

如何测试材料抗病毒活性？

产品名称	如何测试材料抗病毒活性？
公司名称	深圳市天润标准技术服务有限公司
价格	.00/件
规格参数	服务1:包通过 服务2:包整改 服务3:一次性收费
公司地址	深圳市龙华区龙华街道富康社区东环一路100号 良基大厦101C04
联系电话	13828872873 13828872873

产品详情

受污染的物体和材料的表面可能是病毒传播的重要途径，自COVID-19大流行以来，我们可能已经养成定期擦拭经常接触的物体表面的习惯，但是对于能够快速灭活任何一种病毒的新一代抗病毒材料的需求也在不断增长。研究人员一般采取两种主要途径来研发新材料：使用天然抗病毒材料（例如铜和各种铜衍生物）或将抗病毒原料加入产品中

无孔材料

01 ISO 21702的概述

ISO 21702标准是用来评价塑料和其他无孔材料的抗病毒特性的检测方法。将特定浓度的病毒负载到待测试样本表面和对照样本表面上，将其置于恒温恒湿箱中作用24 h，然后用含中和剂的液体培养基洗脱样品来回收存活的病毒，并测定从这些样品中回收的具有感染性的病毒的数量，通过与对照样本比较来确定待测试样本是否具有抗病毒性。这一切虽然听起来十分简单，但是让我们更深入地了解一下实验过程，就会发现除了基本的抗病毒测试之外，ISO 21702标准的测试中还精心设置了许多组对照试验和验证试验有效性的评价方法，以确保测试结果是可靠的、可重复的和有意义的。下面我们将对这些试验细节进行介绍，以及告诉大家如何计算测试样本的抗病毒活性。

02 测试是如何进行的？

当测试一个材料表面的抗病毒活性时，本试验应保证每种相同处理的测试材料有3个重复样品，目的是减少差异性，增加试验的可靠性，完整试验至少需要12个对照样本和9个待测试样本。我们通常将样品制备成5 × 5 cm的正方形，将一定量的病毒液滴加到每一块待测样本和对照样本上，并用40 mm × 40 mm的膜轻轻覆盖住测试液，在(25 ± 1) °C，90%

RH条件下培养到指定时间（长可达24小时）后，用含中和剂的液体培养基洗脱并回收存活的病毒。

接下来，我们将测定待测样本和对照样本的病毒存活情况，我们通过观察宿主细胞被病毒侵染后的病变情况来确定病毒滴度。将洗脱回收的病毒接种到96孔板的细胞上，并进行10倍梯度稀释，且每个稀释梯度不少于4个复孔。将96孔板放入37℃、5% CO₂培养箱中孵育培养3~7天记录细胞病变的情况，计算测试表面的抗病毒率。

03 计算抗病毒活性

ISO 21702标准测定的是待测试样本相对于对照样本上病毒的减少量，这种减少量被称为R值，是比较对照样本和测试样本中回收的病毒量之间的差异，都以10为底的对数值表示。若R > 1，则认为测试样本具有一定的抗病毒活性。R=1相当于测试样本中具有感染性的病毒相对于对照样本减少了90%，R=2为减少了99%，R = 3为减少了99.9%，依此类推。

值得一提的是，R值是一个相对测量值（相对于对照样品），因为随着时间的推移，病毒在任何物体表面上都会产生自然衰亡而导致其活性降低。因此，我们所得到的待测样本的病毒减少量包含了自然衰减导致的“额外”的病毒失活效果。病毒活性的相对减少而不是减少也有一些其他原因，如：实验室条件可能每天都会有差异，使用的病毒也可能存在批次的差异等。

抗病毒活性

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

R为抗病毒对数值；

U₀为未处理3个样本0时刻回收的平均病毒滴度对数值；

U_t为未处理3个样本24 h回收的平均病毒滴度对数值；

A_t为经过处理3个样本24 h回收的平均病毒滴度对数值。

注：1）未处理试样接种后立刻回收的滴度应在 1.8×10^5 TCID₅₀/cm²~ 8.5×10^5 TCID₅₀/cm²范围内；

2）每个未处理样品接触24 h后回收的病毒滴度数不应少于 4.3×10^2 TCID₅₀/cm²。

04 中和剂筛选及细胞毒性试验

正如前面所述，ISO 21702标准测试依赖于培养的宿主细胞来验证病毒是否具有感染性。简单的方法就是，我们通过在宿主细胞上接种回收的病毒来测定回收的感染性病毒的数量，通过观察宿主细胞发生细胞病变（CPE）情况，来确定病毒数量的多少。因此，我们必须确定只能是由病毒引起宿主细胞的死亡。假设将待测试样本有细胞毒的浸提液加入细胞培养板中，随后杀死宿主细胞。如果没有采取适当的措施，我们可能会错误地得出测试材料不能抗病毒的结论：“宿主细胞死亡，所以一定有很多存活的病毒”。

