ICS 87.040

G 50

团 体 标 准

T/CNCIA 03002-202X

涂料抗病毒性能测试方法

Test method for determining the antiviral activity of coatings

（征求意见稿）

本稿完成日期：2020年9月14日

202X-XX-XX发布 202X-XX-XX实施

中国涂料工业协会 发布

目  次

[前言 II](#_Toc42248416)

[1　范围 1](#_Toc42248417)

[2　规范性引用文件 1](#_Toc42248418)

[3　术语和定义 1](#_Toc42248419)

[4　试验原理 2](#_Toc42248420)

[5　试剂和材料 2](#_Toc42248421)

[6　仪器设备 5](#_Toc42248422)

[7　试验准备 6](#_Toc42248423)

[8　试验步骤 7](#_Toc42248424)

[9　抗病毒耐久性试验 9](#_Toc42248425)

[10　试验报告 10](#_Toc42248426)

[附录A（资料性附录）　EMEM培养基配方表 11](#_Toc42248427)

前  言

本文件依据GB/T 1.1—2020给出的规则起草。

本文件由中国涂料工业协会提出并归口。

本文件主要起草单位：

本文件参与草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

涂料抗病毒性能测试方法

警告—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。实验室应满足GB 19489的要求，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。

1. 范围

本文件规定了涂料的抗病毒性能的测试的术语和定义、试验原理、试剂和材料、仪器设备、试验准备、试验步骤、抗病毒耐久性试验及试验报告等内容。

本文件适用于涂料抗病毒性能的测定，包括水性涂料、溶剂型涂料、辐射固化涂料及粉末涂料。

1. 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 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/ T 3186 色漆、清漆和色漆与清漆用原材料\_取样

GB/ T 9278 涂料试样状态调节和试验的温湿度

GB 19258 紫外线杀菌灯

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

YY 0569 生物安全柜

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

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。

抗病毒 antiviral

通过物理或化学等措施使样品表面感染病毒数量减少的状态。

抗病毒活性值 antiviral activity

经过抗病毒处理的样品与未经抗病毒处理的样品在接种病毒培养后病毒感染滴度的对数差值。

抗病毒率 antiviral rate

经过抗病毒处理的样品与未经抗病毒处理的样品在接种病毒培养后病毒感染滴度相比较减少的百分率。

病毒的感染滴度 infectivity titre of virus

单位体积的细胞溶解产物或溶液中具有感染性的病毒颗粒数目。

* 1.

蚀斑 plaque

由单个具有感染能力的病毒颗粒在半固体培养基下的单层细胞中形成的一个局限性区域。

* 1.

蚀斑形成单位 plaque forming units (PFU）

表示单位体积中病毒浓度的单位。

* 1.

蚀斑实验 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。

* 1.

半数组织培养感染剂量 50% tissue culture infective dose，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。

抗病毒耐久性 antivirus durability

模拟产品使用过程的光照老化方式，经过一定时间的紫外光照射后的抗病毒性能。

1. 试验原理

将病毒接种于样品上，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。有两种方法可以计算感染性病毒滴度。一是蚀斑试验（见8.5），另一种是TCID50方法（见8.5）。方法的选择取决于检测机构的经验和便利程度。

1. 试剂和材料
	1. 测试病毒

测试病毒见表1。

表1 测试病毒

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 病毒种类 | 流感病毒 | 肠道病毒 |
| 病毒株 | 甲型流感病毒（H3N2） | 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% CO2 | 37℃，5% CO2 |
| 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，同时选择相应的病毒宿主细胞，并保证整个操作过程满足实验室生物安全要求。

* 1. 覆盖膜

应使用不影响病毒毒力和稳定性并且不吸水的材料（以聚乙烯、聚丙烯或聚酯如聚对苯二甲酸乙二醇酯制成）。用70%乙醇溶液浸泡10min，再以无菌水冲洗，自然干燥后备用。

注：均质袋切下的膜也适用。

* 1. 试剂和培养基

使用的试剂和材料应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，也可按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。

