臺灣區不織布工業同業公會（函）

台北市大同區 10352 南京西路 30 號 5 樓
聯絡人/電話:黃稚評/02-25580516(代表號)
傳　真　：02－25527330
E-mail:tnfiaroc@ms24.hinet.net
http://www.nonwoven.org.tw

受文者：台灣醫療暨生技器材工業同業公會

台灣醫療暨生技器材工業同業公會
收 107. 10. 11 文
檔號： 107671

發文日期:中華民國107年10月08日
發文字號: 不織布公會一〇七中字第032號
速件:最速件
密等及解密條件或保密期限:普通
附件:如文

主　旨：檢送本會召開『制定抗病毒紡織品產業標準與標準化推動』委員會議之開會通知單如附，敬請準時與會。

說　明：

一、為順利制定抗病毒紡織品產業標準草案，擬召開『抗病毒紡織品產業標準委員會』第六次會議。

二、開會時間、地點如下：

時間：107 年 10 月 18 日(星期四) 下午 2 點~4 點

內容： 紡織品抗病毒產業標準草案綜合討論與意見交流

地點：紡織所大智館 7 樓 A713 會議室

地址：新北市土城區承天路 6 號(捷運永寧站)

三、標準草案如以下連結

http://www.nonwoven.org.tw/index.php?MK=25&SK=6254。

正本：林錫鐘委員、陳勇志委員、吳繼仁委員、林佳弘委員、林尚明委員、陳進來委員、葛斯柏委員、鄭永柱委員、張麗玫委員、江國慶委員、劉錦誠委員 楊睿閔委員、蔡宗霖委員、高志豪委員、紡織所林紀宏副主任、紡織所胡明銓組長、經濟部標準檢驗局、衛生福利部食品藥物管理署、衛生福利部疾病管制署、財團法人食品工業發展研究所、財團法人中華民國紡織業拓展會、台灣產業用紡織品協會、長庚大學、財團法人農業科技研究院、台灣醫療暨生技器材工業同業公會

列席：全體會員廠及相關廠商

理事長 陳世中

§臺灣區不織布工業同業公會開會通知單§

<table>
<tr><td>速　　別</td><td>最速件</td><td rowspan="3">發文</td><td>日期</td><td>中華民國一〇七年十月八日</td></tr>
<tr><td>受　文　者</td><td>各委員、正本受文單位及全體會員廠</td><td>字號</td><td>不織布公會(一〇七)中字第 032 號</td></tr>
<tr><td>副本收文者</td><td>如文</td><td>副件</td><td></td></tr>
<tr><td>開會事由</td><td colspan="4">『制定抗病毒紡織品產業標準』委員會-第六次會議</td></tr>
<tr><td>開會時間</td><td colspan="4">一〇七年十月十八(星期四)下午 14:00~16:00</td></tr>
<tr><td>開會地點</td><td colspan="4">地點：紡織所大智館 7 樓 A713 會議室
地址：新北市土城區承天路 6 號(捷運永寧站)</td></tr>
<tr><td>主　持　人</td><td>陳世中理事長
林錫鐘委員</td><td>連絡人</td><td>黃稚評
0917621588</td><td>電話</td><td>02-25580516</td></tr>
<tr><td>出列席單位及人員</td><td colspan="5">出席：林錫鐘委員、陳勇志委員、吳繼仁委員、林佳弘委員、林尚明委員、陳進來委員、葛斯柏委員、鄭永柱委員、張麗玫委員、江國慶委員、劉錦誠委員、楊睿閎委員、蔡宗霖委員、高志豪委員、紡織所林紀宏副主任、紡織所胡明銓組長、經濟部標準檢驗局、衛生福利部食品藥物管理署、衛生福利部疾病管制署、財團法人食品工業發展研究所、紡織業外銷拓展會、台灣產業用紡織品協會、長庚大學、農業科技研究院、台灣醫療暨生技器材工業同業公會
列席：　全體會員廠及相關廠商</td></tr>
<tr><td>備　　註</td><td colspan="5">● 紡織品抗病毒產業標準草案綜合討論與意見交流
註：為響應環保節能減碳、本標準與相關會議參考資料請上網下載 http://www.nonwoven.org.tw/index.php?MK=25&SK=6254，如有需要電郵煩請來電告知。</td></tr>
<tr><td>發文單位</td><td colspan="5">臺灣區不織布工業同業公會</td></tr>
</table>

理事長　陳世中

TO：不織布公會　　FAX：02-25527330

『抗病毒紡織品產業標準委員會』第六次會議

(10/18 PM14:00~16:00)出席回條

公司名稱：_____

姓　　名：_____　職　稱：_____

電　　話：_____　行　動：_____

□親自出席，□不克出席

填寫人：_____日期：_____

*◎回復與提案請於 **107** 年 **10** 月 **12** 日(五) 前 **E-MAIL***

***tnfiaroc@ms24.hinet.net** 回覆公會，謝謝合作!*

提案單

紡織品產業標準

紡織品抗病毒性能測定

Textiles — Determination of antiviral activity of textile products

中華民國　　年　　月　　日制定公布
Date of Promulgation:　-　-

目錄

節次　　頁次

(共頁)

前言

本產業標準為臺灣區不織布工業同業公會起草，為未來能成為國家標準做準備，故以 CNS 格式制定。

本產業標準採自願性方式實施，但經各該目的事業主管機關引用全部或部分內容為法規者，從其規定。

本產業標準並未建議所有安全事項，使用本標準前應適當建立相關維護安全與健康作業，並且遵守相關法規之規定。

本產業標準之部分內容，可能涉及專利權、商標權與著作權，主管機關及標準專責機關不負責任何或所有此類專利權、商標權與著作權之鑑別。

1. 適用範圍

本標準規定測定紡織品抗病毒性能的檢測方法。紡織品包括梭織物、針織物、不織布(非織物)、纖維、紗線和織帶等。

本標準中使用的病毒如下：

– 有套膜的病毒：流感病毒，為人體的呼吸道感染性病毒;

– 無套膜病毒：貓科杯狀病毒，為諾羅病毒的替代物之一，是重要的腸道病原體。

2. 引用標準

下列標準因本標準引用,成為本標準之一部分。下列引用標準適用最新版(包括補充增修)。

CNS 3841，染色堅牢度試驗用附布

CNS 3699，化學分析用水

CNS 15140，紡織品試驗之家庭洗滌及乾燥程序

3. 用語和定義

3.1 病毒

非細胞形態由蛋白質殼包裹基因材料組成，可在特定宿主細胞蛋白質中進行自我複製。

3.2 病毒活性

在特定宿主細胞中自我複製的能力。

3.3 抗病毒性

使病毒表面蛋白質形態改變或結構損傷的性質。

備考 1：受損的病毒失去與宿主細胞受體的結合性而減低病毒活性。取決於分子的類型，可能是核酸的改變。此外有套膜的病毒可能是套膜的改變

備考 2：抗原反應的改變或組成元素的改變不一定表示病毒感染力的降低。

3.4 抗病毒劑

能夠降低病毒活性的無機或有機化學物質

備考：有機抗病毒劑藉由化學吸附性改變病毒的表面蛋白質。無機金屬抗病毒劑利用自由基

反應產生的羥基自由基提取病毒蛋白質中的氫原子，破壞或改變病毒的形態。

3.5 對照試樣

用於驗證測試病毒在織物上穩定性的布。

備考 1：依 CNS 3841 規定 100%棉布，不經任何化學加工如螢光漂白劑等。

備考 2：抗病毒加工前的織物可作為對照試樣使用，條件在 3.5 中描述。

3.6 對照試驗

測試以確認樣品不影響宿主細胞。

備考：此測試與實際測試條件相同，但沒有使用病毒。

3.7 由病毒引起的細胞病變效應（CPE）[cytopathic effect (CPE) caused by virus]

病毒增殖引起宿主細胞的形態改變或破壞。

3.8 病毒感染效價(infectivity titre of virus)

在細胞裂解物或溶液中每單位體積存在的感染性病毒數量。

3.9 空斑(plaque)

由於單一感染性病毒的感染和繁殖，在半固體培養基中單層細胞裂解的區域。

3.10 空斑形成單位 PFU (plaque forming units)

每單位體積感染病毒濃度（mL）表示單位。

3.11 空斑試驗(plaque assay)

以系列稀釋結果 PFU 來測定病毒的感染效價。

3.12 $TCID_{50}$ 方法(Median tissue culture infectious dose)

誘發洗出病毒懸浮液或其稀釋液之細胞培養單位發生 50%細胞病變的感染劑量。

4. 原理

將病毒接種到抗病毒加工試樣與未加工試樣(或對照試樣)，經過特定的接觸時間後，計算兩者病毒數的對數差。感染性病毒效價的測量方法有空斑試驗（3.11）和 $TCID_{50}$ 方法（3.12）。使用何種測量方法取決於測試機構的經驗和便利性。

5. 病毒和宿主細胞

使用的病毒應為附錄 A 中規定的流感病毒和貓杯狀病毒。另外，附錄 A 定義了用於對應病毒的宿主細胞。依據紡織品的最終用途可選擇測試一種或兩種病毒。

6. 安全警告

本標準使用對健康和環境有害的傳染性病毒和化學物質。本標準僅規定了一種技術上合理的方法，不表示這些標準的使用者在測試的任何階段都可以免除對健康和環境的法律義務。警告如下所示。本標準中使用的病毒屬於世界衛生組織（WHO）實驗室生物安全指南中的生物安全等級 2。測試人員應該有足夠的生物技術知識和經驗。此外，測試人員應嚴格遵守製造商的安全標準和國內規定。

備考：生物危險等級及必要設備可參考衛生福利部疾病管制署公布之"感染性生物材料管理作業要點"

