

Germagic 霉菌灭滤膜杀灭流感病毒和 肠道病毒的检测报告

样品名称: Germagic 霉菌灭滤膜

委托单位: 捷和实业有限公司

检测类别: 委托检测

检测单位: 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心
广州呼研所医药科技有限公司

报告日期: 2016年3月1日



摘要

目的：评价“Germagic 霾菌灭”滤膜对甲型流感病毒（A/PR/8/34,H1N1）和肠道病毒 EV71 临床分离株的体外杀灭效果。

方法：参考《消毒技术规范》中 2.1.1.10 病毒灭活试验和受试产品说明书制定本研究方案，其中包括细胞毒性试验、消毒剂中和试验和病毒杀灭实验。

结果：细胞毒性试验、中和剂筛选及中和试验和病毒体外杀灭试验已经完成，（1）中和剂、“Germagic 霾菌灭”滤膜和中和产物对细胞毒性低；（2）“Germagic 霾菌灭”滤膜中和剂鉴定试验显示中和剂能完全中和消毒剂消毒效果；（3）在本测试设置的实验条件下，“Germagic 霾菌灭”滤膜与病毒悬液反应 10、30 或 60 分钟能较好地杀灭流感病毒 PR8 毒株和肠道病毒 EV71 临床分离株。

结论：中和剂通过中和剂鉴定试验，符合《消毒技术规范》2.1.1.10.5 中和剂合格标准；在本测试设置的实验条件下，“Germagic 霾菌灭”滤膜能较好地杀灭流感病毒 PR8 毒株和肠道病毒 EV71 临床分离株。

材料与amp;方法

1.实验材料

- 1.1 受试样品：“Germagic 霾菌灭”滤膜，每平方厘米滤膜的“Germagic 霾菌灭”涂层含量为 0.0155 ml，由捷和实业有限公司提供。
- 1.2 细胞：狗肾细胞（MDCK）和 Buffalo 绿猴肾细胞（BGM），购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。
- 1.3 病毒株：甲型流感病毒（A/PR/8/34,H1N1）和肠道病毒 EV71 临床分离株，由广州呼研所医药科技有限公司提供。病毒滴度 $\geq 10^5$ TCID₅₀/ml。
- 1.4 中和剂：9g NaCl + 2.2g Tween 80 + 20ml 1M Na₂S₂O₃，溶解于 1L 的去离子水。中和剂使用前按照 1:2.5 比例将中和剂和硬水混合。

2.实验方法

2.1 细胞毒性实验（MTT 法）

（1）以下 4 组分别混合，

1. “Germagic 霾菌灭”滤膜+ 中和剂 7.0 ml
2. “Germagic 霾菌灭”滤膜+ PBS 7.0 ml

3. 中和剂 7.0 ml

4. PBS 7.0 ml

混匀后在室温放置 10min。

(2) 以上各组连续用 PBS 10 倍梯度稀释 5 个滴度，将各组的稀释液加入到预先准备好细胞的 96 孔细胞培养板中，每稀释度设置 4 孔，每孔 100 μ l 。

(3) 置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 的培养箱中孵育 1 小时后弃去上清液，加入细胞维持培养液。置于 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 培养箱中培养 48 小时后观察细胞生长状况，并做 MTT 试验，评价对细胞的毒性。

(4) MTT 试验方法测抑制率，每孔加入 MTT 溶液（5mg/ml）20 μ l，设立无细胞的空白对照组，置 37 $^{\circ}$ C，4 小时。弃去上清液，每孔加入 100 μ l 2-甲基亚砷（DMSO），低速振荡 10 分钟，使结晶物充分融解。选择 490 nm 波长，在酶标仪上测定各孔光吸收值。按照下列公式计算抑制率。

抑制率=[（PBS 组平均 OD 值-空白对照组平均 OD 值）-（试验组平均 OD 值-空白对照组平均 OD 值）]/（PBS 组平均 OD 值-空白对照组平均 OD 值） \times 100%。

2.2 中和剂鉴定试验

以甲型流感病毒 PR8 株为代表株，对候选中和剂进行评价，实验方案及评价标准参考《消毒技术规范》2.1.1.10.5 残留消毒剂化学中和法的鉴定试验。

(1) 将“Germagic 霾菌灭”滤膜裁剪为 16 cm² 的正方形，清洁灭菌，按以下 5 种分组混合，

1. “Germagic 霾菌灭”滤膜+ 流感病毒悬液 1.0 ml

2. “Germagic 霾菌灭”滤膜+ 流感病毒悬液 1.0 ml

3. “Germagic 霾菌灭”滤膜+ 中和剂 7.0 ml

4. 中和剂 7.0 ml + 流感病毒悬液 1.0 ml

5. PBS 7.0 ml + 流感病毒悬液 1.0 ml

(2) 混匀后，第 3 组在室温放置 10 分钟，加入流感病毒悬液 1.0 ml，室温放置 1 小时，4 $^{\circ}$ C 备用。第 1 组和第 2 组室温放置 1 小时，第 1 组加入 PBS 7.0 ml，第 2 组加入中和剂 7.0 ml，室温放置 10 分钟，4 $^{\circ}$ C 备用。第 4 组和第 5 组室温放置 1 小时，4 $^{\circ}$ C 备用。

