

ICS 11.140
C 48



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1497—2016

医用防护口罩材料病毒过滤效率评价测试 方法 Phi-X174 噬菌体测试方法

**Evaluation test method for the viral filtration efficiency(VFE)of medical
protective face mask materials—Test method using Phi-X174 bacteriophage**

2016-07-29 发布

2017-06-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准由国家食品药品监督管理局北京医疗器械质量监督检验中心归口。

本标准起草单位：北京市医疗器械检验所、青岛众瑞智能仪器有限公司。

本标准主要起草人：刘思敏、金国胜、李成志、潘四春。

医用防护口罩材料病毒过滤效率评价测试 方法 Phi-X174 噬菌体测试方法

1 范围

本标准规定了用 Phi-X174 噬菌体悬浮液为替代微生物,对医用防护口罩或口罩材料进行病毒过滤效率的测试方法。

本标准适用于有病毒过滤效率评价要求的医用防护口罩或口罩材料。

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 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

病毒 virus

无独立的代谢系统,只能在活的宿主细胞内复制的具有感染性的微小生物。

3.2

噬菌体 bacteriophage

能感染细菌的一种病毒。

注:本试验方法中,噬菌体即指 Phi-X174。Phi-X174 对人类不是致病病毒,但可用于模拟对人类有致病性的病毒。

3.3

溶解 lysis

整个细菌细胞裂解或破坏。

注:本试验方法中,大肠杆菌作为宿主细胞因 Phi-X174 侵入而引起溶解。

3.4

噬菌斑 plaque

(病毒学)理论上由单个活病毒感染、溶解宿主细胞而形成的清晰可见区域。

注:本试验方法中,噬菌斑即指琼脂层上 *E.coli* C 的菌落中的清晰可见区域,理论上是单个存活的 Phi-X174 感染和溶解细菌的结果。

3.5

空斑形成单位 plaque-forming unit

PFU

通过感染和溶解琼脂上层的细菌而产生噬菌斑的病毒粒子。

3.6

替代微生物 surrogate microbe

用于模拟致病性微生物的模式微生物。

YY/T 1497—2016

注：本试验方法中，替代微生物即指噬菌体 Phi-X174。

3.7

病毒过滤效率 viral filtration efficiency

VFE

在规定流量下，测试样品对病毒悬浮粒子滤除的百分数。

4 测试方法

4.1 测试原理

