



中华人民共和国医药国家标准

GB/T ××××—XXXX

眼科光学 接触镜护理产品消毒效果评价 第2部分：对棘阿米巴滋养体消毒效果的 评价方法

Ophthalmic optics—Disinfection Efficacy Evaluation of Contact Lens Care Products—Part 2: Method for evaluating disinfecting efficacy by using trophozoites of Acanthamoeba species as the challenge organisms

(ISO 19045-2:2024, Ophthalmic optics—Contact lens care products—Part 2: Method for evaluating disinfecting efficacy by contact lens care products using trophozoites of Acanthamoeba species as the challenge organisms, IDT)

(草案稿)

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

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。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

GB/T 《眼科光学 接触镜护理产品消毒效果评价》拟分成以下部分：

——第 1 部分：对棘阿米巴包囊形成评价方法。目的在于评估化学消毒系接触镜护理产品对棘阿米巴包囊形成的效果。

——第 2 部分：对棘阿米巴滋养体消毒效果的评价方法。目的在于评估化学消毒系接触镜护理产品对棘阿米巴滋养体的消毒效果。

——第 3 部分：对棘阿米巴包囊消毒效果的评价方法。目的在于评估化学消毒系接触镜护理产品对棘阿米巴包囊的消毒效果。

眼科光学 接触镜护理产品消毒效果评价 第2部分：对棘阿米巴滋养体消毒效果评价方法

1 范围

本文件描述了一种以棘阿米巴滋养体为挑战微生物，评估化学消毒系接触镜护理产品抗微生物活性的试验方法。

本文件适用于具有化学消毒功能的接触镜护理产品。

本文件不适用于需要专用镜片杯的双氧护理产品。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

接触镜消毒

采用化学或物理方法减少接触镜上存活微生物的过程。

3.2

滋养体

能运动的、摄食的棘阿米巴变形虫。

3.3

成囊

棘阿米巴生命周期中，从滋养体转变为包囊的阶段。

3.4

成熟包囊

休眠形态的棘阿米巴，含内外2层细胞壁。与滋养体相比，对热、干燥、化学品等的耐受性更强。

3.5

未成熟的包囊

仅含内层细胞壁的包囊。

3.6

室温

指范围为18°C—25°C温度。

3.7

冷藏温度

指范围为2°C—8°C的温度。

3.8

传代

将细胞从一个培养容器转移或转植到另一个培养容器中，这个过程中可能发生稀释，也可能没有发生稀释。

注1：任何时候细胞从一个容器转移到另一个容器时，无论是有意还是无意，都可能发生一部分细胞的丢失和因此产生的稀释。

注2：该术语与“继代”同义。

3.9

传代次数

培养物中的细胞已经被继代或传代的次数。

4 原理

本试验用规定株棘阿米巴滋养体制备接种物，对接触镜消毒产品进行测试，评估其在预设时间间隔点（模拟产品使用）的活性变化。

5 试验用微生物

5.1.1 卡氏棘阿米巴（ATCC 50370），多噬棘阿米巴（ATCC 30461）

5.1.2 不要使用超过 5 代的棘阿米巴滋养体

5.1.3 大肠杆菌（ATCC 8739）

注：大肠杆菌用于覆盖的琼脂板，用于恢复生长方法1（5.9.1）中棘阿米巴的恢复生长和恢复生长方法2（5.9.2）中微孔的接种。

5.2 培养基和试剂

5.2.1 Ac#6 无菌半合成的棘阿米巴生长培养基（附录 A）

5.2.2 1:4 林格氏溶液（附录 B）

5.2.3 NNA 琼脂（附录 D，恢复生长方法 1 中使用）

5.2.4 胰酪大豆胨液体培养基（TSB）（附录 E 中使用）

5.2.5 供 2 种恢复生长方法使用的中和肉汤（附录 G）

5.3 试验材料

5.3.1 50ml 无菌的聚丙烯离心管

5.3.2 15mL 无菌圆底管（聚苯乙烯、聚丙烯或玻璃，取决于要测试的接触镜护理产品的配方）

5.3.3 12 孔无菌的平底光学处理的或等离子处理的微量滴定板

5.3.4 96 孔无菌的平底光学处理的或等离子处理的微量滴定板

5.3.5 一次性使用的吸头：10ml、20uL、100uL、200uL、1000uL

5.3.6 一次性使用的 3mL 无菌移液吸头

5.3.7 配备 10 倍、20 倍、40 倍相位差物镜的倒置显微镜

5.3.8 温度为 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养箱

5.3.9 离心机

5.3.10 旋涡混合器

5.3.11 深度为 0.2mm 的细胞计数板（血球计数板）；如 INCYTO C-CHIP、一次性使用 Fuchs Rosenthal 血球计数板

5.3.12 选配：旋转叶片的细胞刮刀

5.3.13 75cm^2 和 150cm^2 - 185cm^2 的无菌扁平聚苯乙烯组织培养瓶

