

Germagic 霾菌灭滤膜杀灭流感病毒 的检测报告

样品名称: Germagic 霾菌灭滤膜

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9月5日



呼研所

呼研所

报告申明

- 一、 报告仅对送检样品（机）负责。
- 二、 报告涂改增删无效，未加盖本单位公章（包括骑缝章）无效，复印件无效。
- 三、 对检测报告若有异议，必须于收到报告之日起十五日内向检测单位提出质疑，逾期不予受理。
- 四、 本研究仅限于探讨送检样品的病毒杀灭作用，任何用于商业目的的产品推广及市场活动均需严格按照本实验结果报告及其有关解释，否则本检测单位有权追究相应的责任。
- 五、 本检验报告一式 4 份，2 份交送检单位，2 份由检验机构存档。
- 六、 本检验报告有效期为三年。

摘要

目的：评价“Germagic 霾菌灭”滤膜对乙型流感病毒株（B/Lee/1940）、甲型 H1N1 流感病毒（A/Guangzhou/GIRD02/2009,H1N1）和甲型 H3N2 流感病毒（A/HK/68, H3N2）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、中和剂筛选及中和剂鉴定试验和病毒杀灭试验已经完成，（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 分钟能较好地杀灭乙型流感病毒株（B/Lee/1940）、甲型 H1N1 流感病毒（A/Guangzhou/GIRD02/2009,H1N1）和甲型 H3N2 流感病毒（A/HK/68, H3N2）。

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”滤膜能较好地杀灭乙型流感病毒株（B/Lee/1940）、甲型 H1N1 流感病毒（A/Guangzhou/GIRD02/2009,H1N1）和甲型 H3N2 流感病毒（A/HK/68, H3N2）。

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），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：乙型流感病毒株（B/Lee/1940）、甲型 H1N1 流感病毒（A/Guangzhou/GIRD02/2009,H1N1）和甲型 H3N2 流感病毒（A/HK/68, H3N2），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 霉菌灭”滤膜+ 中和剂 7.0 ml

2. “Germagic 霉菌灭”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 霉菌灭”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 霍菌灭”滤膜+ 流感病毒悬液 1.0 ml
2. “Germagic 霍菌灭”滤膜+ 流感病毒悬液 1.0 ml
3. “Germagic 霍菌灭”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℃ 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℃ 备用。第 4 组和第 5 组室温放置 1 小时，4℃ 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℃、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℃，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 TCID₅₀。

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 霍菌灭”滤膜和空白材料裁剪为 16 cm² 的正方形，清洁灭菌备用。
- (2) “Germagic 霍菌灭”滤膜和空白材料分别与 1.0 ml 的流感病毒悬液混匀，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℃ 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 细胞的 96 孔细胞培养板上，每稀释度设置 4 孔，100 μ l/孔，同时设置正常对照组，加等量培养液。
- (4) 置于 37℃、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 培养液，置于 34℃，5%CO₂ 的培养箱继续孵育 2~4 天。流感病毒维持培养液为含 1.5 μ g/ml TPCK 的 MEM 培养液。每天观察细胞生长状况，当 MDCK 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

TCID₅₀。

3.结果

3.1 细胞毒性试验

MTT 结果表明,中和剂对 MDCK 基本无毒性作用,“Germagic 霾菌灭”滤膜及中和产物一定稀释后对 MDCK 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 霾菌灭”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 霾菌灭”滤膜与流感病毒悬液反应。结果显示,在本

试验规定的时间点内，“Germagic 霾菌灭”滤膜对流感病毒杀灭效果较好，见表 2、表 3 和表 4。

表 2. “Germagic 霾菌灭”滤膜不同作用时间点对乙型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)	
B/Lee/1940	10	5.33	5.33	6.00	5.55	6.76
	30	4.23	4.67	4.50	4.47	6.42
	60	4.67	4.5	3.67	4.28	6.55

表 3. “Germagic 霾菌灭”滤膜不同作用时间点对甲型 H1N1 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)	
A/Guangzhou/ GIRD02/2009	10	4.67	5.00	5.00	4.89	5.67
	30	4.00	4.00	4.00	4.00	5.22
	60	2.50	2.50	3.33	2.78	6.22

表 4. “Germagic 霾菌灭”滤膜不同作用时间点对 H3N2 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)	
A/HK/68	10	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	3.33
	30	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	3.44
	60	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	3.24

表 5. “Germagic 霾菌灭”滤膜对流感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
B/Lee/1940	10	93.83%	1.21
	30	98.88%	1.95
	60	99.46%	2.27
A/Guangzhou/ GIRD02/2009	10	83.40%	0.78
	30	93.97%	1.22
	60	99.96%	3.44
A/HK/68	10	≥99.53%	≥2.33
	30	≥99.64%	≥2.44
	60	≥99.42%	≥2.24

以下空白