* + 1. 水

应符合GB/T 6682-2008规定的三级水。

* + 1. 最低必需培养基（EMEM）

配方见附录A。商用培养基若有任何成分缺失，可根据配方表（表A.1）添加。

* + 1. 7.5% NaHCO3溶液

可选择以下两个方案之中的任意一个制备7.5%NaHCO3溶液：

--方案1：将75 g NaHCO3溶于1000mL水中配成7.5%NaHCO3溶液。使用0.22μm过滤器对溶液进行过滤除菌。

--方案2：称取NaHCO3 75 g置于带盖的培养容器中，于高压蒸汽灭菌器中灭菌；将1000 mL水进行高压灭菌。用无菌的水溶解NaHCO3配成7.5%NaHCO3溶液。

配制后如不立即使用，应置于5℃~10℃保存。保存期限不得超过1个月。

* + 1. 甲醛溶液

将100 mL37%的甲醛溶液加到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 ℃保存。保存期限不得超过1个月。

注：可使用其它经验证合格的细胞固定液。

* + 1. 亚甲基蓝溶液

取0.375g亚甲基蓝和62.5μL1mol/LNaOH溶液，溶于1000 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 ℃保存。保存期限不得超过1个月。

* + 1. 灭活的胎牛血清（FBS）

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

* + 1. 生长培养基

分别取9.53g最低必需培养基、60 mg硫酸卡那霉素，在800 mL水中充分溶解，定容至1000 mL，使用0.22 μm过滤器对溶液进行过滤除菌。

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-谷氨酰胺灭菌，并在使用前根据附录A的配方表添加至培养基中。

于上述溶液里加入15 mL的7.5% NaHCO3和100 mL补体灭活的胎牛血清，充分混匀。配制后如不立即使用，应置于5 ℃~10 ℃保存。保存期限不得超过1个月。

* + 1. 维持培养基

取9.53 g最低必需培养基和60 mg硫酸卡那霉素溶于800 mL水中，定容至1000 mL。使用0.22 μm过滤器对溶液进行过滤除菌。

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-谷氨酰胺灭菌，并在使用前根据附录A的配方表添加至培养基中。

于上述溶液里加入15 mL的7.5% NaHCO3，充分混匀。配制后如不立即使用，应置于5℃~10℃保存。保存期限不得超过1个月。

* + 1. 双倍浓度的维持培养基

将19.06 g最低必需培养基和120 mg硫酸卡那霉素溶于800mL水中，定容至1000 mL。使用0.22μm过滤器对溶液进行过滤除菌。配制后如不立即使用，应置于5℃～10℃保存。保存期限不得超过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-谷氨酰胺灭菌，并在使用前根据附录A的配方表添加至培养基中。

* + 1. 磷酸盐缓冲液[PBS（-）]

将8.0gNaCl、0.2gKCl、2.9gNa2HPO4·12H2O和0.2g KH2PO4溶于1000 mL的水中制备PBS（-）。高压蒸汽灭菌（见6.2）。配制后如不立即使用，应置于5℃~10℃保存。保存期限不得超过1个月。

* + 1. 从牛胰腺分离的胰蛋白酶和PBS（-）溶液
			1. 将从牛胰腺分离到的1.0 g 胰蛋白酶溶解于100mLPBS（-）中，并用震荡器震荡2 h以充分混匀。使用0.22μm过滤器对溶液进行过滤除菌。如不立即使用，则分装后放在- 80℃冰箱里保存。使用前，于37℃水浴解冻。
			2. 将1.0 mL 5.3.11.1的溶液加至9.0mLPBS(-)中，混匀。分装并保存在低于−20℃的冰箱。于37°C水浴解冻。
		2. 胰蛋白酶-EDTA溶液

将2.5g胰蛋白酶、0.1g硫酸卡那霉素、0.1g硫酸链霉素、2mg的两性霉素B和0.014 mol EDTA溶于1000mL PBS（-）中。用0.22μm滤器过滤除菌。将溶液分装并保存在低于−20℃的冰箱。使用前，于37℃水浴解冻。