5.3.14 恒温摇床

5.3.15 2 - 8°C 冰箱

5.4 试验样品

待测产品应与销售产品一致。测试前，直接将产品从终包装中取出。测试 3 批产品，用独立制备的接种物对每批产品进行试验。

5.5 培养物的管理

5.5.1 根据 ATCC 的条款，微生物代数不超过 5 代。

5.5.2 保存用的培养物和供测试用的培养物的管理见附录 C。

5.6 滋养体的培养和收集

5.6.1 使用附录 A 中的棘阿米巴生长培养基 Ac#6，按照附录 C 的方法培养滋养体。

注：依据试验的规模和所需滋养体的数量，准备足够数量的培养瓶。

5.6.2 培养 24h 后，取出附着的滋养体。

注：可以通过剧烈的摇动、用刮刀刮瓶底或用适当力度敲击培养瓶的方法取出滋养体。

5.6.3 将滋养体倒入 50mL 聚丙烯离心管中，室温下 500 x g 离心 5min。

5.6.4 取 1 管滋养体沉淀，用 10mL 1:4 林格氏溶液（见附录 B）重悬，如果需要更多接种物，用相同的方法重悬其他滋养体沉淀。

5.6.5 10mL 的 1:4 林格氏溶液洗涤 3 次，然后室温下，500xg 离心 2 分钟。

5.6.6 在 1-2mL 1:4 林格氏溶液中涡流重悬滋养体沉淀。

5.7 棘阿米巴标准原液的制备

5.7.1 用细胞计数板（用 1:4 林格氏溶液，以 1:10~1:100 稀释原液）计数并记录原液中的滋养体数量（cells/mL）

注1：用改进的Fuchs Rosenthal INCYTO一次性使用血球计数板，取20uL进行细胞计数

注2：由100uL加入900uL得到1:10稀释液，由2次1:10稀释得到1:100的稀释液。

5.7.2 用 1:4 林格氏溶液将滋养体原液的浓度调至 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ cells/mL（基于血球计数板的计数结果），此溶液称为棘阿米巴的标准原液。

取 0.1mL 棘阿米巴的标准原液接种至 10 mL 1:4 林格氏溶液中，得到 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL 的溶液作为对照。用旋涡混合器将悬液混合至旋涡形成。用血球计数板确认对照溶液的细胞浓度。对照溶液的细胞浓度必须在 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^6$ 之间。记录测得的细胞浓度。

5.8 接种

5.8.1 如果产品对光敏感，则避光进行试验。

5.8.2 为每株棘阿米巴、每批样品，准备 3 根圆底试管，每根试管中装入 10mL 待测样品溶液。应使用与待测溶液兼容的试管。

5.8.3 向装有样品的试管内，接种 0.1mL 棘阿米巴的标准原液，细胞浓度范围 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^5$ cells/mL。确保接种的体积不超过样品体积的 1%。

5.8.4 充分涡旋混匀，以确保完全分散。

5.8.5 接种后的样品放置于室温下保存，用经校准的设备监控并记录温度。

5.9 恢复生长程序

恢复生长程序中，至少设置 4 个平行。应在第 14 天观察所有的恢复生长孔。典型的阳性孔和阴性孔的照片参考附录 J。

5.9.1 恢复生长方法 1（12 孔板方法）

5.9.1.1 至消毒时间后，涡旋混匀接种后的样品，取 1.0 mL 用于活性计数。推荐时间点包括：最短推荐消毒时间的 25% 和 100%。如果推荐接触镜消毒过夜，则浸泡时间为 8h。

5.9.1.2 在指定的时间间隔点，从测试样品中取 1.0mL，加入到 9.0mL 的经验证的中和肉汤中（附录 G）（ 10^{-1} 稀释级），涡旋混匀。静置适宜时间，中和消毒成分。

5.9.1.3 用 1:4 林格氏溶液，再进行 5 次 10 倍系列稀释（ 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释级）。

5.9.1.4 在适合的稀释级进行活性计数。取 1mL 稀释液，置于含 NNA（附录 D）和 E.coli 的 12 孔板的相应孔内。每个稀释级做 4 个平行。

5.9.1.5 将 12 孔板置于 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培养，在显微镜下观察生长情况。在第 14 天观察所有的恢复生长的生长情况，参考附录 J 判断是否生长。

5.9.1.6 没有生长的孔也应该记录，如记录为“-”（没有恢复生长）。

5.9.1.7 按照最可能数法计算 log 减少值。最可能数法见附件 H 的 Reed 和 Muench 运算或附件 I 中的 Spearman-Kärber 运算。恢复生长方法 1 中，Reed 和 Muench 数据表是按照每孔 1ml 计算的。

5.9.2 恢复生长方法 2（96 孔板法）

5.9.2.1 至消毒时间后，涡旋混匀接种后的样品，取 20uL 用于活性计数。推荐时间点包括：最低推荐消毒时间的 25% 和 100%。如果推荐接触镜消毒过夜，则浸泡时间为 8h。

5.9.2.2 在指定的时间间隔点，从测试样品中取 20uL，加入到含 180uL 中和肉汤（附录 G）（ 10^{-1} 稀释级）的 96 孔板外侧的至少 4 个孔内（A1-A4），静置 10min，中和消毒成分。参考图 A 为 96 孔板布局。