此时细胞毒性试验便有了用武之地。在该试验中，我们将液体培养基加入到待测样本上，作用5 min后回收培养基，并将其接种到宿主细胞中。因为未接种病毒，所以如果宿主细胞死亡，我们就知道测试材料肯定存在细胞毒性，这样的结果会使整个测试无效。因此，我们需要进行中和剂的筛选，确认所选的中和剂对宿主细胞无毒性，并能有效中和测试样品中的有害物质。我们还应该注意，该测试仅评估在特定实验室条件下洗脱回收的培养基的细胞毒性，旨在支持抗病毒测试的结论，这并不是评估真实环境中测试材料的细胞毒性。

05 病毒对宿主细胞的敏感性试验

ISO 21702 测试可能受到的另一个影响因素是测试材料是否会干扰宿主细胞对病毒的敏感性。假设测试材料向培养基中释放了某种物质，使细胞对病毒产生了抵抗力，即使病毒具有活性，细胞也会存活，研究人员可能会错误地得出这种材料是具有抗病毒的结论：“宿主细胞存活，因此病毒一定已被杀死”。如果该材料以某种方式使宿主细胞对病毒特别敏感，那也是有问题。而敏感性试验可以防止这些情况发生。

在此实验中，我们将（含中和剂）液体培养基添加到待测样本表面和对照样本表面，等待5 min后回收培养基，然后将病毒液加入到回收的培养基中混匀并静置30 min。我们还需将病毒加入到相同体积的（含中和剂）培养基中作为阴性对照，然后将上述含病毒的培养基接种到宿主细胞上。要注意的是，这里的病毒从未与测试材料接触过，因此我们预测会有能侵染宿主细胞的具有感染性的病毒。如果被杀死的宿主细胞比阴性对照要少得多或多得多，则该测试可能无效。简而言之，如果待测试样本和对照样本表面某些物质溶解到培养基中，影响了正常的宿主细胞-病毒相互作用，我们就无法测试该材料是否会使病毒失活。这种情况下则需要对中和剂进行调整，如果中和剂进行调整了，则整个测试过程都需要进行调整。

将阴性对照、中和剂作用后处理和未处理样品的病毒滴度进行比较，其对数值应满足以下要求：

$$| \text{Sn-Su} | \leq 0.5$$

$$| \text{Sn-St} | \leq 0.5$$

Sn阴性对照滴度对数值，TCID₅₀/ml

Su未经处理的样本感染滴度对数值，TCID₅₀/ml

St经过处理的样本感染滴度对数值，TCID₅₀/ml

如果满足上述值，则可以进行下一步试验。如果上述值 > 0.5，这需要对中和剂进行调整。

06 零时刻的病毒回收

病毒滴加到对照表面后立即加入培养基进行洗脱回收（零时刻），然后用回收的病毒液来计算实验中病毒的初始量。如果病毒太少，这可能表明该病毒存在问题。这个试验还可以得知从实验过程中回收的大病毒量，可以用来评估经过了特定时间后对照表面中的病毒感染性是否有所降低。

07 额外的参考试验

所有上述这些试验对于确保正确解释抗病毒测试的结果以及验证有效测试的条件都具有重要意义。除了上述的ISO 21702中对照试验之外，我们还设置了参考试验包括一个阳性对照材料和一个阴性对照材料。阳性对照为经过验证的具有抗病毒特性的材料，阴性对照是惰性塑料或玻璃，即没有抗病毒特性的材料。参考试验中阴性对照组几乎没有病毒被灭活，阳性对照组则可以确保试验准确进行，并且可以说明测试条件满足材料抗病毒特性的评价。此外，它还可以比较我们的试验条件随时间的变化，以及不同实验人员之间造成的误差。

就像任何科学实验一样，对照实验的数量往往会超过测试条件的试验数量！对照试验对于理解和解释整个测试以及了解实验过程中哪里可能出错至关重要。