(3) 10 倍倍比稀释上述各组混合液，将稀释液加入含生长至单层的 MDCK 细胞的 96 孔细胞培养板上，每稀释度设置 4 孔，每孔 100 μ l，同时设置正常对照组，加等量培养液。

(4) 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 2 小时后弃去上清液，加入含双抗 400IU/ml 的培养液（含浓度为 1.5 μ g/ml 的 TPCK），置于 34 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 的培养箱继续孵育 2~4 天。

每天观察细胞生长状况，当 MDCK 细胞出现萎缩，变圆和脱落等病变现象（CPE）时，记录产生 CPE 的情况。根据 Reed-Muench 公式计算半数感染量 $TCID_{50}$ 。

2.3 病毒杀灭实验

病毒杀灭试验实验方案及评价标准参考《消毒技术规范》2.1.1.10 病毒灭活试验。

- (1) 将“Germagic 霉菌灭”滤膜和空白材料裁剪为 16 cm^2 的正方形，清洁灭菌备用。
- (2) “Germagic 霉菌灭”滤膜和空白材料分别与 1.0 ml 的流感病毒或肠道病毒悬液混匀，室温放置 10、30 或 60 分钟，加入中和剂 7.0 ml，室温放置 10 分钟， 4°C 备用。试验重复 3 次。
- (3) 10 倍倍比稀释上述各组混合液，将稀释液加入含生长至单层的 MDCK 细胞或 BGM 细胞的 96 孔细胞培养板上，每稀释度设置 4 孔， $100\mu\text{l}$ /孔，同时设置正常对照组，加等量培养液。
- (4) 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中孵育 2 小时后弃去上清液，加入含双抗 400IU/ml 培养液，置于 34°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱继续孵育 2~4 天。流感病毒维持培养液为含 $1.5\mu\text{g/ml}$ TPCK 的 MEM 培养液，肠道病毒维持培养液为含 2% FBS 的 MEM 培养液。每天观察细胞生长状况，当 MDCK 细胞或 BGM 细胞出现变圆和脱落等病变现象（CPE）时，记录产生 CPE 的情况。根据 Reed-Muench 公式计算半数感染量 $TCID_{50}$ 。

3. 结果

3.1 细胞毒性试验

MTT 结果表明，中和剂对 MDCK 和 BGM 细胞基本无毒性作用，“Germagic 霉菌灭”滤膜及中和产物一定稀释后对 MDCK 和 BGM 细胞基本无毒性作用。

3.2 中和剂鉴定试验

中和剂鉴定试验结果基本符合《消毒技术规范》2.1.1.10.5 中和剂合格标准。第 1 组和第 2 组能较好地杀灭流感病毒，第 3 组的流感病毒滴度与第 5 组空白组相似。第 4 组结果显示中和剂对病毒无毒性，见表 1。

表 1. “Germagic 霍菌灭”滤膜中和剂鉴定试验结果

分组	第一次试验	第二次试验	第三次试验	平均值
	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)
1	5.00	5.83	5.33	5.39
2	5.50	5.50	5.33	5.44
3	7.00	7.00	6.50	6.83
4	7.33	7.00	7.00	7.11
5	7.50	7.23	7.00	7.24

3.3 病毒杀灭试验

在本试验实验条件下，Germagic 霍菌灭”滤膜与流感病毒和肠道病毒悬液反应。结果显示，在本试验规定的时间点内，Germagic 霍菌灭”滤膜对流感病毒和肠道病毒杀灭效果较好，见表 2、表 3 和表 4。

表 2. “Germagic 霍菌灭”滤膜不同作用时间点对流感病毒的杀灭效果

病毒	时间 (min)	第一次试验	第二次试验	第三次试验	平均值	对照组平均值 Log(TCID ₅₀ /ml)
		Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	
PR8	10	5.50	5.00	5.00	5.17	6.32
	30	5.33	5.33	3.50	4.72	6.78
	60	0	0	2.33	0.78	6.72

表 3. “Germagic 霍菌灭”滤膜不同作用时间点对肠道病毒的杀灭效果

病毒	时间 (min)	第一次试验	第二次试验	第三次试验	平均值	对照组平均值 Log(TCID ₅₀ /ml)
		Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	Log(TCID ₅₀ /ml)	
EV71	10	4.67	5.00	4.67	4.78	5.50
	30	4.67	5.50	5.50	5.22	7.33

表 4. “Germagic 霉菌灭”滤膜对流感病毒和肠道病毒的平均病毒灭活负对数值

病毒	时间 (min)	平均病毒灭活率	平均病毒灭活负对数值
PR8	10	92.921%	1.15
	30	99.129%	2.06
	60	>99.999%	5.94
EV71	10	80.945%	0.72
	30	99.224%	2.11

以下空白