5.9.2.3 用吸头轻轻地上下吸吹 6 次，混匀 4 个接种孔。通过微孔板进行 5 次 10 倍稀释，转移 20uL 到下一个孔内，混匀，然后再转移 20uL……（孔 B1-B4、C1-C4、D1-D4、E1-E4、F1-F4），最后一排的孔混匀后各丢弃 20uL。在此步骤中制得下列稀释液： 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 。

在恢复生长方法2中，Reed和Muench数据表是按照每孔0.2ml计算的。（实际只有0.18ml）

5.9.2.4 向每个孔中加 50uL 大肠杆菌（附录 E，大肠杆菌工作菌液浓度是 1×10^9 cfu/mL）。

5.9.2.5 将 96 孔板密封并置于 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培养，在显微镜下观察生长情况。在第 14 天观察所有的恢复生长的生长情况，参考附录 J 判断是否生长。滋养体可能经历包囊化因此孔中可能含未成熟和成熟的包囊。

5.9.2.6 没有生长的孔应记录，如记录为“-”（没有恢复生长）。有生长的孔应记录，如记录为“+”（恢复生长）。

5.9.2.7 按照 Reed 和 Muench 运算(附件 H)或 Spearman-Kärber 运算(附件 I)的最可能数法计算 log 减少值。

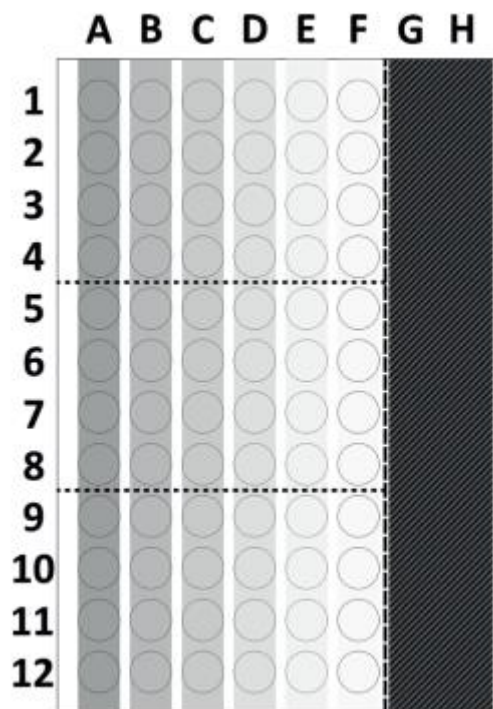


图1 方法 2 中 96 孔板的布局图

如图1所示划分96孔板。向外侧孔（A列）内各加180uL中和肉汤，向其他孔（B-F列）内加180uL的1:4林格氏溶液。

6 对照试验

6.1 接种物对照试验（阳性对照试验）

6.1.1 每次试验都应用相同材料和方法进行对照试验，试验中用 1:4 林格氏溶液替代护理液。将 0.1mL 棘阿米巴的标准原液加入到 10mL 的 1:4 林格氏溶液中，制备接种物对照液。根据产品评估中使用的恢复生长的方法，按照 5.8.4、5.8.5 或 5.9.1、5.9.2 操作。接种后的 1:4 林格氏溶液中每毫升的细胞数应通过血球计数板计数，并记录数值。为了确定 log 减少值，接种物浓度和测试溶液中的细胞浓度应根据 Reed 和 Muench 表或 Spearman-Kärber 表。

6.2 恢复生长培养基对照试验（中和产物对照试验）

6.2.1 将消毒产品以 1/10 比例（1ml 到 9ml）稀释至经验证的中和剂中混匀，将混合液静置至适宜的时间，使中和作用完全。将 0.1 mL 棘阿米巴的标准原液加入到中和产物中。根据产品评估中使用的恢

复生长的方法，按照 5.8.4、5.8.5 或 5.9.1、5.9.2 操作。

6.2.2 恢复生长试验结果至少是接种物对照试验结果的 50%。

7 试验有效性条件

如果接种物对照板上的细胞浓度低于 1×10^4 cells/mL或大于 5×10^5 cells/mL，该实验无效，须重新试验。

附录 A
(规范性)

棘阿米巴生长培养基 (Ac # 6) 的制备

A.1 用途

用于棘阿米巴滋养体的无菌培养。

A.2 培养基成分

Ac # 6培养基的组成成分见表A.1

表A.1 Ac # 6培养基的成分表

原料	用量
Biosate培养基 (如款号: BD-211862)	20.0g
葡萄糖 (如Sigma G7021)	5.0g
KH ₂ PO ₄ (无水, 如Fluka 60219 or EMD PX1565-1)	0.3g
^a 维生素B12原液 (100ug/mL, 如Sigma B4051 or EMD 1.11988.0100)	100uL
^b L-蛋氨酸原液 (5mg/mL, 如 Fluka 64319 or Calbiochem 4500)	3mL
去离子水或超纯水	至1000mL
^a 维生素 B12 原液 (100ug/mL) 的制备取 10 mg 维生素 B12, 溶解于 100 mL 的去离子水或者超纯水中, 分装成 10mL 每份, 于 121°C 高压灭菌 15 min。标记批号, 储存在-20°C, 可保存 12 个月。取一份解冻, 置于 2-8°C, 可保存 1 个月。 ^b L-蛋氨酸原液 (5mg/mL) 的制备取 500 mg L-蛋氨酸, 溶解于 100mL 的去离子水或者超纯水中, 分装成 20mL 每份, 于 121°C 高压灭菌 15min。标记批号, 储存在-20°C, 可保存在 12 个月。取一份解冻, 置于 2-8°C, 可保存 1 个月。	

