

ICS 87.040

G51

团 体 标 准

T/GDTL 011—2020

抗菌、抗病毒涂料

Antibacterial and antiviral coating

2020-06-28 发布

2020-08-01 实施

广东省涂料行业协会发布

前 言

本标准依据GB/T 20004.1-2016《团体标准化 第1部份：良好行为指南》和GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的要求和格式起草。

本标准由广东省涂料行业协会提出和归口。

本标准负责起草单位：广东省涂料行业协会、广东省微生物研究所

本标准参加起草单位：广东维拓化工股份有限公司、广东巴德士化工有限公司、立邦涂料（中国）有限公司、广东嘉宝莉科技材料有限公司、珠海展辰新材料股份有限公司、广东巴德富新材料有限公司、广东立邦长润发科技材料有限公司、广东华隆涂料实业有限公司、广东施彩新材料科技有限公司、广东南天涂料有限公司、江门市长河化工实业集团有限公司、广州香海生物科技有限公司、广东恒和永盛实业有限公司、广东衡光新材料科技有限公司、深圳市长辉新材料科技有限公司、广东迪美生物技术有限公司。

标准主要起草人：陈金爱、黎玉莲、谭毅、严修才、熊绍泊、区英强、邹建明、田太阳、黎呈锋、麦宗毅、黄荣军、苏锦明、赵文海、杨孝国、李伟、闫树德、陈耀祖、刘永龙。

本标准首次发布。

抗菌、抗病毒涂料

1 范围

本标准规定了具有抗菌、抗病毒功能涂料产品的术语和定义、产品分类、要求、试验方法及效果评价、检验规则、标识和包装等要求。

本标准适用于具有抗菌、抗病毒功能的各种涂料产品。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 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/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 9750 涂料产品包装标志
- GB/T 13491 涂料产品包装通则
- GB 15258 化学品安全标签编写规定
- GB 19258 紫外线杀菌灯
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 21866-2008 抗菌涂料（漆膜）抗菌性测定法和抗菌效果
- ISO 18184:2019 抗病毒纺织品的测试

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抑菌 bacteriostasis

抑制细菌、真菌、霉菌等微生物的生长繁殖的作用叫做抑菌。

[GB/T 21866-2008, 术语和定义 3.1]

3.2

杀菌 sterilization

杀死细菌、真菌、霉菌等微生物营养体和繁殖体的作用叫做杀菌。

[GB/T 21866-2008, 术语和定义 3.2]

3.3

抗菌 antibacterial

抑菌和杀菌作用的总称为抗菌。

[GB/T 21866-2008, 术语和定义 3.3]

3.4

病毒 virus

只含一种核酸（DNA 或 RNA）、结构区别与其它有细胞结构的生物（原核及真核生物），营专性细胞内寄生，必须在宿主内才能生长繁殖的一类特定的微生物。

[ISO 18184:2019, 术语和定义 3.1]

3.5

病毒感染滴度 infectivity titre of virus

在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。

[ISO 18184:2019, 术语和定义 3.8]

3.6

空蚀斑形成单位 PFU plaque forming units

表示单位体积中感染病毒的浓度单位。

[ISO 18184:2019, 术语和定义 3.10]

3.7

病毒灭活率 Virus inactivation 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差值的百分率。

3.8

抗菌涂料 antibacterial coating

具有抗菌作用的涂料。

[GB/T 21866-2008, 术语和定义 3.4]

3.9

抗病毒涂料 antiviral coating

具有抗病毒功能的涂料。

4 产品分类

按产品功能分为抗菌涂料、抗病毒涂料、抗菌抗病毒涂料三类，按产品效果分为两个等级：I 级和 II 级。

5 要求

5.1 抗菌要求

产品的抗菌性能应符合表 1 的要求。

表 1 抗菌性能要求

项目		指标	
		I 级	II 级
抗菌性能	金黄色葡萄球菌	抗细菌率 ≥99%	抗细菌率 ≥95%
	大肠埃希氏菌		
抗菌耐久性能	金黄色葡萄球菌	抗细菌率 ≥95%	抗细菌率 ≥90%
	大肠埃希氏菌		