7. 儀器

7.1 高壓滅菌釜(簡稱滅菌釜)：可維持溫度於（121±2）°C 及壓力（103±5）kPa。

7.2 乾熱滅菌器：烘箱，可維持溫度於（180±2）°C 與（160±2）°C。

7.3 量瓶：容量 1 L。

7.4 天平：可量測範圍為（100±0.1）g 至（0.01±0.0001）g。

7.5 玻璃移液管：（50±0.5）mL、（25±0.25）mL、（10±0.1）mL 與（5±0.05）mL。

7.6 塑膠移液管：（50±0.5）mL、（25±0.25）mL、（10±0.1）mL 與（5±0.05）mL。

7.7 移液器：能夠安裝玻璃或塑膠移液管者。

7.8 微量吸管：可以每次準確吸取體積至誤差 0.5%以內。

7.9 水浴槽：可維持（37±2）°C，（50±2）°C 或（56±2）°C 的溫度。

7.10 振盪混合器：適用於微生物檢測。

7.11 冷凍櫃：可維持溫度於–（80±2）°C 或–（20±2）°C。

7.12 液氮浴：可維持溫度於約–196°C。

7.13 過濾膜：孔徑為 0.22 μm。

7.14 冰箱：可維持溫度於（2±2）°C 至（8±2）°C。

7.15 pH 計：具玻璃電極檢測器。

7.16 倒立顯微鏡：適用於細胞培養觀察。

7.17 鑷子：可滅菌。

7.18 離心機：可維持溫度於（4±2）°C，相對離心力約 1000 g。

7.19 生物安全櫃：class Ⅱ。

7.20 樣品瓶：容量為 30 mL，具螺旋蓋。墊圈由全氟乙烯或矽樹脂製成，蓋子由聚丙烯製成。

7.21 96 孔微孔盤：γ 輻射滅菌。$TCID_{50}$ 方法使用。

7.22 6 孔培養盤：γ 輻射滅菌，空斑測定使用。

7.23 細胞培養瓶：γ 射線滅菌，貼壁型，細胞培養面積為 75 cm^2，具透氣蓋與密封蓋。透氣蓋具 0.2 μm 濾膜。

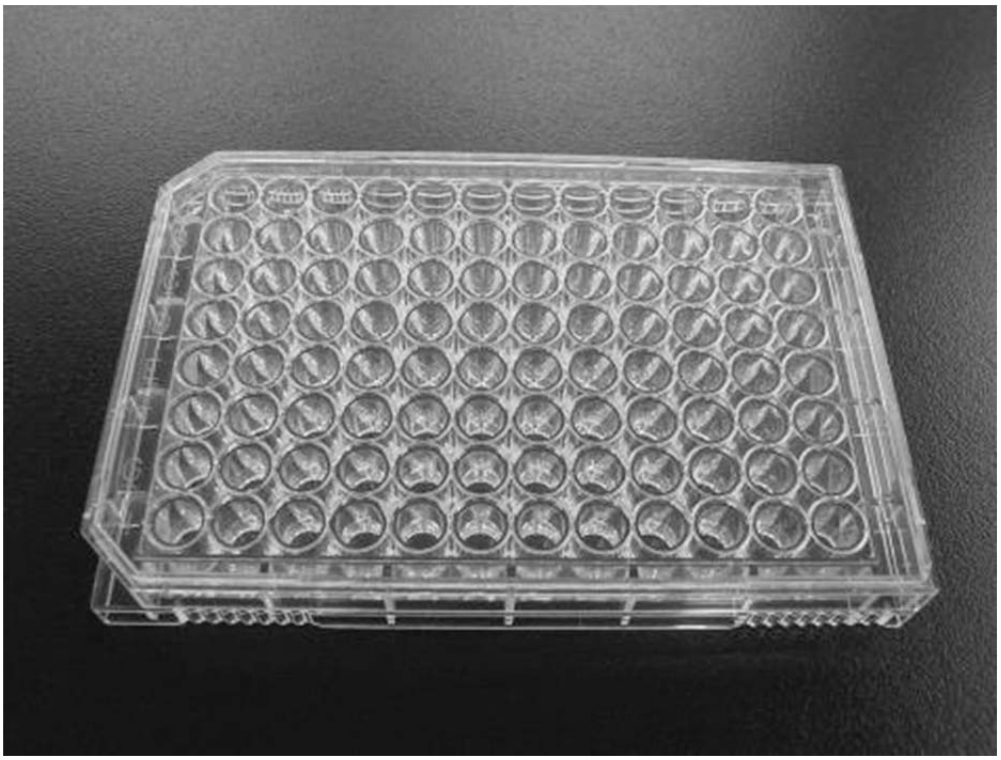


圖 1 – 96 孔微孔盤(TCID$_{50}$ 方法使用)

圖 2–6 孔培養盤(空斑測定使用)

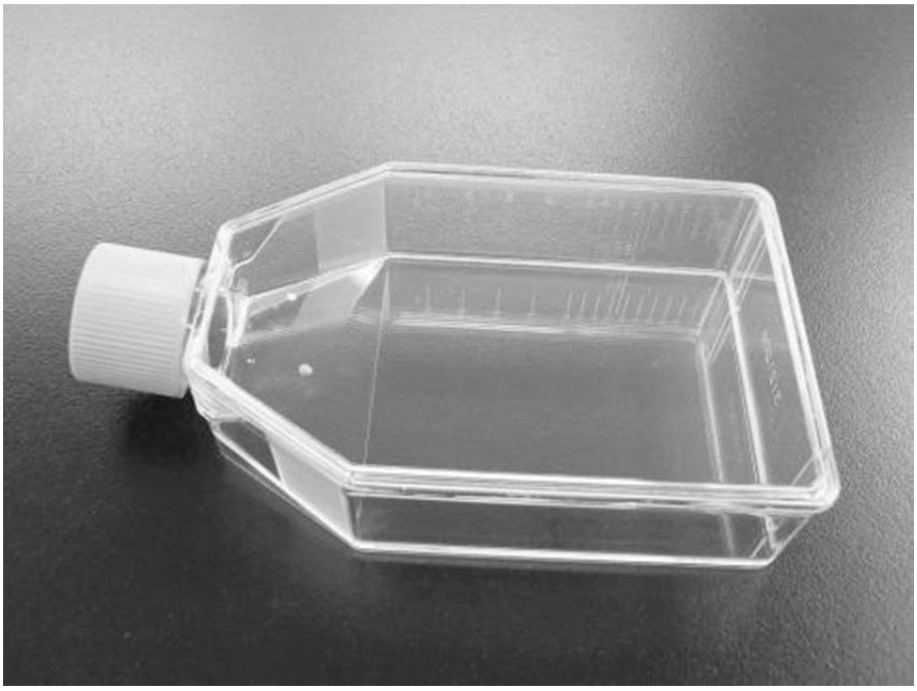


圖 3 –細胞培養瓶(細胞培養使用)

7.24 二氧化碳(CO_2)培養箱：可維持溫度於（34±2）°C 和（37±2）°C 並含 5%二氧化碳。

7.25 培養箱：可維持溫度於（25±2）°C、（34±2）°C 或（37±2）°C。

7.26 離心管。

7.27 培養基容器。

7.28 試管。

7.29 燒杯。

8. 設備的滅菌

在此試驗法實施前後，所有可能接觸細胞、藥劑或測試樣品的設備及物品，都應以滅菌釜或乾熱方式滅菌。

– 高壓蒸汽滅菌：使用滅菌釜（7.1）以 121°C、103 kPa 滅菌至少 15 min。

– 乾熱滅菌：使用乾熱滅菌器（7.2）在 180°C 滅菌至少 30 min 或 160°C 滅菌至少 2 h。

9. 試藥和培養基

所使用之試藥須符合**病毒學品質**要求。培養基有市售產品。

9.1 水，A3 分析用水依 CNS 3699 之規定。

9.2 Eagle 最低必需培養基[Eagle's minimum essential medium（EMEM）]，有市售品。

成分如附錄 D 所述。若有任何缺少的成分，請依表中要求添加。

9.3 7.5%碳酸氫鈉溶液(7.5 % sodium bicarbonate solution)。

9.3.1 秤取 75 g 碳酸氫鈉置於密閉培養容器中，以滅菌釜滅菌。

9.3.2 A3 分析用水也以滅菌釜滅菌。

9.3.3 將碳酸氫鈉溶於 1000 mL 的無菌水中。

9.4 福馬林溶液。

9.4.1 用於細胞固定。

9.4.2 製備 37%甲醛溶液 100 mL。

9.4.3 加入 900 mL A3 分析用水至 9.4.2。

9.5 亞甲基藍溶液，用於細胞染色。

9.5.1 將下列物質放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，1000 mL;

– 亞甲基藍，0.375 g;

– 1N 氫氧化鈉溶液 62.5 µL。

9.5.2 溶解並混合均勻。

9.6 去補體活性胎牛血清：Inactivated FBS。

9.6.1 將冷凍保存的胎牛血清置於 37°C 水浴槽（7.9）中解凍。

9.6.2 然後，放入 56°C 水浴槽中 30 min 使其去活性。

9.6.3 分裝成數管。放入低於–20°C 的冷凍櫃（7.11）保存。

9.6.4 使用前，將其放入 37°C 水浴槽中解凍。

9.7 生長培養基，用於細胞培養。

9.7.1 將下列物質放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，800 mL;

–卡那黴素硫酸鹽(Kanamycin sulfate)，60 mg;

– Eagle 最低必需培養基（EMEM），9.53 g，或 RPMI 1640 培養基 10.4 g。

9.7.2 充分溶解後，加入 A3 分析用水至 1000 mL。

備考：RPMI:羅斯韋爾帕克紀念研究所。(RPMI stands for Roswell Park Memorial Institute.)