A.3 制备方法

A.3.1 将成分表中的成分溶解在一个大小合适的干净玻璃容器中, 温和加热。

A.3.2 用1N盐酸或1N氢氧化钠调节pH值至6.5-6.6。

A.3.3 添加去离子水或超纯水, 用玻璃量筒定容至1000mL。

A.3.4 用硼硅酸盐玻璃瓶, 分装成适合的体积(如250毫升), 121°C 高压灭菌15min。

A.3.5 灭菌后的培养基在室温下可保存2个月。

附录 B
(规范性)

附录 B1:4 林格氏溶液的制备

B.1 用途

用于清洗和稀释棘阿米巴滋养体。

B.2 1:4 林格氏溶液的成分

1:4林格氏溶液的成分见表B.1

表B.1 1:4 林格氏溶液成分表

原料	用量
1:4林格氏片 (如Oxoid BR 0052G)	1片
去离子水/超纯水	500mL

B.3 制备方法

- B.3.1 在合适大小的硼硅玻璃瓶中加入500mL去离子水或超纯水，加入1片1:4林格氏片。
- B.3.2 过滤除菌或高压灭菌121°C 15min。
- B.3.3 测量溶液的pH，pH范围应为7.0±0.2。
- B.3.4 如有需要，用1N的盐酸或1N氢氧化钠将pH调到6.8-7.2。
- B.3.5 除菌或灭菌后将其置于室温下，保存6个月。

附录 C

(规范性)

棘阿米巴原液的管理和扩培

C.1 棘阿米巴原液的管理

C.1.1 用棘阿米巴生长培养基Ac#6, 分别培养卡氏棘阿米巴(ATCC 50370)和多噬棘阿米巴(ATCC 30461)。

C.1.2 取1mL低温保存的、浓度约为 1×10^6 cells/mL的棘阿米巴滋养体(从ATCC购买的, 要求3代以内)。

C.1.3 将低温保存管置于 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 水浴中解冻。

C.1.4 将解冻后的棘阿米巴加入到含30 mL生长培养基的组织培养瓶中(75 cm², 中等大小), 在 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下培养3~4天。

C.2 棘阿米巴滋养体的扩培

C.2.1 用上述组织培养瓶中的培养物制备试验用接种物。

C.2.2 轻轻倒出培养基, 以免滋养体脱落。

C.2.3 重新倒入约30mL新鲜的棘阿米巴生长培养基Ac#6。

C.2.4 摇动组织培养瓶, 使滋养体脱落。

注: 如有必要, 用刮刀刮烧瓶底部。

C.2.5 将滋养体轻轻倒入一个50mL的聚丙烯离心管中(大约 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL)。

C.2.6 用血球计数板对离心管内的滋养体计数, 并记录每毫升的细胞数。

C.2.7 从离心管中取 5×10^6 个滋养体, 接种到150/180 cm²(大的)的扁平组织培养瓶中, 当添加棘阿米巴生长培养基至50 mL时, 细胞浓度为 1×10^5 cells/mL。

C.2.8 在组织培养瓶中加入棘阿米巴生长培养基至50毫升。

C.2.9 轻轻混匀组织培养瓶, 将组织培养瓶置于 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 下培养24h。

C.2.10 在此培养条件下, 一个组织培养瓶大约可产出 $1-2 \times 10^7$ 个滋养体。

附录 D
(规范性)
NNA 琼脂的制备

D.1 用途

在恢复生长方法1中，用于制作12孔板内的滋养体恢复生长用的培养基。

D.2 NNA 琼脂的成分。

原液1、原液2和NNA琼脂的成分见表D.1、D.2、D.3。

表D.1 原液1的成分表

原料	用量
NaCl	12.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.40 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.60 g
去离子水/超纯水	至500 mL

表D.2 原液2的成分表

原料	用量
Na ₂ HPO ₄	14.20 g
KH ₂ PO ₄	13.60 g
去离子水/超纯水	至500 mL

表D.3 琼脂 (NNA) 的成分表

原料	用量
原液1	5 mL
原液2	5 mL
去离子水/超纯水	至1000 mL
细菌琼脂粉	15.0 g

D.3 原液1和原液2的制备方法

D.3.1 将原液的各成分分别溶解在大小合适的清洁玻璃容器中，并温和加热。

D.3.2 过滤除菌。

D.3.3 除菌后的原液在冰箱中可储存6个月。

D.4 NNA 琼脂的制备方法

D.4.1 无菌操作，从原液1和2中各取出5mL，并用去离子水或超纯水调至1000mL。将15g琼脂分散到上述溶液中，将其倒入大小合适的干净玻璃容器中，然后慢慢煮沸。将琼脂溶液转移到合适的容器中，121℃高压灭菌15分钟。