表 1 抗菌性能要求 (续)

项目		指标	
		I 级	II 级
抗霉菌性能	黑曲霉	长霉等级 0 级	长霉等级 1 级
	黄曲霉		
	球毛壳霉		
	腊叶芽枝霉		
	宛氏拟青霉		
	桔青霉		
	绿色木霉		
	出芽短梗霉		
抗霉菌耐久性能	黑曲霉	长霉等级 0 级	长霉等级 1 级
	黄曲霉		
	球毛壳霉		
	腊叶芽枝霉		
	宛氏拟青霉		
	桔青霉		
	绿色木霉		
	出芽短梗霉		

注：可增加其他商定菌种作检验菌种。

5.2 抗病毒要求

产品的抗病毒性能应符合表 2 的要求。

表 2 抗病毒性能要求

项目		指标	
		I 级	II 级
抗病毒性能 (病毒接触时间 2h)	甲型流感病毒 (H3N2)	病毒灭活率 $\geq 90\%$	病毒灭活率 $\geq 90\%$
	肠道病毒 (EV71)		/
抗病毒耐久性能	甲型流感病毒 (H3N2)	病毒灭活率 $\geq 85\%$	病毒灭活率 $\geq 85\%$
	肠道病毒 (EV71)		/

注：可增加其他商定病毒作检验病毒。

5.3 抗菌抗病毒要求

当产品同时具有抗菌和抗病毒功能时，应符合表 1 和表 2 的要求。

5.4 性能及安全要求

5.4.1 产品的物理机械性能应符合所执行的产品标准要求，并应符合国家、地方的强制性有害物质限量标准要求。

5.4.2 应保留产品中作为抗菌、抗病毒功能添加剂的工艺清单，并确保生物杀伤剂的使用量符合表 3 的要求。

5.4.3 抗菌、抗病毒的涂料产品在使用、贮存、运输、销售时不应成为污染源，不应在使用过程中对人体造成危害或对环境造成二次污染。

5.4.4 抗菌、抗病毒的涂料产品的施工人员应配备相应的防护用品，确保人员安全。施工结束后，未使用完的抗菌、抗病毒涂料不得在现场处理，避免造成环境污染。

表 3 生物杀伤剂使用量

项目 ^a		基准值
异噻唑啉酮	氯甲基异噻唑啉酮/甲基异噻唑啉酮 [(3/1)ECMI/MI(3/1)]	≤15 mg/kg
	辛基异噻唑啉酮 (OIT)	≤500 mg/kg
	苯并异噻唑啉酮 (BIT)	≤500 mg/kg
	甲基异噻唑啉酮 (MI)	≤200 mg/kg
	双氯辛基异噻唑啉酮(DCOIT)	≤500 mg/kg
	异噻唑啉酮含量总和	≤750 mg/kg
碘代丙炔基胺基甲酸丁酯 (IPBC)		≤1500 mg/kg
吡啶硫酮锌 (ZPT)		≤1500 mg/kg
二(3-氨基丙基)十二烷基胺		≤500 mg/kg
多菌灵、敌草隆、百菌清、三氯生		均不得添加 (污染限值均为≤50 mg/kg)

6 试验方法及效果评价

6.1 实验室及一般要求

- 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 除非另有规定，在试验中仅使用确认为分析纯的试剂，所用水应为符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