使带有一定病毒浓度的气溶胶，以一定流速穿过样品，通过测定穿透样品前、后气溶胶中的病毒数量，计算该样品对病毒的过滤效率。

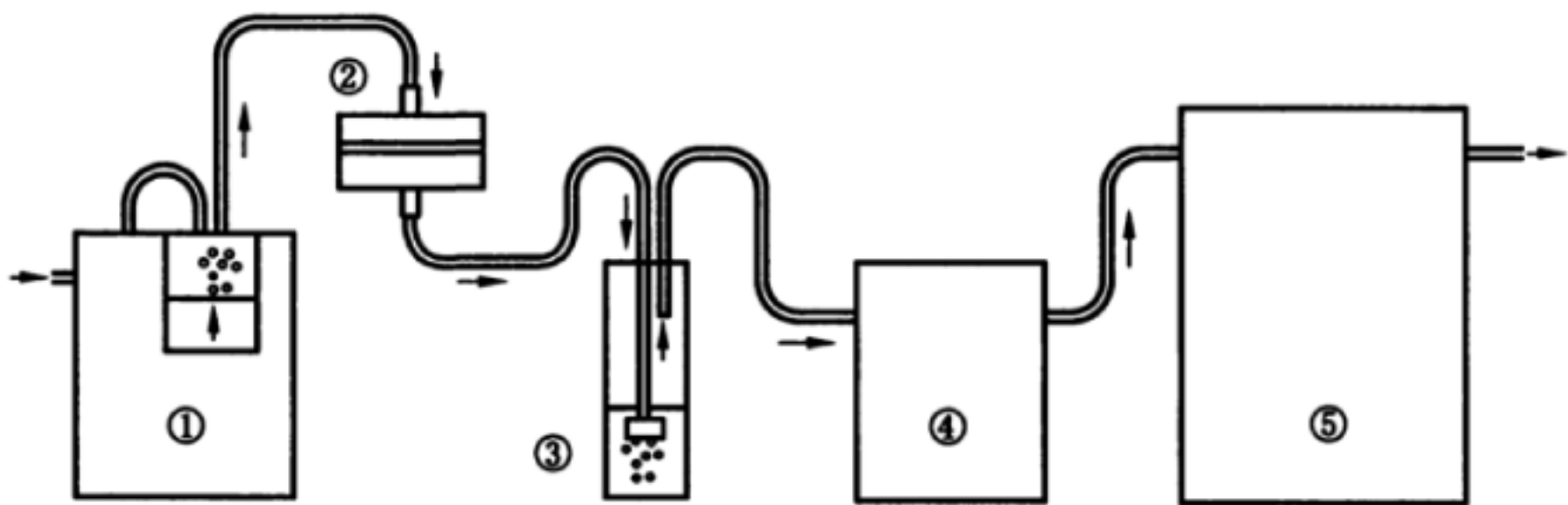
4.2 仪器和实验试剂

4.2.1 采样器

AGI-30 液体冲击式采样器(每通道 2 个采样器)，能承受最大 12.5 L/min 流量冲击。

4.2.2 病毒过滤效率测试设备

病毒过滤效率测试设备(见图 1)：采用芝加哥式原理的气溶胶发生器制备测试用病毒气溶胶。根据喷雾器情况，调试气溶胶产生速率(一般 6 L/min~8 L/min)，使所产生气溶胶的平均颗粒直径(MPS)为 $(3.0\pm0.3)\mu\text{m}$ ，气溶胶分布的几何标准差应不超过 1.5。连接管路应保证气溶胶从上至下垂直撞击水平放置的样品，样品采样区为圆形，直径为 $(8.3\pm0.1)\text{cm}$ ，测试医用防护口罩用拱形网支撑，测试口罩材料用平面网支撑(见图 2)。气溶胶通过样品后即进入 2 个 AGI-30 液体冲击式采样器(4.2.1)。每个采样器用 20 mL 无菌蛋白胨水收集穿过样品的病毒颗粒。液体冲击式采样器的出口通过单独的管道与气体流量表相连接来控制气体流速。经过气泵抽吸，气体以 25 L/min 的速度进入整个测试系统。在实验开始前，所有能与病毒气溶胶接触的系统部件均应经 121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min。测试设备可采用符合本标准规定的等效设备，采用单通道或双通道均可实施检验。



- 说明：
- ①——气溶胶发生器；
 - ②——样品；
 - ③——液体冲击式采样器；
 - ④——流量计；
 - ⑤——气泵。

图 1 测试设备原理

4.2.3 其他设备

- 4.2.3.1 气源：能提供至少 50 kPa 的气压。
- 4.2.3.2 培养箱：能保持温度在 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。
- 4.2.3.3 水浴锅：能获得 $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的温度。
- 4.2.3.4 涡流混匀器。
- 4.2.3.5 冰箱：能维持温度在 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ 。
- 4.2.3.6 压力蒸汽灭菌器：能维持温度在 $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。
- 4.2.3.7 计时器，准确度至少为 1 s。
- 4.2.3.8 振荡器。
- 4.2.3.9 pH 计，精度至少为 0.1 pH 单位。
- 4.2.3.10 接种环。
- 4.2.3.11 分光光度计：能在 640 nm 处测量吸光度。
- 4.2.3.12 离心机：能提供 10 000 r/min 的转速。
- 4.2.3.13 0.45 μm 过滤膜。

