



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

医用口罩及材料病毒过滤效率测试方法 Phi-X174 噬菌体气溶胶法

Test method for the viral filtration efficiency (VFE) of medical masks and materials
using bacteriophage Phi-X174 aerosol

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2024/08/12)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 2

5 试验条件 2

6 样品数量和预处理条件 2

7 噬菌体增殖 2

 7.1 噬菌体和宿主菌 2

 7.2 培养基 2

 7.3 噬菌体增殖 3

8 病毒过滤效率检测方法 4

 8.1 气溶胶发生器 4

 8.2 生物气溶胶采样器 4

 8.3 样品支撑 5

 8.4 病毒过滤效率检测系统 5

 8.5 病毒过滤效率检测方法 6

9 结果报告 8

参 考 文 献 9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用防护器械标准化工作组（SAC/SWG 30）归口。

本文件起草单位：XXXX

本文件主要起草人：XXXX

医用口罩及材料病毒过滤效率测试方法 Phi-X174 噬菌体气溶胶法

1 范围

本文件规定了利用噬菌体Phi-X174作为模式微生物,对医用口罩及材料进行病毒气溶胶过滤效率测试的方法。

本文件适用于有病毒过滤效率评价需求的医用口罩及材料。其它产品或材料的病毒过滤效率测试可参考本文件。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

噬菌体 bacteriophage

感染细菌的一种病毒。

注:本文件中噬菌体即指Phi-X174。

3.2

裂解 lysis

由于噬菌体增殖导致的宿主细菌被溶解破坏的过程。

注:本方法中,大肠杆菌作为宿主细胞因Phi-X174感染而引起裂解。

3.3

噬菌斑 plaque

理论上由单个噬菌体感染裂解宿主细胞导致在平板上层琼脂上形成的肉眼可见透亮区域。

3.4

噬菌斑形成单位 plaque-forming unit; PFU

能够感染裂解平板上层琼脂生长的细菌,产生噬菌斑的病毒粒子。

3.5

滴度 titre

活性噬菌体浓度,用每毫升噬菌斑形成单位表示(PFU/ml)。

3.6

病毒过滤效率 viral filtration efficiency; VFE

在规定检测条件下，测试样品滤除空气中病毒颗粒的百分比。

4 原理

噬菌体气溶胶与病毒气溶胶具有相似的空气生物学特性，本文件使用噬菌体作为替代微生物进行病毒气溶胶过滤效率的评价。在规定检测流量下，使一定浓度的噬菌体气溶胶颗粒，通过待测样品，分别检测通过样品前和通过样品后的噬菌体气溶胶颗粒浓度，计算该样品对噬菌体气溶胶颗粒的过滤效率作为病毒过滤效率。

5 试验条件

除特别要求外，检测应在温度为16℃～32℃，相对湿度为（50±30）%的环境中进行。

6 样品数量和预处理条件

在温度为（21±5）℃、相对湿度为（85±5）%的环境中放置至少4 h，或者按照其它文件中的要求进行样品预处理。

7 噬菌体增殖

7.1 噬菌体和宿主菌

7.1.1 噬菌体：Phi-X174，ATCC 13706-B1 或 CICC 80006。

7.1.2 宿主菌：大肠杆菌，ATCC 13706 或 CICC 25123。

7.2 培养基

7.2.1 噬菌体营养肉汤

胰蛋白胨	8 g
氯化钾	5 g
氯化钙	0.2 g
加纯水至	1000 mL
最终pH值为7.3±0.2（25℃）	

7.2.2 下层琼脂

琼脂	15 g
营养肉汤	8 g
氯化钾	5 g
加纯水至	1000 mL
氯化钙	1 mL（1 mol/L，灭菌后加入）
最终pH值为7.3±0.2（25℃）	

7.2.3 上层琼脂

琼脂	7 g
营养肉汤	8 g
氯化钾	5 g
加纯水至	1000 mL
氯化钙	1 mL (1 mol/L, 灭菌后加入)
最终pH值为7.3±0.2 (25℃)	

7.2.4 1%蛋白胨水

配方/1000 mL	
蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
加纯水至	1000 mL
最终pH值为7.3±0.2 (25℃)	