D.4.2 在2-8℃的冰箱中储存琼脂，可储存6个月。

附 录 E
(规范性)
大肠杆菌悬液的制备

E.1 大肠杆菌悬液的制备

E.1.1 取一次性使用的、容量为250ml的无菌锥形瓶，加入25ml TSB。接种大肠杆菌(ATCC 8739)后，置于30-35℃、转速为100rpm的摇床上培养过夜。

E.1.2 从摇床上取出含有细菌的锥形瓶，将细菌悬液转移到2个50 mL的离心管中。在20-25℃下，4000 xg离心10min。

E.1.3 弃去上清，向各离心管内加入25mL的1:4林格氏溶液，涡旋重悬。该细菌悬液的浓度大约为 1×10^{10} cells/mL。该大肠杆菌原液在冰箱中可储存30天。

E.1.4 用1:4林格氏溶液，将大肠杆菌原液以1: 8的比例稀释，制备工作菌悬液。在恢复生长方法2中，每孔接种50uL工作菌悬液。

附录 F

(规范性)

大肠杆菌 NNA 琼脂平板的制备

F.1 大肠杆菌 NNA 琼脂平板的制备

F.1.1 在 $>85^{\circ}\text{C}$ 的温度下，融化NNA琼脂。

F.1.2 取恢复生长培养方法1中用到的12孔板，每孔加入2ml NNA琼脂溶液，待其凝固。每孔接种0.1mL大肠杆菌原液。

F.1.3 将12孔板放置在试验台上，在环境温度下放置过夜。长时间储存时，不含大肠杆菌的12孔NNA琼脂板在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下保存1个月；含大肠杆菌的12孔NNA板在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下保存1周，如果超过1周，应在12孔板上重新接种新鲜的大肠杆菌。12孔板不能干，如果孔板内的NNA琼脂干燥或者开裂，应丢弃。

附录 G
(规范性)
中和肉汤的制备

G.1 用途

用于中和多功能接触镜护理液中聚六亚甲基双胍盐酸盐(PHMB)、氯己定、阿立西定、肉豆蔻酰胺丙基二甲胺(MAPD)和聚季铵盐-1的活性。

注1: 根据接触镜护理液中消毒成分的种类和含量的不同, 相应调整中和肉汤。

注1: 该中和肉汤不适用于双氧护理系统。

G.2 中和肉汤的成分

中和肉汤的成分见表G.1。

表G.1

原料	用量
卵磷脂	3.5g
吐温80	1.5g
1:4林格氏片 (如Oxoid BR 0052G)	2片
去离子水/超纯水	至1000mL

G.3 制备方法

G.3.1 将各成分溶解在一个大小合适的干净玻璃容器中, 温和加热。

G.3.2 用1N盐酸或1N氢氧化钠调节pH至 7.4 ± 0.2 。

G.3.3 用量筒或量杯量取去离子水或超纯水, 调节体积至1000mL。

G.3.4 用硼硅酸盐玻璃瓶分装成适宜体积(如250ml), 121°C高压灭菌15min。

G.3.5 灭菌后的中和肉汤在室温下可保存3个月。

附录 H (规范性) 用 Reed 和 Muench 运算方法

H.1 用途

测定滋养体接种物的浓度和测试液中滋养体的浓度。

H.2 Reed 和 Muench 运算方法的原理及实例

H.2.1 方法原理

该方法是Reed和Muench于1938年发表,用于计算实验生物学试验中50%终点。其目的是确定,当血清或病毒接种到试验动物后,50%试验动物发生反应或死亡(LD₅₀)时,对应的血清或病毒的稀释级。在生物学定量试验中,确定终点的最佳方法是,在接近50%反应的稀释级附近,用大量动物进行试验。使用50%终点的原因是,生物学试验中许多剂量-反应呈函数关系,当它在(最小反应,最大反应)的区间时,函数趋于线性关系,因此容易计算出发生50%反应时被测物质的浓度。

此方法主要适用于完整的反应,即死亡率、传染性、细胞病变效应或幸存者的反应范围从0到100%。即使不满足上述条件,只要在稀释范围内,反应以匀速的方式发生,也可以使用该方法。如果结果不稳定,例如在某些稀释级下,死亡或幸存者分布不规律,计算出的终点将不准确。

H.2.2 方法的典型实例

例1,使用具代表性病毒接种动物产生的研究数据,示范方法的使用。在该研究中,根据病毒的10倍稀释级记录动物的死亡率,确定接种病毒的LD₅₀。

c列、d列中的箭头的指向是死亡或存活动物数的累计方向。累计死亡率(g列)表示死亡动物累计数(e列)除以累计总数。如,在10⁻³稀释级,相当于7只试验动物中死亡5只。

例1中,10⁻³稀释级的死亡率在50%以上;10⁻⁴稀释级的死亡率远远低于50%。因此,接种病毒的LD₅₀在的10⁻³和10⁻⁴稀释级之间。LD₅₀的比例距离位于这两种稀释级之间,由下面的h列得到:

示例:

$$\frac{\text{仅高于50\%的死亡率}-50\%}{\text{仅高于50\%的死亡率}-\text{仅低于50\%的死亡率}} = \text{比例距离}$$

$$\text{或者 } \frac{71-50}{71-13} = \frac{21}{58} = 0.36 \text{ (或0.4)}$$

任何两个稀释级之间的距离是稀释倍数的函数,例如10倍稀释,有必要用稀释系数校正(乘以)比例距离,稀释系数是稀释倍数的对数。连续10倍稀释时,稀释系数为1(log10=1),因此被忽略。在接下来的步骤中,稀释系数是负数。所以LD₅₀的负对数值等于仅高于50%的死亡率的负对数值加上校正后的比例距离。在本例中,计算如下:

较低稀释级(死亡率仅大于50%的稀释级)的负对数值=-3.0

比例距离(0.4)×稀释系数(log10-1)=-0.4

LogLD₅₀=(-3.0)+(-0.4)=-3.4

LD₅₀=10^{-3.4}

表H.1

Example of Endpoint Titration

Virus dilution (a)	Mortality ratio (b)	Died (c)	Survived (d)	Accumulated values			
				Total dead (e)	Total survived (f)	Mortality	
						Ratio (g)	% (h)
10 ⁻¹	6/6	^ 6	v 0	17	0	17/17	100
10 ⁻²	6/6	^ 6	v 0	11	0	11/11	100
10 ⁻³	4/6	^ 4	v 2	5	2	5/7	71
10 ⁻⁴	1/6	^ 1	v 5	1	7	1/8	13
10 ⁻⁵	0/6	^ 0	v 6	0	13	0/13	0

H. 2. 3 Reed和Muench改良方法测定微生物浓度

在下面的例子中，该方法用于计算棘阿米巴接种物阳性对照、恢复生长培养基对照、各待测产品中棘阿米巴滋养体的近似浓度。

计算公式见表H.2。

表H. 2 计算公式

累计值					
-log ₁₀ 稀释级 V (mL/孔) (a)	+ 有生长的孔 (b)	- 无生长的孔 (c)	有生长的孔的总数 + (d)	无生长的孔的总数 - (e)	有生长的孔的占比 (%) (f)
1	D1	R-D1	D1+D2+D3+D4+D5+D6	(R-D1)	100×[d/(d+e)]
2	D2	R-D2	D2+D3+D4+D5+D6	(R-D1)+(R-D2)	100×[d/(d+e)]
3	D3	R-D3	D3+D4+D5+D6	(R-D1)+(R-D2)+(R-D3)	100×[d/(d+e)]
4	D4	R-D4	D4+D5+D6	(R-D1)+(R-D2)+(R-D3)+(R-D4)	100×[d/(d+e)]
5	D5	R-D5	D5+D6	(R-D1)+(R-D2)+(R-D3)+(R-D4)+(R-D5)	100×[d/(d+e)]
6	D6	R-D6	D6	(R-D1)+(R-D2)+(R-D3)+(R-D4)+(R-D5)+(R-D6)	100×[d/(d+e)]

D1~D6=每个稀释级下有生长的孔的数量
R=每个稀释级的重复次数
V=mL/孔

$$\text{比例距离[PD]} = \frac{\text{仅大于50\%的生长数}-50}{\text{仅大于50\%生长数}-\text{仅低于50\%生长数}}$$

$$\text{Log}_{10} (50\% \text{细胞浓度}) = \text{Log}_{10} \text{仅大于50\%的稀释级 (a)} + \text{PD} = X$$

$$50\% \text{终点浓度} / (\text{体积} \cdot \text{孔}) = 10^X \text{cells} / (\text{体积} \cdot \text{孔}) = 10^X \text{cells} / V$$

$$10^0 \text{试管中} 50\% \text{终点浓度} / (\text{cells} \cdot \text{mL}) = [(10^X \text{cells} / V) \times (1/V)] = 10^X \times (1/V)$$

注：10⁰试管中50%终点是cells/（体积·孔）：如果在10⁰孔中加入0.2mL的稀释液，50%终点计算的细胞数量是0.2 mL所含的数量。所以，50%终点必须乘以(1/V)或1除以每孔内稀释液的体积。如果每孔加0.2ml，则乘以1/0.2或5。

$$50\% \text{终点} 10^X \text{cells/mL} = \text{近似} 10^X \text{cells/mL}$$

$$\text{log减少值} = \text{log}_{10} (\text{cells/ml})_{\text{接种物}} - \text{log}_{10} (\text{cells/ml})_{\text{试验管}}$$

如果在某稀释级下观察到50%的恢复增长率，即为终点稀释级，此时无需计算。因此，50%终点是50%恢复生长对应的稀释级。

H. 2. 4 代入样本数据计算的例子

用表H.3中的典型数据进行计算举例。

表H. 3 用典型数据进行计算的例子

累计值					
$-\log_{10}$ 稀释级 V (mL/孔) (a)	有生长的孔 (b)	无生长的孔 (c)	有生长的孔的 总数 + (d)	无生长的孔的 总数 - (e)	有生长的孔的 占比 (%) (f)
1	4	0	16	0	100
2	4	0	12	0	100
3	4	0	8	0	100
4	3	1	4	1	80
5	1	3	1	4	20
6	0	4	0	8	0