6.2 抗细菌性能

按 GB/T 21866-2008 的规定进行。

6.3 抗细菌耐久性能

按 GB/T 21866-2008 的规定进行。

6.4 抗霉菌性能

按 GB/T 1741 的规定进行。

6.5 抗霉菌耐久性能

在进行抗霉菌耐久性试验前，试板应进行如下预处理。试板完全浸泡在盛有 25℃ 水的玻璃水槽或玻璃容器中，试板之间互不接触，水面高出试板 20mm，浸泡时间 24 h，地坪抗霉菌涂料试板浸泡 168 h。浸泡后试板涂膜表面不应有起泡、脱落、开裂等现象。取出后采用 1 支 30W、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，经预处理的试板抗霉菌耐久性能按 GB/T 1741 的规定进行试验。

6.6 抗病毒性能

按附录 A 的规定进行。

6.7 抗病毒耐久性能

按附录 A 的规定进行。

7 检验规则

7.1 检验分类

产品检验分出厂检验和型式检验。

7.1.1 出厂检验项目按相关涂料产品执行标准中规定的出厂检验项目进行。

7.1.2 型式检验项目包括本标准中抗菌、抗病毒或兼具抗菌和抗病毒功能所对应的全部技术要求。

7.1.3 在正常生产情况下，每年至少进行一次型式检验。

7.1.4 在下列情况之一时，应随时进行型式检验：

- 新产品最初定型时；
- 生产配方、工艺及原材料有较大改变时；
- 停产三个月后又恢复生产时。

7.2 检验结果的判定

7.2.1 检验结果的判定按 GB/T 8170 中修约值比较法进行。

7.2.2 当产品抗菌性能结果均达到 I 级时，该抗菌涂料可判定为 I 级。当抗菌性能结果有 1 项仅达到 II 级时，该抗菌涂料应判定为 II 级。

7.2.3 当产品抗病毒性能结果均达到 I 级时，该抗病毒涂料可判定为 I 级。当抗病毒性能结果均达到 II 级时，该抗病毒涂料应判定为 II 级。

7.2.4 当产品抗菌性能结果和抗病毒性能结果均达到 I 级时，该抗菌抗病毒涂料可判定为 I 级。当抗菌性能结果或抗病毒性能结果中有 1 项仅达到 II 级时，该抗菌抗病毒涂料应判定为 II 级。

7.2.5 应检项目的检验结果均达到本标准要求时，该试验样品为符合本标准要求。

8 标志、包装和贮存

8.1 标志

8.1.1 按 GB/T 9750 的规定进行。

8.1.2 产品中使用的生物杀伤剂应按 GB 15258 的规定进行有危害性标识。

8.1.3 标志或说明书应明确施工状态下的施工配比、施工要求。

8.1.4 标志或说明书应清晰标明抗菌、抗病毒或抗菌抗病毒的类型、达到的抗菌率、抗菌级别、病毒灭活率以及耐久性技术指标。

8.1.5 按本标准检验合格的产品可在包装标志上明示。

8.2 包装

按 GB/T 13491 包装要求的规定进行。

8.3 贮存

产品贮存时应保证通风、干燥、阴凉，防止日光直接照射，应采取的防冻或防火措施。在适当的贮存条件下，自产品生产之日起，包装完好的产品保质期应不少于6个月，并在包装标志上明示。

全国团体标准信息平台

附录 A
(规范性附录)
抗病毒涂料的试验方法

A.1 主要设备

- A.1.1 高压灭菌锅：温度 $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，压力 $103\text{kPa}\pm 5\text{kPa}$ 。
- A.1.2 干热灭菌箱：温度 $160\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $180\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.3 天平：，精度 0.01g ；精度 0.1mg 。
- A.1.4 水浴锅：温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $56\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.5 CO_2 培养箱： $5\%\text{CO}_2$ 、温度 $34\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.6 冰箱：温度 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.7 PH计：配玻璃电极。
- A.1.8 离心机：温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， 1000 g 。
- A.1.9 培养箱：保持温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $34\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- A.1.10 玻璃和/或塑料吸管： $50\text{ mL}\pm 0.5\text{ mL}$ ； $25\text{ mL}\pm 0.25\text{ mL}$ ； $10\text{ mL}\pm 0.1\text{ mL}$ ； $5\text{ mL}\pm 0.05\text{ mL}$ 。微量吸管：刻度小于体积的 0.5% 。
- A.1.11 过滤膜：孔径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 。
- A.1.12 倒置显微镜
- A.1.13 液氮罐
- A.1.14 培养容器
- A.1.15 容量瓶：适用规格。
- A.1.16 细胞板：如用于蚀斑试验 6 孔板，用于 TCID_{50} 试验的 96 孔板。
- A.1.17 微生物试验用的涡旋器、镊子、量筒、烧瓶、试管、烧杯、离心管等。