7.3 噬菌体增殖

7.3.1 噬菌体悬液的制备

按照YY/T 0689-2008中规定的方法或者以下步骤，制备噬菌体悬液。

- 用接种环将大肠杆菌(7.1.2)接种于噬菌体营养肉汤培养基(7.2.1)中，在温度为(36±1)℃、转速为(225±25) r/min 条件下过夜培养。
- 准备直径为 150 mm 的无菌平皿，倒入下层琼脂培养基(7.2.2)，使培养基凝固。
- 挑取单个噬菌斑，放入 1 mL 噬菌体营养肉汤中，震荡使噬菌体悬浮，4℃ 9000×g 离心 10 min，将上清液吸出至另一容器中。
- 准备一支无菌试管，向试管中加入 0.5 mL~1 mL 宿主大肠杆菌培养物(步骤 a)，然后将步骤 c) 得到的噬菌体上清液全部加入试管中(或者直接加入适当体积的含量约为 10⁴ PFU 的噬菌体悬液)。将噬菌体与宿主菌充分混匀后再加入 10~15 mL 温度为(45±2)℃的上层琼脂培养基(7.2.3)，并迅速倒入准备好的下层琼脂培养基上。
- 将双层平板置于(36±1)℃条件下培养，直至产生肉眼清晰可见的噬菌斑，并呈现混合裂解，通常至少需要 6 h。
- 将上层琼脂培养基刮下置于离心管中，加入 10~15 mL 噬菌体营养肉汤，充分振荡后在 4℃ 9000×g 下离心 30 min，收集上清液至另一容器中。

注：也可向上层琼脂培养基加入10~15 mL噬菌体营养肉汤，4℃孵育至少4 h，间或摇晃。将上层孵育液吸取至离心管中，在4℃ 9000×g下离心30 min，收集上清液至另一容器中。

- 将含有噬菌体的上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后，按照 7.3.2 的方法检测噬菌体浓度，4℃ 保存待用。

7.3.2 噬菌体浓度的测定

将噬菌体悬液进行1: 10梯度稀释，按照以下步骤进行噬菌体浓度的测定。

- 吸取 100 μL~500 μL 的噬菌体稀释液至灭菌试管中，加入约 200 μL 培养至对数期的大肠杆菌培养物，摇晃混匀。
- 取融化的(45±2)℃上层琼脂培养基约 5 mL，倒入上述混合物中，混匀后迅速倒入含有下层琼脂培养基的平板上(直径 90 mm)。

- c) 待上层琼脂凝固后，将平板置于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下培养，直至产生肉眼清晰可见的噬菌斑，通常至少需要 6 h。
- d) 若进行了梯度稀释，则应对噬菌斑数在 30 PFU~300 PFU 范围内的平板进行计数。每个稀释梯度至少制备 2 个平板。

8 病毒过滤效率检测方法

8.1 气溶胶发生器

气溶胶发生器用于测试时产生病毒气溶胶。气溶胶发生器可通过恒定速率进液方式补充喷雾液，也可选择具备储液瓶的发生器，如Collision发生器。发生器产生的气溶胶颗粒空气动力学中值直径约为 $1\ \mu\text{m} \sim 2\ \mu\text{m}$ ，几何标准偏离小于2.0。

气溶胶发生器应易清洗，所用材料能耐受干热、湿热等常用消毒灭菌方法。

8.2 生物气溶胶采样器

8.2.1 采样器类别

对于较高浓度的微生物气溶胶颗粒，根据采样原理不同，常用生物气溶胶采样器类别可分为液体冲击式采样器和滤膜采样器。

8.2.2 液体冲击式采样器

液体冲击式采样器可使用AGI-30或Biosampler采样器（见图1），两种采样器的推荐采样流量均为 $12.5\ \text{L/min}$ 。AGI-30采样器是被广泛使用的液体冲击式采样器。当装液量为20 mL时，采样管道出口口距离液面上缘约为10 mm。



