进行修约。

$$R = (N_A - N_B) / N_A \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：  
R——抗菌率， %；  
N<sub>A</sub>——3片对照样24 h后回收菌数的平均数，单位为菌落形成单位（CFU）；  
N<sub>B</sub>——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）；  
100——换算系数。

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—2022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) 对照样及试样的制备过程及底材类型等；
  - f) 试验用毒株与宿主细胞的类型和编号、试验菌种及细菌的菌株号；
  - g) 试验接种液的体积；
  - h) 接种液的试验菌浓度与病毒感染滴度、细菌滴度；
  - i) 试验接触时间；
  - j) 试验中对照样及抗病毒试样上回收得到的病毒感染滴度、试验中对照样及抗细菌试样上回收得到的活菌数；
  - k) 抗菌率、抗病毒率；
  - l) 与规定试验方法的任何不同之处；
  - m) 试验过程中观察到的任何异常现象。

附 录 A  
(规范性)  
EMEM 培养基

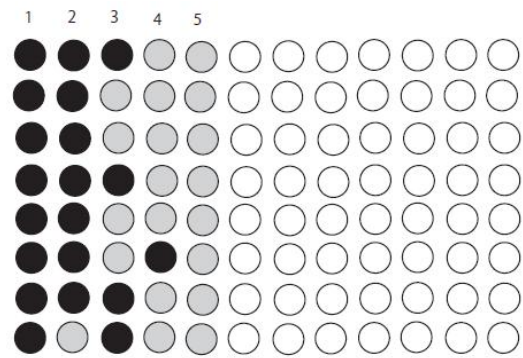
表A. 1给出了EMEM的配方。可以使用市售的EMEM培养基。

表 A. 1 EMEM 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 <sub>2</sub> ]	200.00
	硫酸镁[MgSO <sub>4</sub> ]	97.70
	氯化钾[KCl]	400.00
	氯化钠[NaCl]	6 800.00
	磷酸二氢钠（一水）[NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O]	140.00
其他	D-葡萄糖	1 000.00
	苯酚红钠盐	10.00

附录 B  
(资料性)  
病毒感染滴度计算示例

病毒感染及稀释度见图B. 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 B. 1 病毒感染及稀释度

$$X = 10^0 = 1;$$
$$\Sigma p = 8/8 + 7/8 + 4/8 + 1/8 + 0/8 = 2.5;$$
$$Y = 10^{2.0} = 1.0 \times 10^2;$$
$$C = Y \times 10 = 1.0 \times 10^3;$$
$$N = C \times V/S = 1.0 \times 10^3 \times 10/16 = 6.2 \times 10^2.$$

### 参 考 文 献

- [1] 《消毒技术规范》2002年版，卫生部（卫法监发〔2002〕282 号）
-