注：胰蛋白酶EDTA溶液可以使用商品化成品。配方不同的应经验证合格后使用。

* + 1. DEAE-葡聚糖溶液

将20g DEAE-葡聚糖溶于1000mL水中制备DEAE-葡聚糖溶液。用0.22μm滤器过滤除菌。配制后如不立即使用，应置于5℃~10℃保存。保存期限不得超过1个月。

* + 1. 用于蚀斑试验的琼脂培养基
			1. A液

将10 mL DEAE-葡聚糖溶液和40 mL 7.5% NaHCO3溶液加入1000 mL双倍浓度的维持培养基中，充分混匀。对流感病毒的蚀斑试验时，加3.0 mL胰蛋白酶。使用前把溶液放37℃水浴锅温浴。

* + - 1. B液

将15g细胞培养琼脂溶于1000 mL水中，混匀。高压蒸汽灭菌。使用前将溶液放60 ℃水浴锅温浴。

* + - 1. 琼脂培养基的制备

琼脂培养基用于蚀斑试验。使用前将溶液A和溶液B按1：1混匀。

* + 1. 卵磷脂吐温大豆酪蛋白培养液（SCDLP肉汤培养基）

将17.0g酪蛋白胨、3.0g大豆蛋白胨、5.0 g NaCL、2.5 g Na2HPO4、2.5g葡萄糖和1.0g卵磷脂溶入1000mL水中。搅拌均匀后加入7.0 g非离子型表面活性剂吐温80，用NaOH溶液或HCL溶液将pH值调整至6.8～7.2（25℃），高压蒸汽灭菌。配制后如不立即使用，置5℃~10℃保藏。保存期限不得超过1个月。

1. 仪器设备
	* 1. 二氧化碳培养箱

温度(34±2) ℃和(37±2) ℃，可维持5%的二氧化碳浓度。

* + 1. 高压蒸汽灭菌锅

可以满足温度(121±2) °C和压力(103±5) kPa下的操作。

* + 1. 干热灭菌箱
		2. 能保持160℃～180℃的温度，温度波动不超过±2℃。离心机

控速范围 500 r/min～10000 r/min，转速准确度1%。

* + 1. 生物安全柜

应为符合YY 0569规定的II级及以上生物安全柜。

* + 1. 倒置显微镜

用于培养细胞的观察。

* + 1. 冰箱

控温范围2℃～8 ℃， -（20±2）℃，-（80±2）℃。

* + 1. 可调移液器枪

量程：10µL～100 µL，100 µL～1000 µL，1 mL～5 mL。

* + 1. 水浴锅

控温范围：25 ℃~55 ℃，温度准确度1 ℃。

* + 1. 细胞培养板

经γ-射线灭菌的6孔及96孔细胞培养板。

* + 1. 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。

* + 1. 生化培养箱

控温范围20 ℃～50 ℃ ，温度准确度1 ℃

* + 1. 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。

1. 试验准备
	1. 从低温中复苏宿主细胞

将低温储存的宿主细胞置37°C水浴，使其迅速融化。准备一个新的有通气帽盖的75cm2细胞瓶，加入20mL生长培养基，将融化的全部细胞转入细胞瓶中。将细胞瓶放进细胞CO2培养箱（37℃±1℃，5% CO2），培养（24±2） h，用显微镜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。

* 1. 宿主细胞传代培养

弃掉细胞瓶中旧的培养基，加入5mL PBS缓冲液冲洗长满的单层细胞2次。弃掉PBS，加入1.0mL胰蛋白酶-EDTA溶液，覆盖细胞表面。将细胞瓶放入37℃ CO2培养箱孵育5min~6min。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CO2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。