9.7.3 使用 0.22 µm 濾膜（7.13）過濾 9.7.2 混合溶液。

9.7.4 於 9.7.3 溶液中加入 15 mL 7.5%碳酸氫鈉溶液（9.3）及 100 mL 去補體活性胎牛血清（9.6）。

備考：若市售購買的 EMEM 不含 L–谷氨酰胺時，使用前參照附錄 C 組成比例添加。

9.8 維持培養基，用於細胞培養。

9.8.1 將下列物質放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，800 mL;

–卡那黴素硫酸鹽，60 mg;

– Eagle 最低必需培養基（EMEM），9.53 g。

9.8.2 充分溶解後，加入 A3 分析用水至 1000 mL。

9.8.3 使用 0.22 µm 濾膜（7.13）過濾 9.8.2 混合溶液。

9.8.4 在 9.8.3 溶液中加入 15 mL 7.5%碳酸氫鈉溶液（9.3）。

備考：若市售購買的 EMEM 不含 L–谷氨酰胺時，使用前參照附錄 C 組成比例添加。

9.9 雙倍濃縮維持培養基(Double concentration of the maintenance medium)(9.8)。

9.9.1 將下列物質放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，，800 mL;

–卡那黴素硫酸鹽，120 mg;

– Eagle 最低必需培養基（EMEM），19.06 g。

9.9.2 充分溶解後，加入 A3 分析用水至 1000 mL。

9.9.3 使用 0.22 μm 濾膜（7.13）過濾 9.9.2 混合溶液。

9.10 0.01 mol /L 磷酸緩衝生理食鹽水 PBS（–）。(Phosphate buffered saline)

9.10.1 將下列物質放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– 氯化鈉，8.0 g;

– 氯化鉀，0.2 g;

– 磷酸氫二鈉 12 水合物，2.9 g;

– 磷酸二氫鉀，0.2 g。

9.10.2 加入 A3 分析用水至 1000 mL，充分溶解。

9.10.3 以滅菌釜（7.1）於 121°C、103 kPa 滅菌至少 15 min。

9.11 牛胰腺胰蛋白酶(Trypsin derived from beef pancreas)和 PBS（–）溶液。

9.11.1 將下列材料放入燒杯中：

– 0.01mol / L 磷酸緩衝生理食鹽水 PBS（–）（9.10），100 mL;

– 牛胰腺胰蛋白酶，1.0 g。

9.11.2 以攪拌器混合 2 h。

9.11.3 使用 0.22 μm 濾膜過濾 9.11.2 溶液。

分裝溶液管若沒有立即使用應保存於–80°C。

9.11.4 將下列溶液放入試管中：

– 0.01 mol /L 磷酸緩衝生理食鹽水 PBS（–）（9.10），9 mL;

– 牛胰腺胰蛋白酶和 PBS（–）混合溶液(9.11.3)，1 mL。

9.11.5 溶解並混合均勻。

9.11.6 分裝成數管。保存於–20°C

9.11.7 使用前，將其置於 37°C 的水浴槽（7.9）中至解凍。

9.12 胰蛋白酶 EDTA 溶液。(Trypsin EDTA solution)

9.12.1 將下列材料放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– 0.01 mol /L 磷酸緩衝生理食鹽水 PBS（–）（9.10），1000 mL;

– 胰蛋白酶，2.5 g;

– 卡那黴素硫酸鹽，0.1 g;

– 硫酸鏈黴素(Streptomycin sulfate)，0.1 g;

– 雙性(殺)黴素 B (Amphotericin B)，2.0 mg;

– EDTA，0.014 mol。（EDTA:Ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸）

9.12.2 溶解並混合均勻。

9.12.3 使用 0.22 μm 濾膜過濾 9.12.2 溶液。

9.12.4 分裝成數管。放入–20°C 保存。

9.12.5 使用前，將其放入 37°C 水浴槽中解凍。

備考：胰蛋白酶 EDTA 溶液有市售產品，若成分不同於 9.12.1，需經適當的驗證後方可使用。

9.13 DEAE–葡聚醣溶液(DEAE–dextran solution)。

9.13.1 將下列材料放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，1000 mL;

– DEAE 葡聚醣，20 g。

9.13.2 溶解並混合均勻。

9.13.3 以 0.22 μm 濾膜（7.13）過濾 9.13.2 溶液。

9.14 瓊脂培養基，用於空斑測定。依下列配方製備溶液 A 和溶液 B，使用前充分混合。

9.14.1 溶液 A

9.14.1.1 將下列材料放入 1 L 量瓶（7.3）中：

–雙倍濃度的維持培養基（9.9），1000 mL;

– DEAE–葡聚醣溶液（9.13），10 mL;

– 7.5%二碳酸鈉溶液（9.3），40 mL。

充分混合。

9.14.1.2 僅用於流感病毒檢測和空斑檢測，加入 3.0 mL 牛胰腺胰蛋白酶和 PBS（–）溶液（9.11）。

9.14.1.3 使用前，將溶液 9.14.1.1 或 9.14.1.2 放入 37°C 的水浴槽（7.9）中。

9.14.2 溶液 B。

9.14.2.1 將下列材料放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，1000 mL;

– 細胞培養瓊脂，15 g。

充分混合。

9.14.2.2 以滅菌釜（7.1）於 121°C、103 kPa 滅菌至少 15 min。

9.14.2.3 使用前，將 9.14.2.2 溶液放入 50°C 水浴槽（7.9）中。

9.15 SCDLP 培養基，用於沖洗試樣上的病毒與中止加工紡織品的抗病毒劑活性。

9.15.1 將下列材料放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– A3 分析用水，1000 mL;

– 酪蛋白蛋白腺(Peptone made of casein)，17.0 g;

– 大豆蛋白腺(Peptone made of soybean)，3.0 g;

– 氯化鈉，5.0 g;

– 磷酸二氫鉀，2.5 g;

– 葡萄糖，2.5 g;

– 卵磷脂，1.0 g。

混合溶解後，然後添加

– 非離子界面活性劑，7.0 g。

溶解並混合均勻。

9.15.2 將(9.15.1)溶液置於 25°C 水浴槽（7.9）中，以氫氧化鈉溶液或鹽酸溶液調整 pH 值至 7.0±0.2。

9.15.3 以滅菌釜（7.1）於 121°C、103 kPa 滅菌至少 15 min。

9.16 維持培養基，用於細胞培養和 $TCID_{50}$ 方法。

9.16.1 將下列材料放入 1 L 量瓶（7.3）中：

– 維持培養基（9.8），1000 mL;

– 牛胰腺胰蛋白酶和 PBS（–）溶液（9.11），3.0 mL。

充分溶解。

10.準備

10.1 活化冷凍保存的宿主細胞

因為宿主細胞是低溫保存，所以需要解凍然後進行培養。程序如下：

10.1.1 將冷凍保存的宿主細胞放入 37°C 水浴槽（7.9）中迅速解凍。

10.1.2 準備一新的具透氣蓋的細胞培養瓶（7.23），加入 20 mL 生長培養基（9.8）。

10.1.3 將 10.1.1 解凍後的宿主細胞放入 10.1.2 細胞培養瓶。

10.1.4 再將 10.1.3 細胞培養瓶放入 37°C CO_2 培養箱（7.24）中，培養宿主細胞（24±2）h。

10.1.5 然後以倒立顯微鏡觀察 10.1.4 細胞培養瓶，觀察細胞是否附著於細胞培養瓶底部，確認細胞是否有增殖，若有增殖繼續下一步。否則，繼續培養。

10.1.6 移除 10.1.5 細胞培養瓶中剩餘的生長培養基。

10.1.7 加入 20 mL 新的生長培養基（9.8）至 10.1.6 細胞培養瓶中。

10.1.8 將 10.1.7 細胞培養瓶放入 37°C CO_2 培養箱（7.24）中（48±2）h。

10.1.9 用顯微鏡觀察，確認細胞是否在細胞培養瓶底部生長至緻密（緻密度 80%~90%）。若細胞增殖不夠，重複步驟 10.1.6~10.1.9，確認細胞增殖是足夠的。

10.1.10 按照 10.2 的步驟進行連續繼代培養。

10.2 宿主細胞繼代培養

應以繼代培養來繁殖宿主細胞。繼代培養程序如下：

10.2.1 確認細胞緻密生長後（10.1.9），移除剩餘的生長培養基。

10.2.2 再加入 5 mL 0.01 mol / L 磷酸緩衝生理食鹽水 PBS（–）(9.10)。沖洗生長在培養瓶底部的細胞表面。重複洗滌程序 3 次。

10.2.3 加入 1 mL 胰蛋白酶 EDTA（Trypsin EDTA）溶液（9.13），並輕搖培養瓶使溶液佈滿整個表面，然後瀝乾剩餘的胰蛋白酶 EDTA 溶液。

10.2.4 將 10.2.3 培養瓶放入 37℃ CO_2 培養箱(7.24)中(10±1) min。

10.2.5 然後，於倒立顯微鏡下觀察 10.2.4 培養瓶，確認細胞開始脫落後（當細胞將要分離而呈現圓粒狀時），輕敲培養瓶邊緣使細胞自瓶壁脫落。

10.2.6 於 10.2.5 培養瓶加入 5 mL 生長培養基（9.8），使用移液吸管溫和且充分地將細胞從培養瓶壁洗下，避免對細胞造成傷害。

10.2.7 準備一個新的具透氣蓋細胞培養瓶（7.23），加入 20 mL 的生長培養基（9.8）。

10.2.8 用移液吸管將 1 mL 的 10.2.6 細胞懸浮液加入 10.2.7 中。

10.2.9 蓋上 10.2.8 細胞培養瓶的蓋子，置於 37°C CO_2 培養箱中培養 5 天。

10.3 病毒感染效價測定–細胞培養

進行細胞培養時，空斑法需使用 6 孔培養盤而 $TCID_{50}$ 方法需使用 96 孔微孔盤。

10.3.1 將 20 mL 生長培養基（9.8）置於培養基容器（7.27）中，並加入 1 mL 繼代培養 10.2.6 的細胞懸浮液。

10.3.2 將 3 mL 10.3.1 的細胞懸浮液置於 6 孔培養盤（7.22）的每個孔中，以進行空斑測定試驗。

10.3.3 將 0.1 mL 10.3.1 的細胞懸浮液置於 96 孔微孔盤（7.21）的每個孔中，以進行 $TCID_{50}$ 方法。

10.3.4 將 10.3.2 的 6 孔培養盤和 10.3.3 的 96 孔微孔盤，放入 37°C CO_2 培養箱(7.24)中培養 3 天至 5 天。

10.3.5 以倒立顯微鏡觀察細胞狀況，確認細胞是否增殖至緻密。

10.4 試驗病毒懸浮液製備

10.4.1 一般

冷凍保存的病毒，試驗前需進行解凍和活化。

10.4.2 流感病毒

10.4.2.1 將冷凍保存的病毒懸浮液置於 37°C 水浴槽(7.9)中快速解凍。

10.4.2.2 從長出單層細胞的 10.2.9 培養瓶中移除生長培養基。

10.4.2.3 在 10.4.2.2 細胞培養瓶中加入 5 mL 維持培養基（9.8），清洗表面培養細胞並移除維持培養基。重複洗滌程序 2 次。

10.4.2.4 準備一新試管。

10.4.2.5 將解凍後的流感病毒置於 10.4.2.4 的試管中，以維持培養基（9.8）稀釋，將病毒濃度調整為 10^3 PFU 至 10^4 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL。