A.2 主要试剂及材料

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.2.1 符合 GB/T 6682 规定的三级水。
- A.2.2 最低必须培养基：EMEM 培养基。
- A.2.3 7.5%碳酸氢钠溶液
75 g 碳酸氢钠，加水 1000 mL。
- A.2.4 福尔马林溶液
37%甲醛溶液 100 mL，加水 900 mL。
- A.2.5 亚甲蓝溶液，用于细胞染色。
水 1000 mL，亚甲蓝 0.375 g ， 1 mol/L 氢氧化钠溶液 $6.25\text{ }\mu\text{L}$ 溶解并混合均匀。
- A.2.6 灭活胎牛血清：FBS
 - A.2.6.1 将灭活胎牛血清置于温度低于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存，使用前将冰冻的灭活胎牛血清置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中直至解冻。

A. 2. 6. 2 如果需要自行进行胎牛血清灭活，应遵守水浴调至 56℃，30min 至灭活原则。

A. 2. 7 生长培养基

A. 2. 7. 1 水 800mL，硫酸卡那霉素 60mg，最低必需 (eagle's) 培养基 9. 53g。

A. 2. 7. 2 溶解并混合均匀再加水至 1000mL，混合液使用孔径 0. 22 μm 过滤膜过滤，然后添加 15mL 7. 5% 碳酸氢钠溶液和 100mL 热灭活胎牛血清。

A. 2. 8 细胞培养维持液 (维持介质)

水 800mL，硫酸卡那霉素 60mg，最低必需 (EMEM) 培养基 9. 53g，溶解并混合均匀加水至 1000mL，混合液使用孔径 0. 22 μm 过滤膜过滤，然后添加 15mL 的 7. 5% 碳酸氢钠溶液。

A. 2. 9 双倍浓度维持培养基

水 800mL，硫酸卡那霉素 120mg，最低必需培养基 19. 06g，溶解并混合均匀加水至 1000mL，混合液使用孔径 0. 22 μm 过滤膜过滤。

A. 2. 10 0. 01mol/L 磷酸缓冲液 PBS (-)

氯化钠 8g，氯化钾 0. 2g，十二水合磷酸氢二钠 2. 9g，磷酸二氢钾 0. 2g，溶解并混合均匀加水定容至 1000mL。在高压锅灭菌，温度 (121±2) °C，压力 (103±5) kPa 保持 15min。

A. 2. 11 牛胰蛋白酶 PBS 溶液 (-)

A. 2. 11. 1 取 0. 01mol/L 磷酸缓冲液 PBS (-) 100mL，从牛胰腺提取的胰蛋白酶 1. 0g，溶解充分混合 2h，混合液使用孔径 0. 22 μm 过滤膜过滤，过滤后未使用的分装在试管保存于 -80℃ 的冰箱中。

A. 2. 11. 2 制备：取 0. 01mol/L 磷酸缓冲液 PBS (-) 9mL，上述混合液 (A. 2. 11. 1) 1mL，溶解充分混合，保存在 -20℃ 的冰箱中。使用前，置于 37℃ 水浴中直至解冻。

A. 2. 12 胰蛋白酶 EDTA 溶液

0. 01mol/L 磷酸缓冲液 PBS (-) 1000mL，蛋白酶 2. 5g，硫酸卡那霉素 0. 1g，两性霉素 B 2mg，EDTA 0. 014mol，溶解充分并混合。混合液使用孔径 0. 22 μm 过滤膜过滤，保存在 -20 °C 的冰箱中。使用前，置于 37℃ 水浴中直至解冻。