* 1. 检测病毒的制备

准备好长满的宿主细胞。将冷冻的病毒放入（36±1）℃水浴，使其迅速解冻，并将其转移倒一个新的试管中，用维持培养基将其稀释到103 PFU/mL（或TCID50/mL）～104PFU/mL（或TCID50/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CO2培养箱，培养1 h使病毒吸附入细胞。补足适量维持培养基至细胞瓶，并将细胞瓶放入CO2培养箱培养1d～3d，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，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TCID50方法检测病毒滴度是否超过107 PFU/mL（或TCID50/mL），若滴度低于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（36±1）℃水浴，使其迅速解冻。解冻后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。

* 1. 试样的制备

7.4.1 产品按GB/T 3186的规定进行取样，也可以按照商定的方法取样。

7.4.2 制备试板时，除非另有规定，一般采用无抗病毒作用的铝板、不锈钢板、玻璃板和塑料片为载体，尺寸为50 mm×50 mm，厚度为1mm~10mm。按照产品的使用说明稀释或配比后进行涂刷。涂料的施涂一般为两次涂刷，第一遍表干后涂刷第二遍，干膜总厚度按照说明书规定要求，样板表面应平整，无锈无油污。试板涂刷后烘干或于室温下干燥，然后在GB/T 9278规定条件下至少干燥7d后再用于试验。粉末涂料、辐射固化涂料试板的制备方法可经双方商定。

7.4.3 采用铝板、不锈钢板、玻璃板和塑料片等载体制备空白对照样品，以添加入抗病毒成分的涂料制备试样。其中空白对照样制备12片，抗病毒试样制备9片。试验前用生物安全柜中的紫外灯照射30min，消毒后进行测试。

* 1. 预实验
		1. 细胞毒性试验

取空白对照样及抗病毒试样各3片，放在培养皿中，加入10mL SCDLP肉汤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。以洗脱液接作为试验样液，采用蚀斑法或TCID50法测试，观察细胞有无损伤。

若未观察到细胞毒性，继续下一步骤（见7.5.3）。

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。若因样片的尺寸和性质，采用10ml中和剂回收洗脱有困难，则可增加中和剂溶液用量。

若中和剂的配方修改、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。

* + 1. 细胞对病毒的敏感性和中和效果验证试验
1. 实验步骤如下：取空白对照样及抗病毒试样各3片，放在培养皿中，加入10mL SCDLP肉汤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。从皿中取5mL SCDLP肉汤回收液到新的试管中。另取3支试管，分别加入5mL SCDLP肉汤培养基做为阴性对照。加50μl制备好的浓度为（4～6）×104 PFU/mL（或TCID50/mL）的病毒悬液至上述9支试管中，25℃放置30min。作用结束后，采用蚀斑法或TCID50法测试阴性对照、空白对照样及抗病毒试样的洗脱回收液中病毒的滴度。
2. 实验有效性的条件

将阴性对照与空白对照样及抗病毒试样回收得到的病毒滴度作比较，其对数值应满足式（1）和式（2）的要求：

|Sn - Su| ≤ 0.5…………………………………………………..(1)

|Sn - St | ≤ 0.5………………………..……………………….. (2)

其中：

Sn—三个SCDLP肉汤培养基阴性对照回收的平均病毒滴度对数值，单位为PFU/mL（TCID50/mL）；

Su—三个未经抗病毒处理的试样回收的平均病毒滴度对数值，单位为PFU/mL（TCID50/mL）；

St—三个经抗病毒处理的试样回收的平均病毒滴度对数值，单位为PFU/mL（TCID50/mL）。

若以上结果超过0.5，中和剂的配方应该酌情修改或更改，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使用相同的中和剂。

1. 试验步骤
	1. 试样准备

取制备好的空白对照样6片，抗病毒试样3片，分别放入无菌培养皿中，测试面朝上。

* 1. 试样接种

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37°C水浴，使其迅速融化。用维持培养基将病毒悬液浓度调整在1×107 PFU/mL~5×107PFU/mL之间用作接种液，若接种液不立即使用，可暂存于4℃冰箱。