10.4.2.6 將 1 mL 10.4.2.5 調製的流感病毒懸浮液接種在 10.4.2.3 細胞培養瓶的細胞整個表面。

10.4.2.7 將 10.4.2.6 的細胞培養瓶放入 34°C CO_2 培養箱（7.24）中保存 1 h，吸附病毒進入細胞。

10.4.2.8 於 10.4.2.7 細胞培養瓶加入 20 mL 維持培養基（9.8），再加入 30 μL 牛胰腺胰蛋白酶和 PBS（–）溶液（9.11）

10.4.2.9 將細胞培養瓶置於 34°C CO_2 培養箱（7.24）中 1 天至 3 天，使流感病毒增殖。

10.4.2.10 以倒立顯微鏡觀察細胞病變效應，確認流感病毒增殖情況。若增殖，進行以下步驟。

10.4.2.11 將增殖的病毒懸浮液置於離心管中（7.26）。

10.4.2.12 使用離心機（7.18）離心 10.4.2.11 病毒懸浮液，離心條件:4°C、1000 g、15 min。

10.4.2.13 離心後從離心管中取出上清液。此為流感病毒懸浮液。將懸浮液適量分裝於試管中，冷凍保存於–80°C 冷凍櫃（7.11）。

10.4.2.14 以空斑法或 $TCID_{50}$ 法檢測病毒濃度是否超過 10^7 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL 效價，若濃度低於 10^7 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL，需重新製備。

10.4.2.15 使用前，將 10.4.2.14 冷凍保存的病毒懸浮液置於 37°C 水浴槽（7.9）中快速解凍。

10.4.2.16 此為測試用的病毒懸浮液。若不立即使用，保存於 4°C 冰箱。

10.4.3 貓杯狀病毒

10.4.3.1 將冷凍保存的病毒置於 37°C 水浴槽（7.9）中快速解凍。

10.4.3.2 從長出單層細胞的 10.2.9 培養瓶中移除生長培養基。

10.4.3.3 在 10.4.3.2 細胞培養瓶中加入 5 mL 維持培養基（9.8），清洗表面培養細胞並移除維持培養基。重複洗滌程序 2 次。

10.4.3.4 準備一新試管。

10.4.3.5 將解凍後的病毒置於 10.4.3.4 的試管中，以維持培養基（9.8）稀釋，將病毒濃度調整為 10^5 PFU 至 10^6 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL。

10.4.3.6 將 1 mL 10.4.3.5 調製的病毒懸液接種在 10.4.2.3 細胞培養瓶的細胞整個表面。

10.4.3.7 將 10.4.3.6 的細胞培養瓶放入 34°C CO_2 培養箱（7.24）中 1 h，吸附病毒進入細胞。

10.4.3.8 在 10.4.3.7 細胞培養瓶中加入 20 mL 維持培養基（9.8）。

10.4.3.9 將 10.4.3.8 細胞培養瓶放入 37°C CO_2 培養箱（7.24）中 1 天到 3 天，使病毒增殖。

10.4.3.10 以倒立顯微鏡觀察細胞病變效應，確認貓杯狀病毒是否增殖。

10.4.3.11 將增殖病毒懸浮液放入離心管中。

10.4.3.12 使用離心機（7.18）離心 10.4.3.11 病毒懸浮液，離心條件:4°C、1000 g、15 min。

10.4.3.13 離心後從離心管中取出上清液。此為病毒懸浮液。將懸浮液適量分裝於試管中，冷凍保存於–80°C 冷凍櫃（7.11）。

10.4.3.14 以空斑法或 $TCID_{50}$ 法檢測貓杯狀病毒濃度是否超過 10^7 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL 效價，若濃度低於 10^7 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL，需重新製備。

10.4.3.15 使用前，將 10.4.3.14 冷凍保存的病毒懸浮液置於 37°C 水浴槽（7.9）中快速解凍。若不立即使用，請保存於 4°C 冰箱中。

10.4.4 試驗用病毒的感染效價

以下列程序確定測試病毒的感染效價：

10.4.4.1 病毒懸浮液稀釋系列製備

10.4.4.1.1 將 1.8 mL 的維持培養基（9.8）放入新的試管中，保存於冰水浴中。

10.4.4.1.2 在 10.4.4.1.1 的試管中加入 0.2 mL 病毒懸浮液(10.4.2.16 或 10.4.3.15)，使用振盪混合器（7.10）充分混合。

備考：製備 1/10（10^{-1}）的稀釋液。

10.4.4.1.3 將 1.8 mL 維持培養基（9.8）放入新的試管中，保存於冰水浴中。

10.4.4.1.4 將 0.2 mL 的 10.4.4.1.2 懸浮液加入 10.4.4.1.3 的試管中並充分混合。

備考：製備 1/100（10^{-2}）的稀釋液。

10.4.4.1.5 重複此步驟製備病毒懸浮液的稀釋系列。

備考 1：以 $TCID_{50}$ 方法進行試驗時，準備病毒懸浮液的稀釋系列需包含 8 個孔皆被感染的稀釋點和 8 個孔皆未被感染的稀釋點。

備考 2：如果測試中感染病毒效價為 10^8 $TCID_{50}$ / mL，0.2 mL 病毒懸浮液需以 20 mL 洗出病毒懸浮液進行稀釋。則洗出病毒懸浮液濃度為 1×10^6 $TCID_{50}$ / mL。因此，以 $TCID_{50}$ / mL 方法進行試驗時，病毒懸浮液的稀釋系列應準備至 10^{-7}。~~(10^{-8})(JIS L1922)~~

10.4.4.2 感染效價測定

10.4.4.2.1 空斑測定

依據附錄 B 測定感染效價。

10.4.4.2.2 $TCID_{50}$ 方法

依據附錄 C 測定 $TCID_{50}$。

10.5 測試樣品準備

10.5.1 對照組試樣

可以使用CNS 3841規定100%棉梭織布(標準白棉布)或未加工試樣。測試前，先將標準白棉布洗滌10次(10 min、60°C)，不添加洗劑、螢光增白劑或任何其他化學品。

10.5.2試樣製備

10.5.2.1剪成約20 mm×20 mm的大小，秤取(0.40±0.05) g為一個試樣。若是紗線切割成約20 mm，秤取(0.40±0.05) g為一試樣，。

10.5.2.2 對照組準備 9 個試樣，樣品組(抗病毒加工)準備 6 個試樣

備考：3個對照組和3個樣品組用於對照試驗，3個對照組用於接種病毒後立即測量感染效價。剩下3個對照組和3個樣品組用於本標準的主要測試。

10.5.3試樣滅菌

10.5.3.1將試樣個別放入樣品瓶中，並將所有樣品瓶放入金屬網籃中並用鋁箔紙包覆。將樣品瓶蓋同樣以鋁箔紙包覆，與樣品瓶分開置於籃子裡。

10.5.3.2將10.5.3.1的籃子置於121°C、103 kPa的滅菌釜（7.1）中滅菌至少15 min。

10.5.3.3滅菌後，將所有裝有試樣的樣品瓶放入生物安全櫃（7.19）取下鋁箔紙，冷卻60 min，然後檢查樣品瓶中無冷凝水後，蓋上所有樣品瓶瓶蓋。

備考：若試樣無法以高溫高壓滅菌時，可使用其他適合的滅菌方法。

10.6 對照試驗

10.6.1 一般

對照試驗的目的是確認對試樣加工劑活性的抑制效果。試樣加工劑活性的抑制效果是指在沒有細胞毒性並且沒有降低細胞對病毒的敏感性和去抗病毒活性。

(對照試驗的目的是確認對試驗樣品的加工劑活性的抑制效果。對試驗樣品的加工劑活性的抑

制效果是指在病毒沖洗操作過程中所洗出的加工劑不會對細胞產生毒性，並且不會降低細胞對病毒的敏感性，或是使抗病毒活性去活。)

10.6.2 驗證細胞毒性效果確認

10.6.2.1 將 10.5.3 中放在樣品瓶中經滅菌的 3 個對照組和 3 個樣品組，各加入 20 mL SCDLP 洗湿液（9.15）。然後蓋上蓋子，以振盪混合器（7.10）混合(5 秒/次，5 次)。

10.6.2.2 根據附錄 B 或附錄 C 觀察細胞是否受損。

如果確認沒有受損，請繼續下一步。

備考：如果觀察到細胞受損(正常細胞<80%)，則最好改變洗湿液的組成或增加洗湿液量。

10.6.3 驗證細胞對病毒的敏感性和抗病毒活性的去活性

10.6.3.1 將 10.5.3 中放在樣品瓶中經滅菌的 3 個對照組和 3 個樣品組，各加入 20 mL SCDLP 洗湿液（9.15）。然後蓋上蓋子，以振盪混合器（7.10）混合(5 秒/次，5 次)。

10.6.3.2 取 5 mL 洗湿液放入新的試管中。

10.6.3.3 於試管中加入 50 μL 已製備之濃度為（4~6）$\times 10^4$ PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL 的病毒懸浮液。

10.6.3.4 保存於 25°**C**，30 min。

10.6.3.5 依據附錄 B 或附錄 C 測定感染效價。

10.6.3.6 試驗成立條件：

Lg（對照組的 PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL）– Lg（樣品組的 PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL）≤ 0.5

備考：若上述值大於 0.5，最好改變洗湿液的組成或增加洗水湿液量。

11 試驗步驟

11.1 試樣製備

將 10.5 準備所有含有試樣的樣品瓶蓋上瓶蓋。

11.2 將病毒接種到試樣上

以微量吸管精確吸取 0.2 mL 病毒懸浮液（10.4）均勻地接種於樣品瓶中試樣上。然後蓋緊瓶蓋。

11.3 作用時間

將 11.2 的樣品瓶放入 25°**C** 培養箱（7.25）中靜置 2 h。

備考：可由委託者決定接觸時間，但最長不超過 24 h。

11.4 病毒接種後立即沖刷

在 11.2 的 3 個對照組接種病毒後，立即加入各 20 mL SCDLP（9.15）洗湿液。然後，蓋緊瓶蓋，以振盪混合器（7.10）混合(5 秒/次，5 次)，從試樣上洗出病毒。