A. 2. 13 DEAE-葡聚糖溶液

DEAE-葡聚糖 20g 加水 1000mL，溶解充分混合，混合液使用孔径 0. 22 μm 过滤膜过滤。

A. 2. 14 琼脂培养基

用于蚀斑试验，在使用前混合 A 液和 B 液。

A. 2. 14. 1 A 溶液

A. 2. 14. 1. 1 双倍浓度维持培养基 1000mL；DEAE-葡聚糖溶液 10mL；7. 5% 碳酸氢钠溶液 40mL 混合均匀。

A. 2. 14. 1. 2 对流感病毒蚀斑试验时，添加 3mL 牛胰蛋白酶 PBS 溶液 (-)。

上述 A. 2. 14. 1. 1 或 A. 2. 14. 1. 2 溶液在水浴中保持 37℃ 至使用。

A. 2. 14. 2 B 溶液

细胞培养琼脂 15g，加水 1000mL，混合均匀。使用高压蒸汽锅灭菌，温度 121℃，压力 103kPa，15min。

上述溶液在水浴中保持 (50~60) °C 至使用。

A. 2. 14. 3 使用前等比混合 A 溶液和 B 溶液 (体积比 1:1)。

A. 2. 15 SCDLP 培养基

水 1000mL，酪蛋白胨 17. 0g，大豆蛋白胨 3. 0g，氯化钠 5. 0g，磷酸氢二钾 2. 5g，葡萄糖 2. 5g，卵磷脂 1. 0g。充分混合溶解后添加非离子表面活性剂 7. 0g，充分混合。在水浴中保持 25℃ 并用氢氧化钠或盐酸调节溶液至 PH 为 7. 0±0. 2。使用高压蒸汽锅灭菌，温度 121℃，压力 103kPa，15min。

A. 3 试验准备

A. 3.1 从低温保存中复苏宿主细胞

将低温储存的宿主细胞置 37℃ 水浴，使其迅速融化。在 75cm² 细胞培养瓶里加入 20 mL 细胞生长培养基（A. 2. 7），再加入解冻的宿主细胞。将培养瓶置于 CO₂ 培养箱中，37℃ 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。

A. 3.2 宿主细胞的传代培养

A. 3. 2. 1 确认 A. 3. 1. 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 PBS 溶液（A. 2. 11）洗涤细胞，洗涤 2 次。添加 1 mL 胰蛋白酶（A. 2. 11），将培养瓶置于 CO₂ 培养箱中，在 37℃ 中保持（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（A. 2. 8），轻轻吹打分散细胞，此过程应避免细胞损伤。

A. 3. 2. 2 取一个新的细胞培养瓶，加入 1 mL 细胞悬液（A. 3. 2. 1），并补足细胞生长培养基（A. 2. 8）至 20 mL。将培养瓶置于 CO₂ 培养箱中，37℃ 培养，视细胞生长情况可传代或换液。

A. 3.3 细胞培养作感染病毒滴度测定

细胞传代后，可以铺板做病毒滴度的测定。蚀斑试验可使用 6 孔板，铺好细胞后，将培养板置于 CO₂ 培养箱中，在 37℃ 中培养 18h~24h，待细胞长满后即可进行下一步试验。

A. 3.4 测试病毒的准备

A. 3.4.1 病毒株和宿主细胞

本标准使用的病毒、宿主细胞和介质见表 A. 1。

依据使用要求，可增加选用其他商定病毒作检验病毒。

表 A. 1 本标准使用的病毒、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）	EV 71
宿主细胞	MDCK 细胞	Vero 细胞
介质	EMEM 培养基	EMEM 培养基