单位为毫米

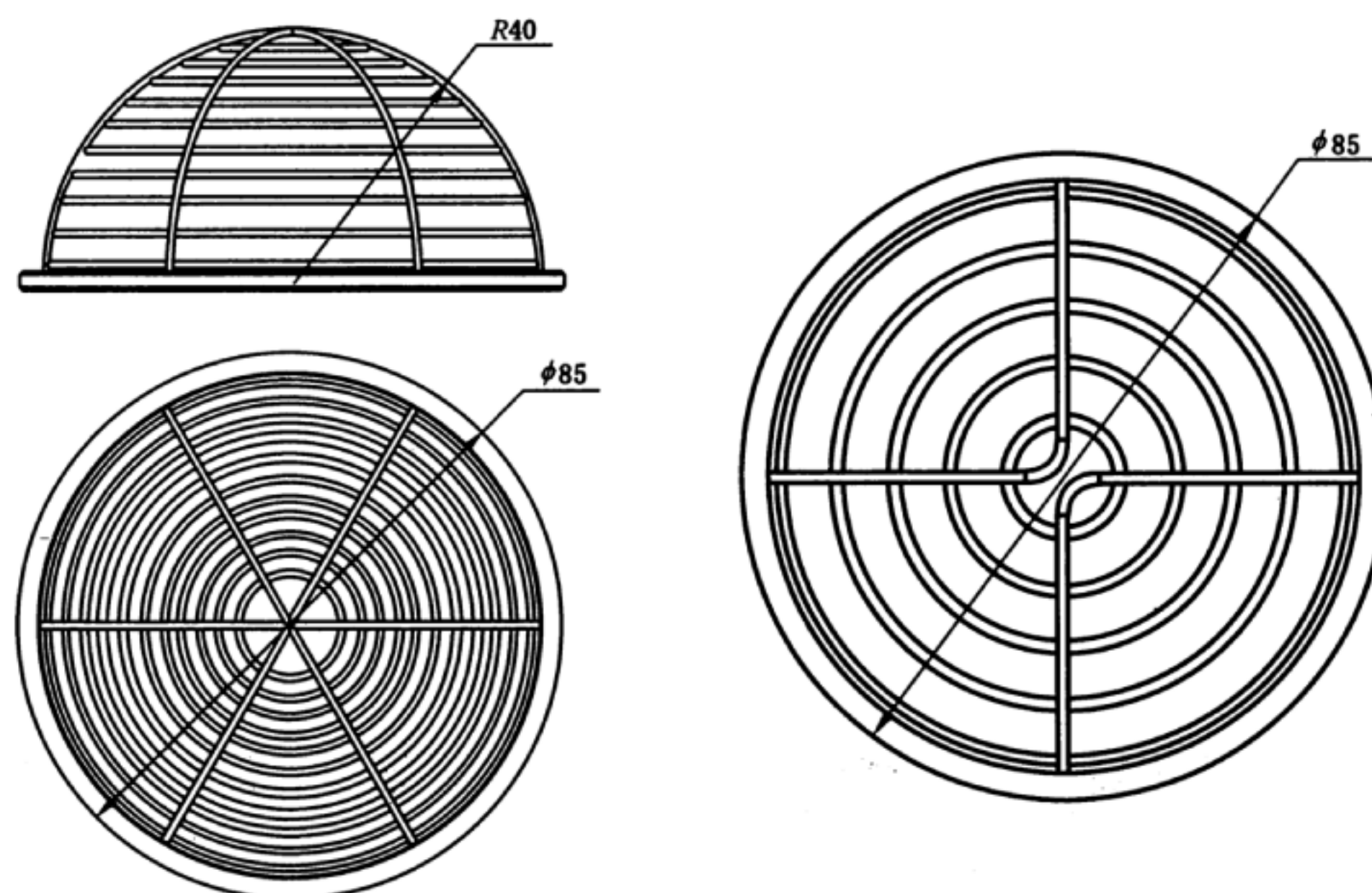


图 2 拱形、平面形支撑网

4.2.4 实验试剂

4.2.4.1 噬菌体营养肉汤(Phi-X174)配方如下：

胰蛋白胨	8 g
氯化钾	5 g
氯化钙	0.2 g
加水至	1 000 mL

121 $^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min 后，pH 值为 7.3 ± 0.2 。