備考：此病毒洗湿懸浮液是對照組洗出的病毒懸浮原液。

11.5 接觸時間後病毒沖刷

在 11.3 中接觸 2 h 後的 3 個對照組和 3 個樣品組，各加入 20 mL SCDLP（9.15）洗湿液。然

後，蓋緊瓶蓋，以振盪混合器（7.10）混合(5 秒/次，5 次)，從試樣上洗出病毒。

備考：這些病毒懸浮液為接觸後樣品組洗出的病毒懸浮原液和接觸後對照組洗出的病毒懸浮原液。若接種的病毒濃度是 10^8（PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL），病毒濃度變為 2×10^6（PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL）（因為洗出病毒懸浮液包含 0.2 mL 病毒懸浮液和 20 mL SCDLP 洗湿液，因此，$0.2 / 20 = 0.01 = 1\times10^{-2}$，$10^8\times1\times10^{-2} = 1\times10^6$）。

12 製備病毒懸浮液系列稀釋

12.1 將 1.8 mL 維持培養基（9.8）放入新的試管中，然後放入冰水浴中。

12.2 在 12.1 的試管中加入 0.2 mL 11.4 和 11.5 之洗出病毒懸浮液，以振盪混合器（7.10）混合均勻。

備考：準備 1/10（10^{-1}）的稀釋液。此稀釋液的病毒懸浮液濃度是 $1\times10^6\times10^{-1} = 1\times10^5$ PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL。

12.3 將 1.8 mL 的維持培養基（9.8）放入新的試管中，然後放入冰水浴中。

12.4 將 0.2 mL 12.2 的病毒懸浮液加入到 12.3 的試管中並混合均勻。

備考：準備 1/100（10^{-2}）的稀釋液。此稀釋液的病毒懸浮液濃度是

$1\times10^5\times10^{-1} = 1\times10^4$ PFU / mL 或 $TCID_{50}$ / mL。

12.5 重複此步驟以製備病毒懸浮液的稀釋系列。

備考 1：以 $TCID_{50}$ 方法進行試驗，準備病毒懸浮液的稀釋系列需含所有 8 個孔被感染的稀釋點至所有 8 個孔未被感染的稀釋點。

備考 2：如果測試中感染病毒效價為 10^8 $TCID_{50}$ / mL，0.2 mL 病毒懸浮液需以 20 mL 洗出病毒懸浮液稀釋。則洗出病毒懸浮液濃度為 1×10^6 $TCID_{50}$ / mL。因此，以 $TCID_{50}$ / mL 方法進行試驗時，每孔接種 0.1 mL 病毒懸浮液，故病毒懸浮液的稀釋系列需要準備至 10^{-6}。

13 感染效價測量

13.1 空斑測定

根據附錄 B 空斑方法測定感染效價。

13.2 $TCID_{50}$ 方法

根據附錄 C 測定 $TCID_{50}$。

14 感染效價計算

14.1 空斑測定

$P = Z\times R$ ……（1）

式中，P：感染效價（PFU / 0.1 mL）；

Z：2 孔空斑的算術平均值（每 0.1 mL 空斑數）；

R：稀釋倍數。

$W = P\times10$ ……（2）

式中，W：感染效價（PFU / mL）。

病毒的感染效價計算如下：

$V_p = W \times C$

V_p：感染效價（PFU /瓶）；

C：洗出病毒懸浮液沖刷液量（mL）。

14.2 $TCID_{50}$ 方法

14.2.1 貝倫斯和卡伯方法(The Behrens and Karber Method)

在對數稀釋系列的情況下。

$Y = X \times 10^a$

$a = \Sigma p - 0.5$ ……（3）

式中，Y：感染效價（$TCID_{50}$ / 0.1 mL）；

X：病毒懸浮原液（無稀釋）的稀釋倍數;

P：病毒懸浮液各稀釋度的細胞病變效應比率。

Σp：p 值的總和。

感染效價：A（$TCID_{50}$ / mL）

$A = Y \times 10$

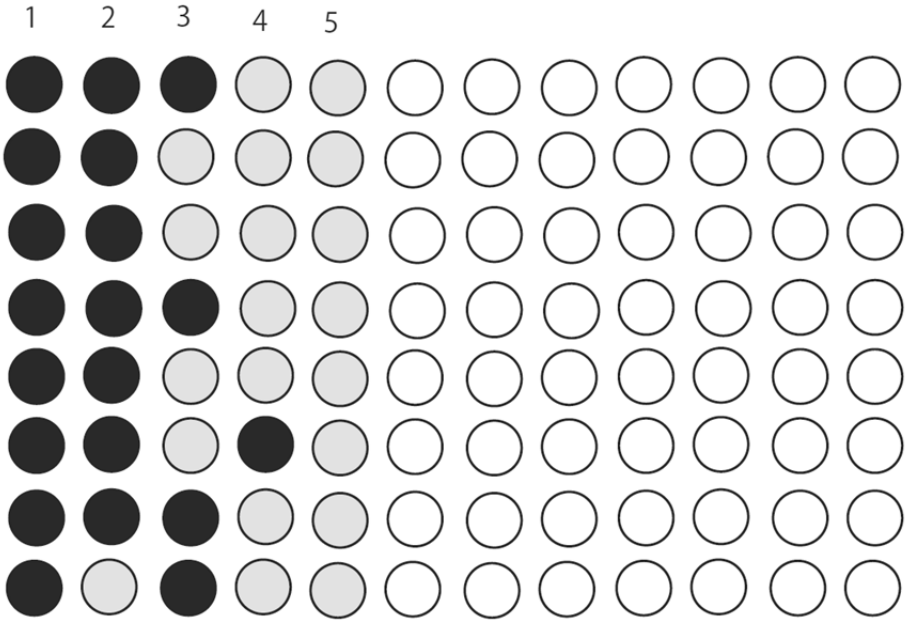
感染效價（$TCID_{50}$ /瓶）計算如下：

$V = A \times C$

V：感染效價（$TCID_{50}$ /瓶）；

C：洗出病毒懸浮液的沖刷液量（mL）；

14.2.2 計算範例



黑色：感染

灰色：未感染

白色：未接種

1 接種病毒懸浮液原液

2 接種病毒懸浮液原液之 1/10 稀釋液

3 接種病毒懸浮液原液之 $1/10^2$ 稀釋液

4 接種病毒懸浮液原液之 $1/10^3$ 稀釋液

5 接種病毒懸浮液原液之 $1/10^4$ 稀釋液

圖 4　$TCID_{50}$ 方法

$X = 10^0 = 1$，

$\Sigma p = 8/8 + 7/8 + 4/8 + 1/8 + 0/8 = 2.5$

則，$a = 2.5 - 0.5 = 2.0$

$Y = 10^{2.0} = 1.0\times10^2$

$A = Y\times10 = 1.0\times10^3$

$V = A\times C = A\times20 = 1.0\times10^3\times20 = 2.0\times10^4$

14.3 試驗結果

14.3.1 試驗有效性

（a）接種病毒濃度的感染效價，

– 流感病毒懸浮液> 10^7 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL

– 貓杯狀病毒懸浮液> 10^7 PFU 或 $TCID_{50}$ / mL

（b）確認抗病毒藥劑活性對細胞生長無抑制效果（10.6）。

（c）對照組感染效價的對數減少值≤2.0(四捨五入至小數一位)。

$$M = \mathrm{Lg}(V_a / V_b) = \mathrm{Lg}(V_a) - \mathrm{Lg}(V_b) \quad \cdots\cdots (4)$$

式中，M：減少值;

Lg（V_a）：對照組立即接種後 3 個試樣感染效價的對數平均值;

Lg（V_b）：對照組接觸 2 h 後 3 個試樣感染效價的對數平均值。

14.3.2 計算抗病毒活性值

依式(5)計算抗病毒活性值，並四捨五入至小數一位。

$$M_v = \mathrm{Lg}(V_b / V_c) = \mathrm{Lg}(V_b) - \mathrm{Lg}(V_c) \quad \cdots\cdots (5)$$

式中，M_v：抗病毒活性值;

Lg（V_b）：對照組接觸 2 h 後 3 個試樣感染效價的對數平均值;

Lg（V_c）：抗病毒樣品組接觸 2 h 後 3 個試樣感染效價的對數平均值。

備考：若 M<1.0，且 Lg（V_a）大於 Lg（V_b），則 Lg（V_b）以 Lg（V_a）代替。

15 試驗報告

包含下列各項：

（a）標準總號;

（b）樣品的種類及名稱等;

（c）試驗病毒的詳細資訊;

（d）測量感染效價的方法;

（e）與本方法差異處。

附錄 A

（規範）

病毒株和宿主細胞

A.1 病毒株和宿主細胞

本標準中使用的病毒和宿主細胞見表 A.1。

表 A.1 –本標準使用的病毒，宿主細胞和培養基

病毒種類	流感病毒	貓杯狀病毒
病毒株	A型流感病毒 Influenza A virus(H3N2): A/Hong Kong/8/68: TC adapted ATCC VR–1679 A型流感病毒 Influenza A virus (H1N1): A/PR/8/34: TC adapted ATCC VR–1469,	貓杯狀病毒 Feline calicivirus; Strain: F–9 ATCC VR–782
宿主細胞 [a]	MDCK cell **(Dog kidney cell orlgin)** （犬腎細胞） ATCC CCL–34; BCRC 60004	CRFK cell **(cat kidney cell orlgin)** （貓腎細胞） ATCC CCL–94; BCRC 60151
生長培養基 [b]	EMEM (9.8.1)	RPMI 1640 (9.8.1)

[a] 在對每種病毒的敏感性進行適當驗證後，可以使用其他宿主細胞。

[b] 其他培養基在經適當驗證細胞增殖後可使用。

附錄 B

（規範）

感染效價測試：空斑測定

B.1 測試程序

B.1.1 以倒立顯微鏡觀察 10.3 的 6 孔培養皿，確認在每個孔中有單層生長細胞至緻密狀態後，移除培養皿中剩餘的生長培養基。

B.1.2 加入 3 mL 的維持培養基（9.8），清洗細胞表面並移除剩餘的維持培養基。重複清洗 2 次。

B.1.3 測試一種病毒懸浮液時，在 2 個孔中接種 0.1 mL 洗出的病毒懸浮原液和稀釋的病毒懸浮液，例如：前 2 個孔接種病毒懸浮原液，接下來 2 個孔接種 1/10 稀釋病毒懸浮液。最後 2 個孔接種純的維持培養基（9.8）以驗證培養基。