标引序号说明：

1——AGI-30采样器；

2——Biosampler采样器。

图1 液体冲击式采样器

8.2.3 滤膜采样器

滤膜采样器包括基于聚碳酸酯、硝酸纤维素、明胶滤膜等材料的采样器。进行病毒过滤效率测试时，滤膜采样器采样流量按照制造商规定的流量进行设置。

8.3 样品支撑

可选择使用平面或拱形支撑网支撑医用口罩或材料。支撑网结构尺寸示意图见图2。

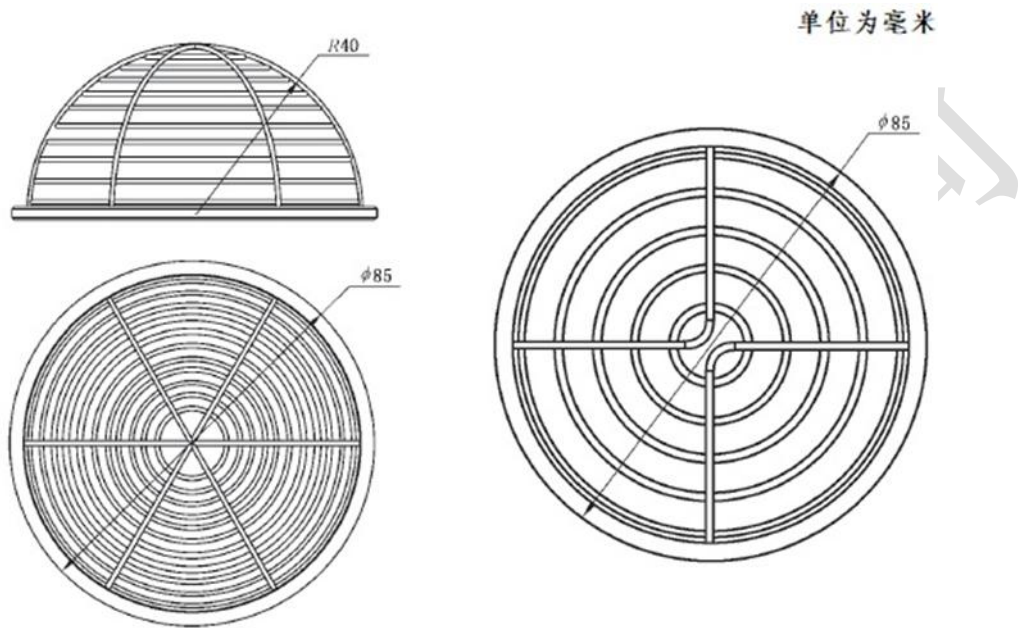


图2 拱形、平皿支撑网

8.4 病毒过滤效率检测系统

8.4.1 基本要求

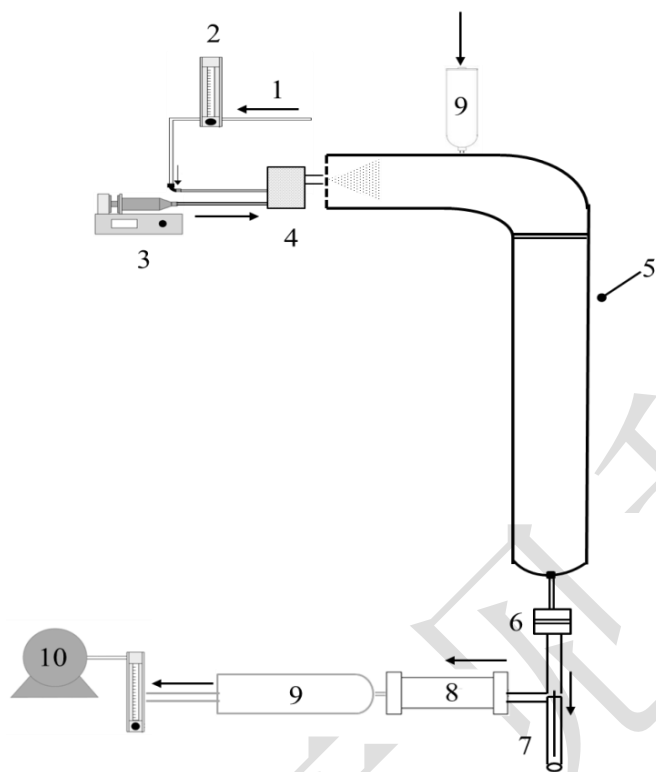
过滤效率检测系统的设计应能避免试验过程中潜在的气溶胶泄漏污染环境，每次试验结束后气雾室内的空气能得到充分净化。

采样流量应可调节，当选用液体冲击式采样器或滤膜采样器时，能调节并稳定在与采样器相对应的采样流量。

试验进行时，气雾室内应保持微负压状态。

8.4.2 系统组成

过滤效率检测系统应至少由清洁气源、气溶胶发生器、气雾室、采样器、样品夹具、流量计、排气过滤装置和真空泵组成。过滤效率检测系统示意图见图3。



- 标引序号说明：
- | | |
|------------|---------------|
| 1——无菌干燥气流； | 6——样品夹具； |
| 2——流量计； | 7——AGI-30采样器； |
| 3——进液； | 8——分水滤气器； |
| 4——气溶胶发生器； | 9——高效过滤器； |
| 5——气雾室； | 10——真空泵。 |

图3 病毒过滤效率检测系统示意图

8.5 病毒过滤效率检测方法

8.5.1 喷雾液

喷雾介质可采用1%蛋白胨水，也可采用磷酸盐缓冲液、生理盐水等介质。

吸取一定浓度体积的噬菌体悬浮液至喷雾介质中，作为喷雾液。喷雾液浓度一般约为 1.0×10^8 PFU/mL，但应以能保证阳性对照的噬菌体数目至少为 10^6 PFU为宜。

8.5.2 采样液

使用液体冲击式采样器时，装液量应为20 mL。采样液可选择磷酸盐缓冲液、生理盐水、噬菌体营养肉汤等溶液。可在采样液中添加0.01%（体积分数）消泡剂，如橄榄油，降低采样时的起泡作用。