4.2.4.2 下层琼脂配方如下：

YY/T 1497—2016

琼脂	15 g
营养肉汤	8 g
氯化钾	5 g
氯化钙	0.2 g
加水至 1 000 mL	
121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min 后,pH 值为 7.3±0.2。	

4.2.4.3 上层琼脂配方如下:

琼脂	7 g
营养肉汤	8 g
氯化钾	5 g
氯化钙	0.2 g
加水至 1 000 mL	
121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min 后,pH 值为 7.3±0.2。	

4.2.4.4 0.1%无菌蛋白胨水。

4.2.4.5 噬菌体 Phi-X174(ATCC 13706-B1),浓度至少为 1.0×10^8 PFU/mL。

4.2.4.6 大肠杆菌(ATCC 13706)。

4.2.4.7 试验用水,至少符合 GB/T 6682—2008 中规定的 3 级水。

4.3 预处理

每一测试样品应在温度为 $(21 \pm 5)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(60 \pm 10)\%$ 的环境中放置至少 24 h。

4.4 试验步骤

4.4.1 噬菌体悬浮液的制备程序

噬菌体悬浮液的制备的程序如下:

- 将 10 mL~25 mL 噬菌体营养肉汤(4.2.4.1)加入装有 250 mL 三角瓶中,用接种环将大肠杆菌接种于该营养肉汤中,在温度为 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$,转速为 (225 ± 25) r/min 的条件下培养过夜;
- 用 100 mL 新鲜制备的噬菌体营养肉汤将上述培养过夜的细菌培养液 1:100 稀释,置于 1 L 的三角瓶中。在温度为 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$,转速为 (225 ± 25) r/min 的条件下培养。大约 3 h 后,细菌增殖至浓度为 $(3 \pm 1) \times 10^8$ CFU/mL,与此对应的培养液吸光度值为 0.3~0.5(640 nm);
- 取浓度约 1.0×10^6 PFU/mL 的噬菌体液 1 mL 加入到一个无菌的洁净试管中,再向试管加入上述大肠杆菌悬液 4 mL,振荡混匀,再加入 25 mL 温度为 $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的上层琼脂培养基(4.2.4.3),振荡混匀;
- 将上述混匀后的上层琼脂培养基倒入直径为 150 mm 的无菌洁净平皿中,置于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下,培养 3 h~4 h;
- 培养结束后,收集该上层琼脂培养基于洁净的无菌离心管中,在 10 000 r/min 下离心 20 min 以去掉细胞碎片,将上清液倒入洁净的无菌试管中;
- 将含有噬菌体的上清液用 0.45 μm 的膜过滤,以纯化噬菌体溶液;
- 测定噬菌体溶液的浓度,并置于 $(4 \sim 8)^\circ\text{C}$ 条件下保存,此时测得的噬菌体浓度一般在 $(2.0 \pm 2) \times 10^8$ PFU/mL 的范围内;
- 用 0.1% 无菌蛋白胨水将噬菌体培养液稀释至测试所需的浓度以制得噬菌体挑战悬浮液。

4.4.2 试验程序

气溶胶发生器的液体容器中加入适量检测用噬菌体挑战悬浮液。噬菌体浓度通过 4.4.1 所述方法进行控制,使其约为 1.0×10^8 PFU/mL。每次测试前,用净化的空气灌注整个系统约 45 s 使气路平衡后,开启气溶胶发生器,向喷雾器输送噬菌体悬液的时间设定为 1 min,空气压力和采样器运行时间设定为 2 min,在 2 个 AGI-30 液体冲击采样器中分别放入 20 mL 0.1% 无菌蛋白胨水收集噬菌体气溶胶,形成样品组试验液和阳性对照组试验液。采样器阳性对照值按照 5.1 方法计算,应不小于 10^6 PFU,否则应调整菌液浓度。试验样品组、阳性对照组测试各重复 3 次。