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。

A. 3.4.2 流感病毒

A. 3.4.2.1 移除已培养好单层细胞的培养瓶中的培养基，使用新鲜的细胞维持培养基（A. 2. 8）清洗培养细胞表面 2 次。

A. 3.4.2.2 将低温储存的病毒储备液取出，置 37℃ 迅速解冻。将解冻的病毒悬液转移至新的试管中，用细胞维持培养基（A. 2. 8）将病毒稀释至 10³ PFU/mL（或 TCID₅₀/mL）~10⁴ PFU/mL（或 TCID₅₀/mL）。接种 1 mL 稀释后的流感病毒置培养好的细胞表面（A3. 4. 2. 1），并将其置于 34℃ 中 CO₂ 培养箱中保持 1 h，使病毒吸附细胞，之后在细胞瓶内加入含 30 μL 胰蛋白酶（A. 2. 11. 2）的维持培养基（A. 2. 8）20 mL。将细胞瓶置于 CO₂ 培养箱中，在 34℃ 中培养 1 d~3 d 使病毒增殖。

A. 3.4.2.3 使用显微镜观察，如果证实流感病毒增殖，则病毒混悬液（A. 3. 4. 2. 2）放入离心管，于 4℃，1000，离心 15 min。离心后取上清液，即为流感病毒混悬液。分装后存储在 -80℃ 低温冰箱中。

A.3.4.2.4 测定病毒滴度是否大于 10^7 PFU/mL(或TCID₅₀/mL),如滴度小于 10^7 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℃水浴,使其迅速解冻。解冻后稀释至合适滴度,即为检测用的病毒悬液,若不立即使用,可暂存于2℃~8℃冰箱。

A.3.4.3 EV71 病毒

A.3.4.3.1 移除已培养好单层细胞的培养瓶中的培养基,使用新鲜的细胞维持培养基(A.2.8)清洗培养细胞表面2次。

A.3.4.3.2 将低温储存的病毒储备液取出,置37℃迅速解冻。将解冻的病毒悬液转移至新的试管中,用细胞维持培养基(A.2.8)将病毒稀释至 10^3 PFU/mL(或TCID₅₀/mL)~ 10^4 PFU/mL(或TCID₅₀/mL)。接种1 mL稀释后的流感病毒至培养好的细胞表面(A.3.4.2.1),并将其置于37℃中CO₂培养箱中保持1 h,使病毒吸附细胞,补足细胞维持培养基(A.2.8)至20 mL。将细胞瓶置CO₂培养箱中,在37℃中培养1 d~3 d使病毒增殖。

A.3.4.3.3 使用显微镜观察,如果证实EV71病毒增殖,则病毒混悬液(A.3.4.2.2)放入离心管,于4℃,1000 g,离心15 min。离心后取上清液,即为EV71病毒混悬液。分装后存储在-80℃低温冰箱中。

A.3.4.3.4 测定病毒滴度是否大于 10^7 PFU/mL(或TCID₅₀/mL),如滴度小于 10^7 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℃水浴,使其迅速解冻。解冻后稀释至合适滴度,即为检测用的病毒悬液,若不立即使用,可暂存于2℃~8℃冰箱。

A.3.5 试板制备

A.3.5.1 产品按GB/T 3186的规定进行取样,也可按商定的方法取样。取样量根据试验需要而定。

A.3.5.2 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。

A.3.5.3 除另有商定外,制备抗病毒试板(C样)底材为不锈钢片、马口铁片或铝片,抗病毒涂料施涂一般为二次涂刷,刷涂第一遍表干后再刷涂第二遍,涂膜总厚度为100 μm,样品表面应平整、无锈无油污等。以木材为底材的试板,要求漆膜覆盖整块试板。试板涂刷后按GB/T 9278规定的条件干燥7 d。试板尺寸为50 mm×50 mm。