B.1.4 將 B.1.3 的培養皿放入表 B.1 所列溫度的 CO_2 培養箱（7.24）中保存 1 h，讓細胞吸附病毒。每隔 15 min 傾斜培養皿，讓細胞整個區域都吸附病毒。

B.1.5 將 3 mL 的維持培養基（9.8）加入培養皿中並清洗表面，然後移除剩餘的維持培養基。

B.1.6 加入 3 mL 瓊脂培養基（9.14）進行空斑試驗。蓋上蓋子並保存於室溫下 10 min。

B.1.7 確認瓊脂凝固，然後將培養皿倒置放入表 B.1 所列溫度的 CO_2 培養箱（7.24）中，培養 2 天至 3 天。然後，從 CO_2 培養箱（7.24）中取出，將培養皿正放並在每個孔中加入 3 mL 細胞固定溶液（9.4），在室溫下保存 1 h 以固定細胞。

B.1.8 從 B.1.7 中移除瓊脂培養基，每個孔加入 3 mL 亞甲基藍溶液（9.6）保存於室溫下 15 min 以染色細胞。

B.1.9 用自來水沖洗多餘的亞甲基藍溶液以確認細胞染色。

B.1.10 計數空斑數量（白色斑點）。

B.1.11 計算兩個孔中空斑數量的平均值。

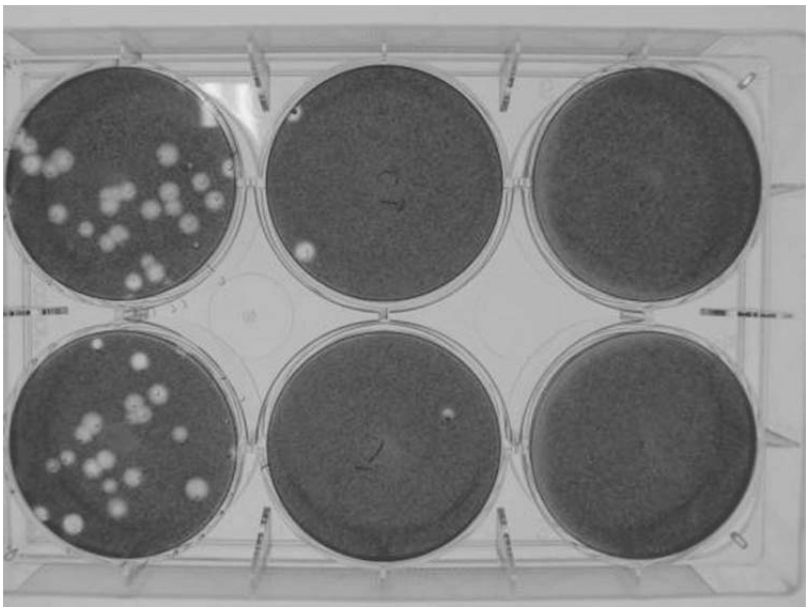


圖 B.1 – 空斑檢測實例照片

表 B.1 CO_2 培養箱條件

試驗病毒	流感病毒	貓杯狀病毒
適用條款	10.4.4.1.1 和 13.1	
吸附溫度設定（°C）	34	37
培養溫度設定（°C）		

B.2 PFU 測定

B.2.1 一般

空斑可以計數約 60 個。超過 60 個時空斑之間不易分辨。若沒有觀察到任何空斑時，兩者平均值以＜1 表示。PFU 的測定在下一節中定義。

B.2.2 PFU 的測定

如本標準所述，在稀釋系列孔中的染色細胞上計數病毒。

如表 B.2 所示，計算每個稀釋度兩個空斑數平均值。

表 B.2 – 數據的解釋

稀釋	洗出之病毒懸浮液	第一次稀釋	第二次稀釋	第三次稀釋	第 N 次稀釋
稀釋率	1	1/10	1/100	1/1000	$1 / 10^N$
空斑平均數量	C1	C2	C3	C4	CN

本標準中空斑的數量測定如下，

– 如果 C1 至 CN 中空斑的數量為 6～60 個，則試驗結果為 6～60 個作為 PFU 數據，
– 如果 C1 為 1 至小於 6，則試驗結果以 C1 作為 PFU 數據，
– 如果 C1 小於 1，包括零，則試驗結果以 1 進行計算。

附錄 C

（規定）

感染效價測試：$TCID_{50}$ 方法

C.1 測試程序

C.1.1 取出 10.3 的 96 孔微孔盤並以倒立顯微鏡觀察，確認在每個孔中有單層生長細胞至緻密狀態後，移除培養皿中剩餘的生長培養基。

C.1.2 加入 0.1 mL 的維持培養基（9.8），清洗細胞表面並移除剩餘的維持培養基。重複清洗 2 次。

C.1.3 在 8 孔中各接種 0.1 mL 洗出病毒懸浮原液和稀釋的病毒懸浮液測試一種病毒懸浮液，例如將病毒懸浮原液接種到第一行的 8 孔，1/10 稀釋病毒懸浮液接種到第二行的 8 孔，在最後的 8 孔接種純的維持培養基（9.8）以驗證培養基。

C.1.4 將 C.1.3 的微孔盤放入表 B.1 所列溫度的 CO_2 培養箱（7.24）中保存 1 h，讓細胞吸附病毒。然後，

C.1.5 排出微孔盤的上清液。

C.1.6 加入 0.1 mL 維持培養基（9.8），清洗細胞表面後移除剩餘的維持培養基。

C.1.7 於 C.1.4 的微孔盤中，貓科杯狀病毒加入 0.2 mL 維持培養基（9.8）或流感病毒加入 0.2 mL 維持培養基（9.16），放入表 C.1 所列溫度的 CO_2 培養箱（7.24）中，培養 7 天。

C.1.8 培養後，以倒立顯微鏡觀察孔中的每個細胞是否發生細胞病變效應。

C.1.9 確認細胞病變效應後，以 Behrens 和 Karber 法計算 $TCID_{50}$。

表 C.1 – CO_2 培養箱條件

試驗病毒	流感病毒	貓杯狀病毒
適用條款	10.4.4.1.2 和 13.2	
吸附溫度設定°C	34	37
培養溫度設定°C		

附錄 D

（規）

培養基組成成分

D.1 一般

培養基有市售產品，並用於細胞培養。如果觀察到預期的細胞生長，則可以使用其他培養基。

D.2 EMEM 的組成成分

EMEM 培養基的組成如表 D.1 所示。可使用市售產品。如果缺少的成分，請依據表 D.1 添加它們。

表 D.1– EMEM 的組成成分

在 1000 mL 水中的組成成分		CAS No.	毫克（mg）
氨基酸 Amino Acids	L–精氨酸鹽酸 (L–Arginine HCl)	1119-34-2	126.40
	L–胱氨酸鹽酸 (L–Cystine 2HCl)	30925-07-6	31.20
	L–谷氨酰 (L–Glutamine)	56-85-9	292.00
	L–組氨酸鹽酸 (L–Histidine HCl •H_2O)	7048-02-4	41.90
	L–異亮氨酸 (L–Isoleucine)	73-32-5	52.50
	L–亮氨酸 (L–Leucine)	61-90-5	52.50
	L–賴氨酸鹽酸 (L–Lysine HCl)	657-27-2	72.50
	L–甲硫氨酸 (L–Methionine)	63-68-3	15.00
	L–苯丙氨酸 (L–Phenylalnine)	63-91-2	32.50
	L–蘇氨酸 (L–Threonine)	72-19-5	47.60
	L–色氨酸 (L–Tryptophan)	73-22-3	10.00
	L–酪氨酸二鈉鹽二水合物 (L–Tyrosine 2Na 2H_2O)	122666-87-9	51.90
	L–纈氨酸 (L–Valine)	72-18-4	46.80
維生素 Vitamins	氯化膽鹼 (Choline Chloride)	67-48-1	1.00
	D 泛酸鈣 (D Calcium Pantothenate)	137-08-6	1.00
	葉酸 (Folic Acid)	59-30-3	1.00
	肌醇 (Myo Insitol)	87-89-8	2.00
	煙酰胺 (Nicotinamide)	98-92-0	1.00
	吡哆醇 (Pyridoxine HCl)	58-56-0	1.00
	鹽酸核黃素 (Riboflavin)	83-88-5	0.10
	鹽酸硫胺素 (Thiamine HCl)	67-03-8	1.00

表 D.1（續）

在 1000 mL 水中的組成成分		CAS No.	毫克（mg）
無機鹽	氯化鈣 (Calcium Chloride, $CaCl_2$)	10043-52-4	200.00
	硫酸鎂 (Magnesium Sulfate, $MgSO_4$)	7487-88-9	97.70
	氯化鉀 (Potassium Chloride, KCl)	7447-40-7	400.00
	氯化鈉 (Sodium Chloride, NaCl)	7647-14-5	6800.00
	磷酸二氫鈉一水合物〔Sodium Phosphate Monobasic, NaH_4PO_4 H_2O) Monohydrate〕	10049-21-5	140.00
其他	葡萄糖 (Dextrose)	50-99-7	1000.00
	苯酚紅鈉鹽 (Phenol Red Sodium Salt)	34487-61-1	10.00

D.3 RPMI 1640 培養基的組成成分

RPMI 1640 有市售產品。表 D.2 列出其組成成分的例子。

表 D.2– RPMI 1640 的組成成分

在 1000 mL 水中的組成成分		CAS No.	毫克（mg）
氨基酸 Amino Acids	L–精氨酸(游離鹼) (L–Arginin)	74-79-3	200.00
	L–天冬酰胺[無水] （L–Asparagin）	70-47-3	50.00
	L–天冬氨酸（L–Aspartic Acid）	56-84-8	20.00
	L–胱氨酸鹽酸（L–Cystine 2HCl）	30925-07-6	65.20
	L–谷氨酸（L–Glutamic Acid）	56-86-0	20.00
	L–谷氨酰胺（L–Glutamine）	56-85-9	300.00
	甘氨酸（Glycine）	56-40-6	10.00
	L–組氨酸(游離鹼)〔L–Histidine（Free Base）〕	71-00-1	15.00
	L–羥基脯氨酸（Hydroxy–L–Prolin）	51-35-4	20.00
	L–異亮氨酸 (L–Isoleucine)	73-32-5	50.00
	L–亮氨酸 (L–Leucine)	61-90-5	50.00
	L–賴氨酸鹽酸 (L–Lysine HCl)	657-27-2	40.00
	L–蛋氨酸 (L–Methionine)	63-68-3	15.00
	L–苯丙氨酸 (L–Phenylalanine)	63-91-2	15.00
	L–絲氨酸 (L–Prolin)	147-85-3	20.00
	L–蘇氨酸 (L–Serine)	56-45-1	30.00
	L–脯氨酸 (L–Threonine)	72-19-5	20.00
	L–色氨酸 (L–Tryptophan)	73-22-3	5.00
	L–酪氨酸二鈉鹽二水合物 (L–Tyrosine 2Na $2H_2O$)	122666-87 -9	28.83
	L–纈氨酸 (L-Valine)	72-18-4	20.00