8.5.3 单路采集过滤效率检测方法

8.5.3.1 过滤效率检测方法

按照以下步骤进行试验。

- a) 将样品安装在夹具内。口罩样品使口罩正常佩戴方向的外侧朝向气溶胶来向，无明确方向要求的可任选一面朝向气溶胶来向。
- b) 连接好气溶胶发生器、采样器等管路，确保连接紧密。
- c) 将气溶胶发生时间设定为 1 min，采样时间为 2 min，气溶胶发生与采样过程应同步启动。
- d) 按照阳性对照—样品—阳性对照—阴性对照的顺序开展试验，两次阳性对照之间至少检测 3 个样品。
- e) 阴性对照试验不产生气溶胶，不放置样品，直接采样 2 min。
- f) 按照 7.3.2 中的双层平板法检测所得试验液中的噬菌体浓度，噬菌体浓度与试验液体积的乘积即为采集到的噬菌体数目。

阴性对照应无噬菌体检出，否则试验无效，应重新进行试验。

所有样品和对照试验均应使用基于相同原理的同一种采样器，如仅使用 AGI-30 采样器。

采用液体冲击式采样器时，冲击采样过程中的起泡作用会造成采样液的部分流失，在采样结束后应选择精度为 0.1mL 的量筒或量杯对残留采样液体积进行测量。

采用滤膜采样器时，试验结束后按照制造商规定的方法将采集到的噬菌体洗下。通常可将滤膜剪碎后置于缓冲液中，充分旋涡振荡，必要时可进一步离心去除杂质，将上清液吸出作为试验液。明胶滤膜可直接置于缓冲液中，振荡溶解后获得试验液。

8.5.3.2 结果计算

按照以下公式进行每个样品病毒过滤效率的计算：

$$VFE = \frac{(\bar{c} - T)}{\bar{c}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

VFE——病毒过滤效率；

$\bar{c}$ ——两个阳性对照平均值，单位 PFU；

T——样品组噬菌体数目，单位 PFU。

8.5.4 双路采集过滤效率检测方法

8.5.4.1 过滤效率检测方法

采用双路采集方法进行试验时，应在一路放置样品，另一路不放置样品作为阳性对照组，两路使用相同采样器同时进行病毒气溶胶颗粒采集。

按照以下步骤进行试验。

- a) 将样品安装在夹具内。口罩样品使口罩正常佩戴方向的外侧朝向气溶胶来向，无明确方向要求的可任选一面朝向气溶胶来向。
- b) 连接好气溶胶发生器、采样器等管路，确保连接紧密。
- c) 将气溶胶发生时间设定为 1 min，采样时间为 2 min，气溶胶发生与采样过程应同步启动。
- d) 按以上步骤重复至少三次试验。
- e) 进行阴性对照试验。阴性对照试验不产生气溶胶，不放置样品，直接采样 2 min。
- f) 按照 7.3.2 中的双层平板法检测所得试验液中的噬菌体浓度，噬菌体浓度与试验液体积的乘积即为采集到的噬菌体数目。

阴性对照应无噬菌体检出，否则试验无效，应重新进行试验。

所有样品和对照试验均应使用基于相同原理的同一种采样器，如仅使用 AGI-30 采样器。

液体冲击式采样器和滤膜采样器所得试验液注意事项同8.5.3.1。

8.5.4.2 结果计算

按照以下公式进行每个样品病毒过滤效率的计算。

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

式中：

VFE——病毒过滤效率；

C——阳性对照组噬菌体数目，单位PFU；

T——样品组噬菌体数目，单位PFU。

9 结果报告

结果报告应至少包括以下内容：

- a) 引用本标准的说明；
- b) 样品预处理条件；
- c) 检测样品数量；
- d) 样品名称、规格型号；
- e) 样品制造商名称；
- f) 试验环境温湿度条件；
- g) 试验用菌种名称、编号；
- h) 采样器名称；
- i) 采样流量；
- j) 每个样品和阳性对照的检测结果；
- k) 任何偏离本标准的情况。

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
 - [3] ASTM F2101-19 Standard Test Method for Evaluating the Bacterial Filtration Efficiency (BFE) of Medical Face Mask Materials, Using a Biological Aerosol of *Staphylococcus aureus*
 - [4] EN 14683:2019 Medical face Masks-Requirements and test methods
 - [5] Tseng CC, Li CS. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols [J]. *Journal of Aerosol Science*, 2005, 36(5): 593-607.
 - [6] Haig CW, Mackay WG, Walker JT, Williams C. Bioaerosol sampling: sampling mechanisms, bioefficiency and field studies [J]. *Journal of Hospital infection*, 2016, 93(3):242-255.
-