A.3.5.4 按A.3.5.3涂刷及干燥工艺制备纯空白对照试板(B样),该空白对照试板(B样)仅使用成膜物质和必要溶剂,不含任何抗病毒剂、抗菌剂、防霉剂、防腐剂等添加助剂物质。试板尺寸为50 mm×50 mm。

注1:也可以向第三方购买的纯空白对照板。

注2:试样数量按照测试方法的规定制备。

A.3.5.5 在试验前所有试板均需要进行灭菌处理,一般可采用紫外照射30 min的方式。

注:也可以选择其他合适的方法。

A.4 试验程序

A.4.1 预试验

预试验的目的是确定检测样品洗脱液(中和剂)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。

A.4.1.1 细胞毒性试验

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肉汤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。以洗脱液作为试验样液，接种细胞板并进行培养观察，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。

A. 4. 1. 2 验证细胞对病毒的敏感性和洗脱液终止杀病毒的性能

A. 4. 1. 2. 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肉汤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。从皿中取5 mL SCDLP肉汤回收液到新的试管中。另取3支试管，分别加入5 mL SCDLP肉汤培养基作为阴性对照。加50 μ L制备好的浓度为 $(4\sim 6) \times 10^4$ PFU/mL（或TCID₅₀/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、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。

A. 4. 1. 2. 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作比较，其对数值应满足式（1）和式（2）的要求：

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

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

其中：

S_n—3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）；

S_u—3个空白对照试板（B样）回收的平均病毒滴度对数值，单位为PFU/mL（TCID₅₀/mL）；

S_t—3个抗病毒试板（C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。

A. 4. 2 正式试验

A. 4. 2. 1 试样准备

取制备好的空白对照试板（B样）6片，抗病毒试板（C样）3片，分别单独放入无菌培养皿中，测试面朝上。

A. 4. 2. 2 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℃水浴，使其迅速融化。用维持培养基将病毒悬液浓度调整在 1×10^7 PFU/mL（或TCID₅₀/mL） $\sim 5 \times 10^7$ 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℃冰箱。

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×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。在试样接种完后盖上薄膜后，盖上培养皿盖。

注1：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。

注2：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。

A. 4. 2. 3 接种后试样的培养

除特别说明外，接种后的试板，在 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、相对湿度不小于90%的条件下培养2 h。各方也可以协商采用不超过24 h的其它培养时间，并在报告中注明。

A. 4. 2. 4 病毒的洗脱回收

A. 4. 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肉汤或其他适宜而有效的中和剂，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A. 4. 3。

注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。

注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。

A. 4. 2. 4. 2 接种培养结束后，按照A. 4. 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。

A. 4. 3 感染病毒滴度测试（蚀斑法）

A. 4. 3. 1 操作步骤

A. 4. 3. 1. 1 在6孔细胞培养板的每个孔内培养单层细胞（A. 3. 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。使用细胞维持培养基（A. 2. 8）清洗细胞表面2次。

A. 4. 3. 1. 2 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（A. 2. 8），做阴性对照。

A. 4. 3. 1. 3 将接种后的6孔板置于表A. 2所列温度的 CO_2 培养箱中，孵育1 h，使病毒吸附到细胞上。每隔15 min摇一下细胞板，让病毒悬液充分和细胞接触。接种规定时间后取2 mL~3 mL维持培养基（A. 2. 8）加到6孔板上，清洗表面，然后弃掉多余的培养基。

A. 4. 3. 1. 4 加入3 mL琼脂培养基（A. 2. 14）做蚀斑实验，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，倒置细胞板，放入5% CO_2 培养箱中，流感病毒于 34°C 培养4 d~7 d，肠道病毒于 37°C 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的福尔马林溶液（A. 2. 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，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（A. 2. 5），用水冲洗一下。确认细胞染色。计算斑的数量（白色斑点）。