重复次数=4
mL/孔=1 (方法1)
mL/孔=0.2 (方法2)

仅高于50%的生长数=80

仅低于50%的生长数=20

比例距离[PD]=(80-50)/(80-20)=0.5

$-\log_{10}$ 仅高于50%的稀释级[D]=4

Sum PD+D(log10)=4.5

$[10^{(\text{Sum PD}+D)}]=10^{4.5}=3.16\text{E}+04\text{cells}$

$[10^{(\text{Sum PD}+D)}]\times[1/(\text{mL/孔})]=3.16\text{E}+04\text{cells/mL}$ (10⁰试管中)

附录 I
(规范性)

Spearman-Karber 运算方法

I.1 Spearman-Karber 公式

Spearman-Karber公式见I.1

$$\text{Log Value} = X_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i \quad (\text{I.1})$$

其中:

$X_0 = \log_{10}$ [阳性孔最高稀释级的倒数];

$d = \log_{10}$ (稀释系数);

n_i = 每个稀释液对用的孔数;

r_i = 阳性孔的数量 (勿与 n_i 混淆);

从稀释级 X_0 开始求和。

表I.1给出了电子表格示例, 表I.2给出了计算公式。

表I.1 电子表格示例

	A	B	C	D	E	F
1	Spearman-Karber 运算				$X_0 - d/2 + d(\sum r_i/n_i)$	
2	稀释级	孔的数量 (n_i)	阳性孔 (r_i)	$P = (r_i/n_i)$	运算	值
3	-1	4	4	1	低稀释 (X_0) =1.00	1
4	-2	4	4	1	\log_{10} 稀释因子 (d)	1
5	-3	4	4	1	$d/2$	0.5
6	-4	4	0	0	从最低稀释度开始 计算 P 的总和	3
7	-5	4	0	0		
8	-6	4	0	0	恢复生长	Cells/ml
9				3	3.5	3162.278

表I.2 计算公式

	A	B	C	D	E	F
1	Spearman-Karber 运算				$X_0 - d/2 + d(\sum r_i/n_i)$	
2	稀释度	孔的数量 (n_i)	阳性孔 (r_i)	$P = (r_i/n_i)$	运算	值
3	-1	4	4	$=C3/B3$	低稀释 (X_0) =1.00	$=\text{abs}(A3)$
4	-2	4	4	$=C4/B4$	\log_{10} 稀释因子 (d)	$=\log_{10}(A3*10)$
5	-3	4	4	$=C5/B5$	$d/2$	$=F4/2$
6	-4	4	0	$=C6/B6$	从最低稀释度开始 计算 P 的总和	$=D9$
7	-5	4	0	$=C7/B7$		
8	-6	4	0	$=C8/B8$	恢复生长	Cells/ml
9				$=\text{SUM}(D3:D8)$	$=F3 - F5 + F4 * F6$	$=\text{POWER}(10, E9)$

以上数据为例: $X_0 = 1$

$d = 1$

$d/2 = 0.5$

$n_i = 4$

$r_i = 4$

$$\log \text{ 值}=3.5 \quad \log \text{ 值}=1 - \frac{1}{2} + 1 \sum (4/4)+(4/4)+(4/4)+(0/4)+(0/4)+(0/4)$$

附录 J
(规范性)
96 孔板的培养物显微图

J.1 图像

培养 2 周时拍摄的图片；
采用方法 2(96 孔板法)拍摄的图片；
12 孔板底部有琼脂，会导致图像不那么清晰，除此之外，其图片与方法 1 的相似。
图片在放大 100 倍、200 倍、400 倍下拍摄。