用移液管吸取0.4mL接种液，滴到每个试样表面。并将制备好的40mm×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。

注：接种液不能从覆盖膜边缘溢出。如有接种液溢出时，可适量减少接种液体积，但体积不应小于0.1 mL，当接种液体积减小时，应增加接种液病毒滴度，以保证测试时与标准规定的病毒滴度相同。

* 1. 接种后试样的培养

除特别说明外，含有接种后试样（包括空白对照样）的培养皿，在（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小时。

* 1. 病毒的洗脱回收

8.4.1 接种后，立即对已接种的3片未做抗病毒处理试样进行病毒回收。在各培养皿中加入10mL SCDLP肉汤或其他适宜而有效的中和剂，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8.5.

1. 若中和剂的体积或成分更改，应在试验报告中记录。中和剂的体积更改时应在计算时予以考虑。
2. 可以使用其它的回收洗脱方法。回收方法的变更可能会影响所测得的抗病毒活性结果，应充分证实其有效性才可使用，并在报告中注明。

8.4.2 根据8.3的程序培养后，按照8.4.1处理3片空白对照样和3片经抗病毒处理的试样，然后立即对试样上的病毒滴度进行测定。

* 1. 病毒滴度的计数

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TCID50法进行病毒滴度的计数。

a）蚀斑法

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。加适量细胞维持培养基洗掉残留的生长培养基，重复洗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0.1mL。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，接种维持培养基，做阴性对照。把6孔板放入CO2培养箱孵育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。培养后，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CO2培养箱中培养2d～3d。然后，从培养箱中把细胞板拿出来，放正，添加3mL的福尔马林溶液以固定细胞，令其在室温下固定至少1h。弃掉的琼脂培养基，添加3mL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。

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，其空斑数量按如下要求进行：

* 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，则以1计算测试的PFU。

b）TCID50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细胞维持培养基洗细胞表面，重复洗2次。洗脱液原液及每个梯度的稀释液均接种8孔用于测试，接种量0.1mL，并以维持培养基做阴性对照。把96孔板放二氧化碳培养箱孵育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CO2培养箱培养3 d～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TCID50，得到每毫升采样液中的病毒数量（TCID50/mL）。

注：培养时间及温度可以随测试病毒的种类进行改变。

* 1. 测试结果
		1. 病毒滴度计算

8.6.1.1 蚀斑法病毒滴度计算

对于每个试样，都按照式（3）来计算病毒滴度。

N=(10×C×D×V)/A………………………………………….（3）

式中：

N——每个试样每平方厘米的病毒滴度；

C—— 两个孔的平均蚀斑数；

D—— 稀释倍数；

V—— 用于洗脱的SCDLP培养液的体积，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数平均数，保留2位有效数字。

8.6.1.2 TCID50法病毒滴度计算

对于每个试样，都按照式（4）来计算病毒滴度。

N=(10×C×V)/A………………………………………….（4）

式中：

N——每个试样每平方厘米的病毒滴度；

C—— TCID50值；

V—— 用于洗脱的SCDLP培养液的体积，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数平均数，保留2位有效数字。

* + 1. 试验有效条件

8.6.2.1 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。

8.6.2.2 空白对照样接种后即时测得的蚀斑数的对数值应满足式（5）的要求：

（Lmax-Lmin）/Lmean≤0.2………………………………………….（5）

式中：

Lmax ——试样上最大病毒滴度的常用对数值（以10为底的对数值）；

Lmin ——试样上最小病毒滴度的常用对数值；

Lmean ——三个试样平均病毒滴度的常用对数值。

8.6.2.3 空白对照样的试样接种后即时测得的平均蚀斑数应在2.5×105 PFU/cm2（或TCID50/cm2）至1.2×106PFU/cm2（或TCID50/cm2）的范围内。