A. 4. 3. 1. 5 计数蚀斑的数量（白色斑点），取两个孔的平均值。蚀斑试验示例见图A. 1。

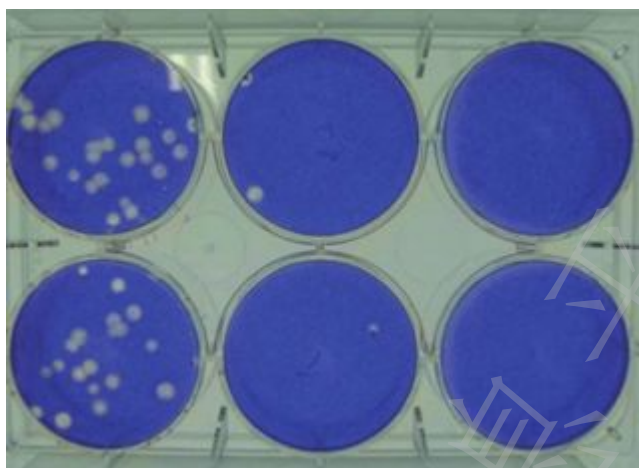


图 A.1 蚀斑试验示例

表 A.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：适用于本标准规定的病毒及蚀斑法。		

A.4.3.2 PFU 测定

A.4.3.2.1 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。

A.4.3.2.2 对合适的稀释度上的蚀斑进行计数，其空斑数量计算如表 A.3 所示。

表 A.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

本标准中规定如下：

---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。

注：感染病毒滴度测定也可以采用其他已经证实的方法测定，如 TCID₅₀ 方法。

A.5 感染病毒滴度的计算

A.5.1 按 A.4 方法的感染滴度按式（3）（4）计算：

$$P=Z \times R \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

P—感染滴度（PUF/0.1 mL）；

Z—两孔蚀斑数的平均值（PUF/0.1 mL）；

R—稀释倍数。

$$W = P \times 10 \dots\dots\dots (4)$$

式中：

W—感染滴度 (PUF/mL)。

病毒的感染滴度按式 (5) 计算：

$$V_P = W \times C / S \dots\dots\dots (5)$$

式中：

V_P —病毒的感染滴度 (PUF/cm²)；

C—病毒洗脱液体积 (mL)。

S—覆盖膜的面积 (cm²)

A. 5. 2 试验结果

A. 5. 2. 1 试验有效性

试验结果应满足如下要求，认为试验有效：

a) 空白对照试板 (B样) 接种后即时测得的平均值应在 2.5×10^5 PFU/cm² (或TCID₅₀/cm²) 至 1.2×10^6 PFU/cm² (或TCID₅₀/cm²) 的范围内。

b) 空白对照试板 (B样) 接种 2 h 测得的平均值应在 2.5×10^3 PFU/cm² (或TCID₅₀/cm²) 至 1.2×10^4 PFU/cm² (或TCID₅₀/cm²)

A. 5. 2. 2 病毒灭活率的计算

病毒灭活率按公式 (7) 计算：

$$R = (B - C) / B \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

式中：

R—病毒灭活率 (%)，数值取 2 位有效数字；

B—3 个空白对照试板 (B样) 接种 2 h 后回收的平均滴度值，单位为 PFU/cm² (或TCID₅₀/cm²)；

C—3 片抗病毒试板 (C样) 接种 2 h 后回收的平均滴度值，单位为 PFU/cm² (或TCID₅₀/cm²)。

A. 6 抗病毒耐久性试验

进行抗病毒耐久性试验前，试板应进行如下预处理。试板应完全浸泡在盛有 25℃ 水的玻璃水槽或玻璃容器中，试板之间互不接触，水面高出试板 20mm，浸泡时间 24 h。浸泡后试板涂膜表面不应有起泡、脱落、开裂等现象。取出后采用 1 支 30W、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 A. 4 章和 A. 5 章的规定进行试验。

A. 7 抗病毒试验结果记录

应详细记录试验的病毒种类、宿主细胞、接种病毒液量、样品 B、样品 C 接触后的病毒数量、病毒灭活率、试板类型、试剂名称、浓度等相关信息。