表 D.2（續）

在 1 000 mL 水中的組成成分		CAS No.	毫克（mg）
維生素 Vitamins	生物素 (Biotin)	58-85-5	0.20
	氯化膽鹼 (Choline Chloride)	67-48-1	3.00
	葉酸 (Folic Acid)	59-30-3	1.00
	肌醇 (Myo–Inositol)	87-89-8	35.00
	煙酰胺 (Niacinamide)	98-92-0	1.00
	D–泛酸半鈣 (D–Pantothenic Acid Hemicalcium)	137-08-6	0.25
	對氨基苯甲酸 (p–Aminobenzoic Acid)	150-13-0	1.00
	鹽酸吡哆醇 (Pyridoxine HCl)	58-56-0	1.00
	核黃素 (Riboflavin)	83-88-5	0.20
	鹽酸硫胺素鹽酸 (Thiamine HCl)	67-03-8	1.00
	維生素 B12 (Vitamine B12)	68-19-9	0.005
無機鹽	硝酸鈣 4H2O (Calcium Nitrate 4H2O)	13477-34-4	100.00
	硫酸鎂(無水) [(Magnesium Sulfate (Anhydrous)]	7487-88-9	48.84
	氯化鉀 (Potassium Chloride)	7447-40-7	400.00
	氯化鈉 (Sodium Chloride)	7647-14-5	6 000.00
	磷酸鈉二鹼(無水) [Sodium Phosphate Dibasic (Anhydrous)]	7558-79-4	800.00
其他	D–葡萄糖 (D–Glucose)	50-99-7	2 000.00
	穀胱甘肽，還原態 (Glutathione, Reduced)	70-18-8	1.00
	酚紅鈉 (Phenol Red Na)	34487-61-1	5.30

附錄 E

（參考）

其他病毒：脊髓灰質炎病毒（Polio virus）

E.1 一般

脊髓灰質炎病毒被選作測試病毒，因為它對化學物質具有很高的抗藥性，對酸穩定並且不受脂質溶劑如乙醚和大多數洗劑或四級銨鹽的影響。

脊髓灰質炎病毒比流感病毒或貓杯狀病毒更小。本標準選擇兩種病毒無套膜的貓杯狀病和有套膜的流感病毒作為代表，並行使用無套膜的脊髓灰質炎病毒。本附錄介紹脊髓灰質炎病毒的資訊和檢測方法。

E.2 脊髓灰質炎病毒株和宿主細胞

表 E.1–脊髓灰質炎病毒株和宿主細胞

病毒種類	脊髓灰質炎病毒
病毒株	脊髓灰質炎病毒 1 型 LSc–2ab （符合 WHO 標準的口服生脊髓灰質炎疫苗）
宿主細胞	HEp–2 細胞 （人類咽癌細胞） ATCC CCL–23
培養基	EMEM（9.8.1）

E.3 測試條件

該測試程序的所有條件與貓杯狀病毒完全相同。

附錄 F

（參考）

使用無特定病原體(SPF)胚胎卵測試方法

F.1 一般

胚胎卵使用於傳統的生物技術測試方法，特別是用於生產由感染性病毒引起的流行性疾病疫苗。如本標準所述，培養細胞技術成為生物技術測試更常用方法可以避免使用諸如胚胎卵等活體。但是，此方法仍為一些測試機構所使用，因此在本附錄中作介紹。

F.2 範圍

本附錄介紹如何使用無特定病原體(specific pathogen free, SPF)胚胎卵於紡織品測量病毒感染值。

F.3 術語和定義

F.3.1 SPF 胚胎卵

它指沒有被用於疫苗生產的病原微生物感染經歷並用於本附錄測試的雞蛋。SPF 代表無特定病原體。

F.4 試樣製備

F.4.1 秤取 0.2 g 為一個試樣，每個樣品取 3 個試樣。

F.4.2 若為片狀樣品，如梭織物，針織物或不織布，取 0.2 g 試樣剪成 1.5 cm × 1.5 cm，並將它們堆疊起來。

F.4.3 將試樣放入聚乙烯夾鏈袋中。

備考：不需要對試樣進行滅菌。

F.5 製備胚胎卵

選擇 10 日齡胚胎卵。

F.6 病毒的製備

流感病毒：流感病毒使用雞胚適應株 A / PR / 8/34（H1N1）或 A / Aichi / 3/68（H3N2）。

F.6.1 病毒培養

F.6.1.1 將 0.2 mL 的病毒懸浮液接種到雞蛋的尿囊腔中。

F.6.1.2 接種後，在 35℃培養箱培養 3 天。

F.6.1.3 培養後，將雞蛋放入冰箱冷卻過夜，然後取出雞蛋中的尿囊液。

F.6.1.4 檢查自雞蛋取出的所有液體以確認流感病毒是否增殖。當感染時觀察到血球凝集。確認感染後，流體被視為病毒液或病毒培養基。

F.6.1.5 測試前，用磷酸緩衝鹽溶液（PBS）稀釋病毒液（pH 值 7.2）使病毒濃度為 10^7 EID_{50} / 0.2 mL。

F.6.2 製備 0.5%雞紅血球懸浮液

F.6.2.1 用含有 1mL 2%檸檬酸鈉的注射器從雞收集 4.0 mL 靜脈血，然後放入試管中。

F.6.2.2 將試管安裝在離心機上並離心（1000 g、10 min）。

F.6.2.3 移除上清液，然後加入 5 mL 的 PBS 到試管中。

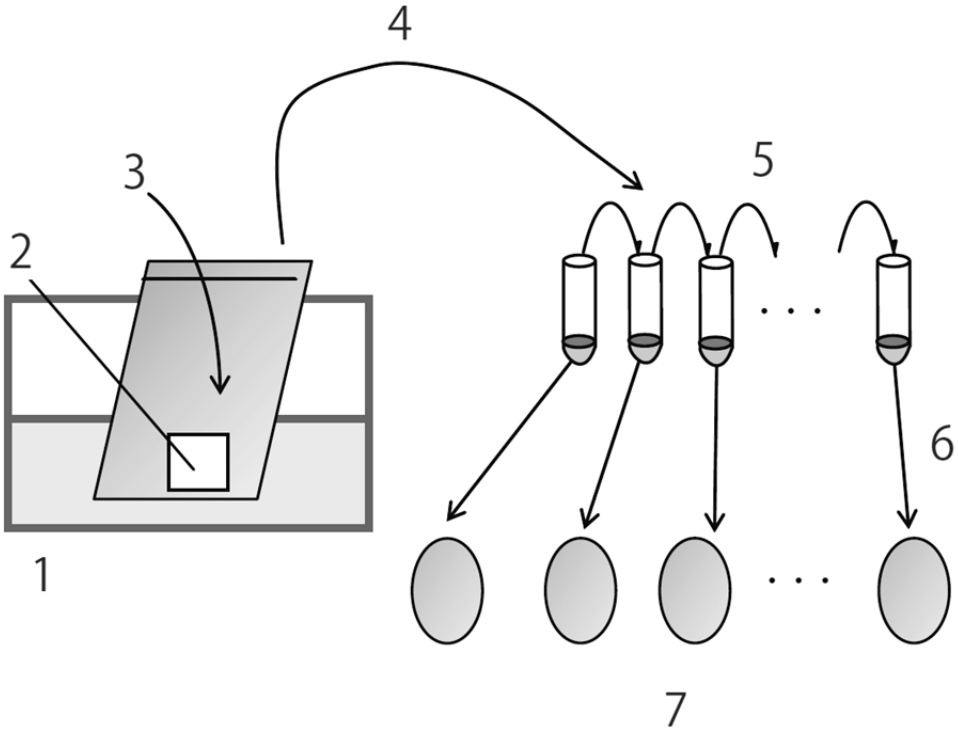
F.6.2.4 重複兩次離心。然後，

F.6.2.5 將試管中 0.5 mL 沉澱的雞紅血球和 99.5 mL 的 PBS 充分混合。

F.7 測試程序

F.7.1 一般

一般過程如圖 F.1 所示。



1 4°C 水浴槽

2 聚乙烯袋中的樣品

3 含有病毒懸浮液的聚乙烯袋

4 接觸後回收病毒懸浮液

5 用 PBS 系列稀釋病毒懸浮液

6 在雞蛋中接種病毒懸浮液

7 雞蛋進行培養

圖 F.1–胚胎卵測試方法流程圖

備考：可以室溫 25°C 替代圖 F.1 的 4°C 水浴槽執行。

F.7.2 樣品病毒懸浮液接觸

F.7.2.1 將樣品放入聚乙烯夾鍊袋中。

F.7.2.2 將 PBS 稀釋後的病毒懸浮液裝入含有試樣的聚乙烯袋中。

F.7.2.3 將袋子放入 4°C 水浴槽中，或將袋子置於 25°C 室溫下，接觸時間 10 min 或 2 h。

F.7.3 將作用後的病毒懸浮液接種至 10 日齡胚胎卵。

F.7.3.1 從 F.7.2.3 的聚乙烯袋中回收作用後的病毒懸浮液。

F.7.3.2 將作用後的病毒懸浮液進行系列稀釋，如 10^{-1},10^{-2},10^{-3} 等。

F.7.3.3 將 0.2 mL 的稀釋病毒懸浮液接種到雞蛋的尿囊腔中，每個稀釋度三個雞蛋。

F.7.3.4 在 35°C 培養兩天。

F.7.4 病毒分析

F.7.4.1 **培養**兩天後，取出雞蛋中的尿囊液並放入試管中。

F.7.4.2 將 0.5%雞紅血球懸浮液加入試管中。

F.7.4.3 觀察試管中是否產生紅血球凝集。病毒感染的判斷如下。

– 病毒感染（–）：觀察到紅血球沉澱，但沒有凝集。

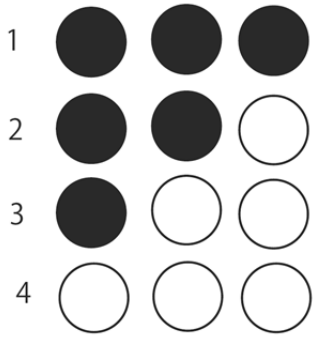
– 病毒感染（+）：觀察到紅血球凝集。

F.7.5 計算病毒效價

用 Reed 和 Muench 的方法計算病毒效價 EID_{50}。

50%EID 是從每個稀釋度累計感染數量計算的 50%。

計算示例如圖 F.2 所示。



1　10^{-4} 病毒懸浮液稀釋度接種

2　10^{-5} 病毒懸浮液稀釋度接種

3　10^{-6} 病毒懸浮液稀釋度接種

4　10^{-7} 病毒懸浮液稀釋度接種

黑色:感染

白色:未感染

圖 F.2–胚胎卵方法

在這個例子中，

表 F.1 – EID 測試示例

稀釋度	感染的雞蛋	累計數量		累計（%）	EID_{50}
		感染	未感染		
10^{-4}	3	6	0	100	
10^{-5}	2	3	1	75	比例， （75–50）/（75–25）
10^{-6}	1	1	3	25	
10^{-7}	0	0	6	0	
EID_{50} = – 5 –（75 – 50）/（75 – 25）= – 5 – 0.5 = – 5.5					