4.4.3 试验液的定量测试

将样品组试验液梯度稀释至 10^{-3} ,阳性对照组试验液梯度稀释至 10^{-7} ,用下述程序定量测试稀释后的试验液(4.4.2 所得)中噬菌体的数目:

- 移取 2.5 mL 融化的无菌上层琼脂培养基到已灭菌的试管中,并保持上层琼脂培养基温度在 $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- 将盛有上层琼脂培养基的试管从热源上移走,迅速加入 0.5 mL 稀释后的试验液,以制备接种管;
- 每个接种管中加入 100 μL 过夜放置的大肠杆菌培养物;
- 将试管充分混匀,倒在下层琼脂培养基平板的表面上;
- 每个试验样品和对照样品收集来的试验液,均制备 2 个平板(平板直径 90 mm);
- 让琼脂凝固,并在 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养,直至产生肉眼清晰可见的噬菌斑,通常约 3 h~4 h;
- 培养后,对噬菌斑在 30 PFU~300 PFU 范围内的平皿进行计数,若最小稀释倍数的噬菌斑数小于 30,则按实际数量记录,若无噬菌斑,则噬菌斑记为“<1”。

5 结果计算

5.1 按式(1)计算采样器噬菌体阳性对照计算结果:

$$Y = \frac{c}{0.5} \times 40 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

Y——采样器阳性对照值,PFU;

c——阳性对照组试验液 2 个平板噬菌斑计数平均值 $\times$ 相应稀释倍数,PFU。

分别计算 3 个采样器阳性对照值。

5.2 按式(2)计算病毒过滤效率结果:

$$\text{VFE} = \frac{c - T}{c} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

VFE——病毒过滤效率,%;

c——阳性对照组试验液 2 个平板噬菌斑计数平均值 $\times$ 相应稀释倍数,PFU;

T——试验样品组试验液 2 个平板噬菌斑计数平均值 $\times$ 相应稀释倍数,PFU。

分别计算 3 个试验样品的病毒过滤效率。

报出结果应选取三个平行试样结果的最小值。

YY/T 1497—2016

6 试验报告

报告应至少包括下列内容：

- a) 引用本标准的说明；
- b) 试验材料信息(制造商、供应商、批号、材质及到样日期)；
- c) 样品的预处理条件(例如,温度、相对湿度)；
- d) 试验菌种名称、编号及浓度；
- e) 单次测试结果；
- f) 试验人员和试验日期；
- g) 任何偏离本标准的情况。

YY/T 1497—2016

参 考 文 献

- [1] YY 0469—2011 医用外科口罩
 - [2] YY/T 0689—2008 血液和体液防护装备 防护服材料抗血液传播病原体穿透性能测试
Phi-X174 噬菌体试验方法
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医用防护口罩材料病毒过滤效率评价测试
方法 Phi-X174 噬菌体测试方法
YY/T 1497—2016

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

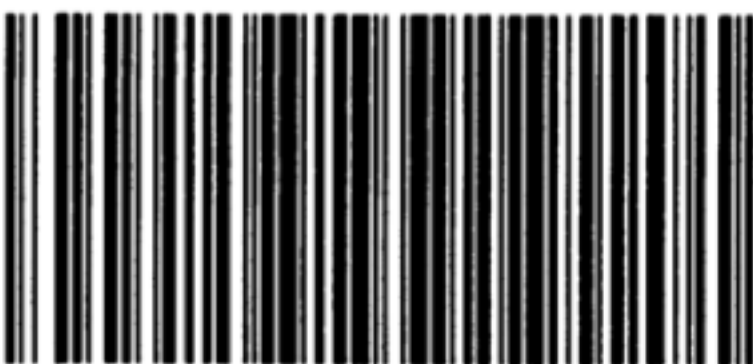
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2017 年 4 月第一版 2017 年 4 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 2-31479 定价 18.00 元



YY/T 1497—2016