8.6.2.4 每个空白对照样接种后培养24h的病毒滴度不应小于6.2×102PFU/cm2（或TCID50/cm2）。

* 1. 抗病毒活性的计算

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

$R^{’}（\%）=\frac{B^{’}-C}{B}×100$………………………………………….（6）

其中：

R’(%)——抗病毒活性率（%）；

B —— 三个空白对照样接种24h后回收的平均滴度值，单位为PFU/cm2（或TCID50/cm2）；

C —— 三个抗病毒试样接种24h后回收的平均滴度值，单位为PFU/cm2（或TCID50/cm2）。

8.7.2 或用式（7）计算抗病毒活性值，结果保留到小数点后一位。

R=(Ut-Uo)-（At-Uo）=Ut-At………………………………………（7）

其中：

R —— 抗病毒活性值；

Uo —— 三个空白对照样接种后即时回收测得的平均滴度的自然对数值；

Ut ——三个空白对照样接种24h后回收的平均滴度的自然对数值；

At——三个抗病毒试样接种24h后回收的平均滴度的自然对数值。

1. 抗病毒耐久性试验

采用1支30 W、波长为253.7 nm的符合GB 19258的紫外灯，紫外灯距离试板0.8 m～1.0 m,照射100 h，经处理的试板抗病毒耐久性性能按上述7章和8章的规定进行试验。

1. 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类型等；

d）覆盖膜的聚合物类型、大小及尺寸；

e）试验用毒株与宿主细胞的类型和编号，如采用其他毒株和宿主细胞需说明原因；

f）试验接种液的体积；

g）接种液的病毒滴度；

h) 试验接触时间；

i）试验中空白对照样及抗病毒试样上回收得到的病毒滴度；

j）抗病毒活性值或抗病毒率；

k）任何与本文件的偏离。

1. （资料性附录）
EMEM培养基配方表

表A.1列出了EMEM的配方。试验中允许使用商品化等效培养基。

* 1. EMEM配方表

|  |  |
| --- | --- |
| 每1000mL水 | mg |
| 氨基酸 | L-精氨酸盐酸盐L-Arginine HCl | 126.40 |
| L-胱氨酸二盐酸盐L-Cystine 2HCl | 31.20 |
| L-谷氨酰胺L-Glutamine | 292.00 |
| L-组氨酸盐酸盐一水物/ Histidine HCl·H2O | 41.90 |
|  L-异亮氨酸Isoleucine | 52.50 |
| L-亮氨酸Leucine | 52.50 |
| L-赖氨酸盐酸盐Lysine HCl | 72.50 |
| L-蛋氨酸Mathionine | 15.00 |
| L-苯丙氨酸Phenylalnine | 32.50 |
| L-苏氨酸Threonine | 47.60 |
| L色氨酸L-Tryptophan | 10.00 |
| L酪氨酸二钠二水物L-Tyrosine 2Na·2H2O | 51.90 |
| L-缬氨酸L-Valine | 46.80 |
| 维生素 | 氯化胆碱Choline Chloride | 1.00 |
| D-泛酸钙D Calcium Pantothenate  | 1.00 |
| 叶酸Folic Acid  | 1.00 |
| 木糖醇Myo Insitol  | 2.00 |
| 烟酰胺Nicotinamide  | 1.00 |
| 盐酸吡哆辛Pyridoxine HCl  | 1.00 |
| 核黄素Riboflavin  | 0.10 |
| 盐酸硫胺Thiamine HCl  | 1.00 |
| 无机盐 | 氯化钙Calcium Chloride [CaCl2] | 200.00 |
| 硫酸镁Magnesium Sulfate [MgSO4]  | 97.70 |
| 氯化钙Potassium Chloride [KCl]  | 400.00 |
| 氯化钠Sodium Chloride [NaCl]  | 6 800.00 |
| 一水磷酸四氢钠Sodium Phosphate Monobasic Monohydrate [NaH4PO4·H2O] | 140 |
| 其它 | D 葡萄糖Dextrose  | 1 000.00 |
| 苯酚红钠盐Phenol Red Sodium Salt  | 10.00 |