F.8 抗病毒效價

效價由以下公式計算：

$M_v = -Lg(V_b / V_a) = -[Lg(V_b) - Lg(V_a)]$

M_v:抗病毒效價;

$Lg(V_b)$：接觸時間後未與樣品接觸的病毒液的 EID_{50};

$Lg(V_a)$：接觸時間後與樣品接觸的病毒液的 EID_{50}。

在此例中，如果沒有試樣的濃度是 10^{-7}，則

$EID_{50} = Lg10^{-7} = -7$，

$M_v = -(-7) - 5.5 = 1.5$

附錄 G

（參考）

抗病毒效果

G.1 產品的抗病毒性能

抗病毒紡織產品可依據下表評估試驗結果。

表 G.1 – 抗病毒性能標準

項目	抗病毒活性值（M_v）	標準
測試紡織品	$3.0 > M_v \geq 2.0$	效果有限
	$M_v \geq 3.0$	良好

附錄 H

（參考）

實驗室間能力比對結果（1）

H.1 參與者

日本的 1 個測試機構和 1 個實驗室。

H.2 樣品

測試 7 個樣品。詳情如下，

表 H.1 – 實驗室間能力比對結果樣品資訊

編號	材料和組成	抗病毒加工	備考
A	棉 100%梭織物：平紋	對照（無）	A0：時間 0 h， A2：時間 2 h
B	棉 100%梭織物：斜紋	無	
C		正常	
D		強	
E	聚酯 65%/棉 35%梭織物：絨面	無	
F		正常	
G		強	

H.3 測試條件

– 測試病毒：A 型流感病毒（H1N1）或 A 型流感病毒（H3N2）

– 宿主細胞：犬腎細胞（MDCK 細胞）ATCC CCL–34

– 感染效價測量：空斑測定法

H.4 測試結果

H.4.1 實驗室的試驗結果

表 H.2 – 實驗室的試驗結果

樣品	A_0	A_2	B	C	D	E	F	G	備考
作用時間(h)	0	2	2	2	2	2	2	2	
Lg PFU /vial	7.77	7.31	7.08	<2.0	<2.0	7.35	6.43	6.45	
	7.7	7.28	7.31	<2.0	<2.0	7.31	6.31	6.46	
	7.72	7.36	7.23	<2.0	<2.0	7.2	6.43	6.28	
平均值	7.73	7.32	7.21	<2.0	<2.0	7.29	6.39	6.40	
名稱	LgV_a	LgV_b	LgV_c						
驗證（A0–A2）		0.41							≤2.0：OK
抗病毒活性值			0.1	> 5.3	> 5.3	0.0	0.9	0.9	

- 試驗病毒：A 型流感病毒（H1N1）

  必須驗證試驗病毒接種濃度的感染效價

- 流感病毒懸浮液濃度> 10^7PFU / mL：試驗病毒懸浮液濃度為 2.8×10^8PFU / mL

H.4.2 實驗室的試驗結果

表 H.3 – 實驗室的試驗結果

	A_0	A_2	B	C	D	E	F	G	備考
作用時間(h)	0	2	2	2	2	2	2	2	
Lg PFU /vial	7.36	7.18	7.2	<2.0	<2.0	7.08	6.6	6.51	
	7.45	7.23	7.2	<2.0	<2.0	7.23	> 6	> 6	
	7.61	7.04	7.08	<2.0	<2.0	7.15	6.63	6.59	
平均值	7.47	7.15	7.08	<2.0	<2.0	7.15	6.62	6.55	
名稱	LgV_a	LgV_b	LgV_c						
驗證（A0–A2）		0.32							≤2.0：OK
抗病毒活性值			0.1	> 5.1	> 5.1	0.0	0.5	0.6	

– 測試病毒：A 型流感病毒（H3N2）

必須驗證試驗病毒接種濃度的感染效價

– 流感病毒懸浮液> 10^7PFU / mL：測試病毒為 1.2×10^8PFU / mL

附錄 I

（參考）

實驗室間能力比對結果（2）

I.1 參與者

日本的 4 個測試機構和 1 個實驗室。

I.2 樣品

測試 7 個樣品。詳情如下，

表 I.1 –能力比對樣品資訊

編號	材料和組成	抗病毒加工	備考
	棉 100%梭織物	對照（無）	A_0：時間 0 h，A_2：時間 2 h
A	棉 100%梭織物	無	
		抗病毒加工	
B	棉 100%梭織物	無	
		抗病毒加工	
C	聚丙烯/聚乙烯/嫘縈不織布	無	
		抗病毒加工	

I.3 測試條件

I.3.1 病毒，宿主細胞等

– 測試病毒：流感病毒（H3N2）（ATCC VR–1679）

– 宿主細胞：犬腎細胞（MDCK 細胞）ATCC CCL–34

– 感染效價測定：空斑測定法

I.3.2 空斑測定條件

– 加入 0.3%牛血清白蛋白以測試病毒懸浮液

– 試樣重量：0.4 g

– 病毒懸浮液接種量：0.2 mL

– 作用條件：25°C，2 h

– 沖洗液：SCDLP 培養基

I.4 測試結果

I.4.1 樣品 A

表 I.2 – 樣品 A 實驗室間能力比對結果

		樣品				抗病毒活性	初始驗證
		對照		A			
		未加工		未加工	加工	$M_v = \mathrm{Lg}V_b - \mathrm{Lg}V_c$	$\times 10^8$
作用時間（h）		0	2	2	2		
Lg PFU /vial	TH 1	7.41	6.71	6.74	3.56	3.2	1.5
	TH 2	7.01	6.84	6.76	< 2.0	> 4.84	0.47
	TH 3	7.13	6.48	6.09	< 2.0	> 4.48	0.65
	TH 4	7.72	7.38	7.33	< 2.0	> 5.4	3.5
	實驗室 1	7.76	7.34	7.31	< 2.0	> 5.34	3.6
平均值		7.47	7.01	6.91	––	> 4.65	
名稱		$\mathrm{Lg}V_a$	$\mathrm{Lg}V_b$		$\mathrm{Lg}V_c$		
驗證（$A_0 - A_2$）			0.46				
標準值			≤2.0				$\geq 10^7$

I.4.2 樣品 B

表 I.3 – 樣品 B 實驗室間能力比對結果

		樣品				抗病毒活性	初始驗證
		對照		B			
		未加工		未加工	加工	$M_v = \mathrm{Lg}V_b - \mathrm{Lg}V_c$	$\times 10^8$
作用時間（h）		0	2	2	2		
Lg PFU /vial	TH 1	7.41	6.71	6.89	6.42	0.3	1.5
	TH 2	7.01	6.84	6.93	6.25	0.59	0.47
	TH 3	7.13	6.48	6.35	5.91	0.57	0.65
	TH 4	7.72	7.38	7.30	6.54	0.8	3.5
	實驗室 1	7.76	7.34	7.41	6.57	0.77	3.6
平均值		7.47	7.01	7.04	6.40	0.6	
感染效價		$\mathrm{Lg}V_a$	$\mathrm{Lg}V_b$		$\mathrm{Lg}V_c$		
驗證（$A_0 - A_2$）			0.46				

I.4.3 樣品 C

表 I.4 – 樣品 C 實驗室間能力比對結果

		樣品				抗病毒活性	初始驗證
		對照		C			
		未加工		未加工	加工	$M_v = LgV_b - LgV_c$	$\times 10^8$
作用時間（h）		0	2	2	2		
Lg PFU /vial	TH 1	7.41	6.71	––	< 2	> 4.7	1.5
	TH 2	7.01	6.84	––	< 2	> 4.84	0.47
	TH 3	7.13	6.48	––	< 2	> 4.48	0.65
	TH 4	7.72	7.38	7.40	< 2	> 5.4	3.5
	實驗室 1	7.76	7.34	7.70	< 2.56	> 4.78	3.6
平均值		7.47	7.01	7.55	––	> 4.84	
感染效價		LgV_a	LgV_b		LgV_c		
驗證（$A_0 - A_2$）			0.46				

I.4.4 實驗室間能力比對結果總結

表 I.5 – 抗病毒活性總結

測試機構或實驗室	抗病毒活性值		
	樣品		
	A	B	C
TH 1	3.2	0.3	> 4.7
TH 2	> 4.84	0.59	> 4.84
TH 3	> 4.48	0.57	> 4.48
TH 4	> 5.4	0.8	> 5.4
實驗室 1	> 5.34	0.77	> 4.78
平均值	> 4.65	0.6	> 4.84

參考資料

[1] EN 14476:3013+A1:2015, Chemical disinfectants and antiseptics–Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine–Test method and requirements (phase 2, step 1)

[2] ISO 20743:2013, Textiles — Determination of antibacterial activity of textile products

相對應國際標準

[1] ISO 18184:2014, Textiles — Determination of antiviral activity of textile products

[2] JIS L 1922:2016, Textiles — Determination of antiviral activity of textile products