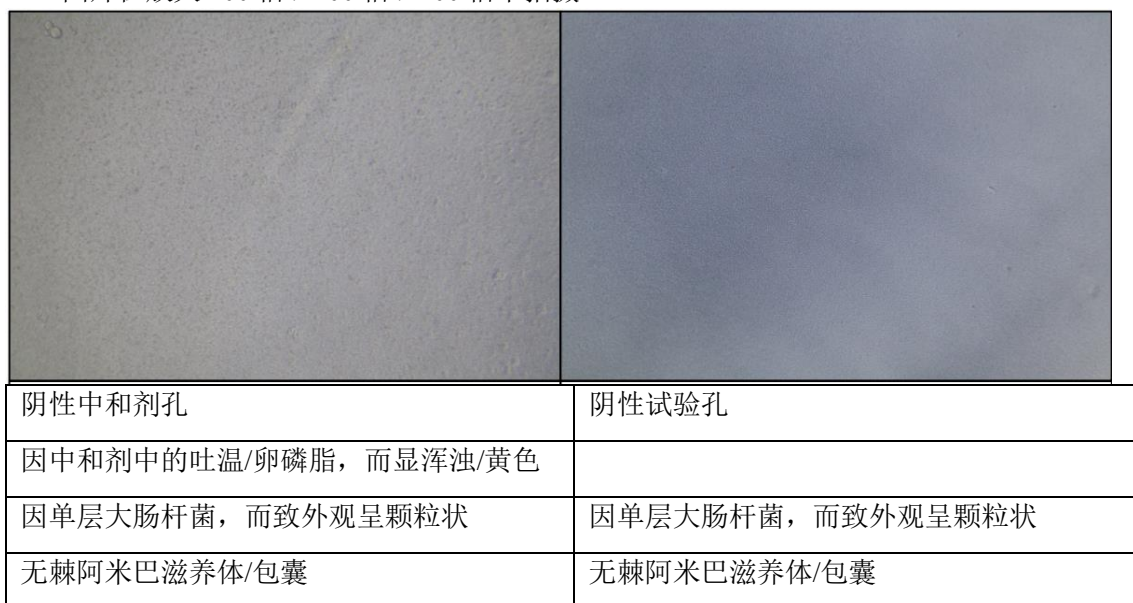


图 J.1 和图 J.2 阴性结果（100 倍下的图片）

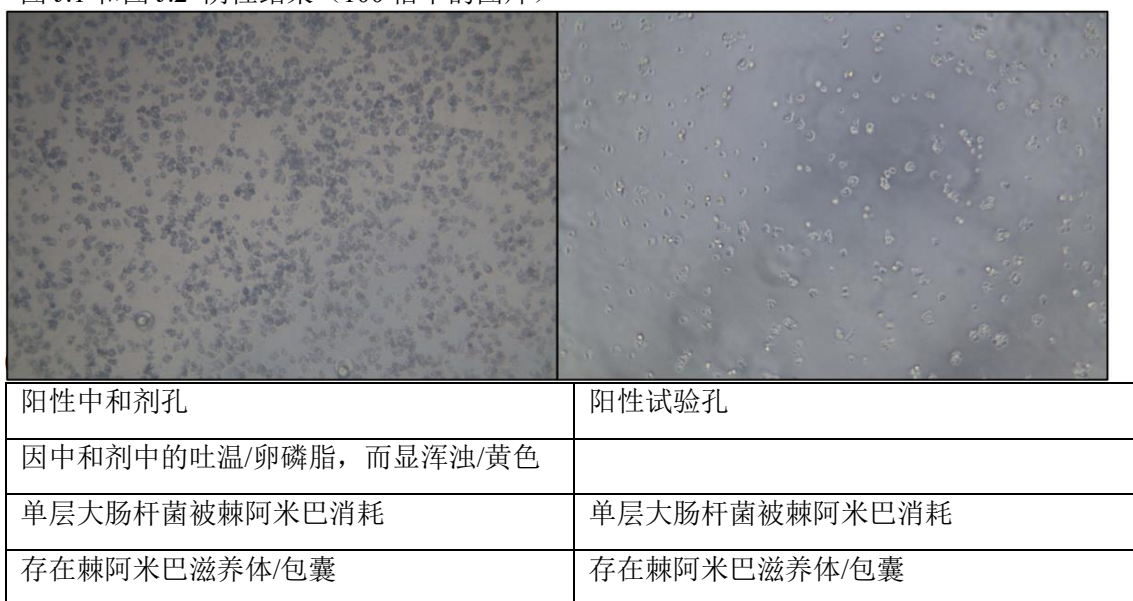


图 J.3 和图 J.4 阳性结果（100 倍下的图片）



	
阴性中和剂孔	阴性试验孔
因中和剂中的吐温/卵磷脂，而显浑浊/黄色	
因单层大肠杆菌，而致外观呈颗粒状	因单层大肠杆菌，而致外观呈颗粒状
无棘阿米巴滋养体/包囊	无棘阿米巴滋养体/包囊

图 J.5 和图 J.6 阴性结果（200 倍下的图片）

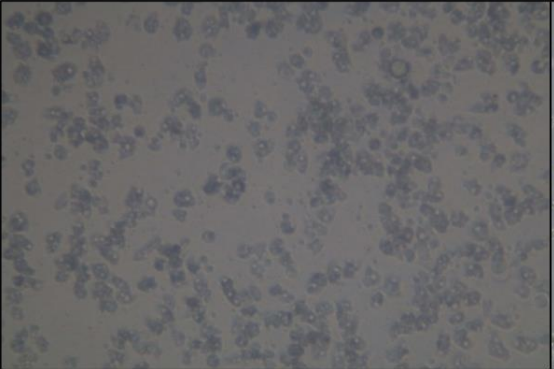


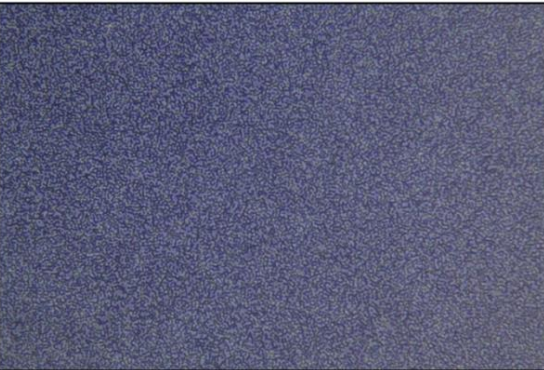
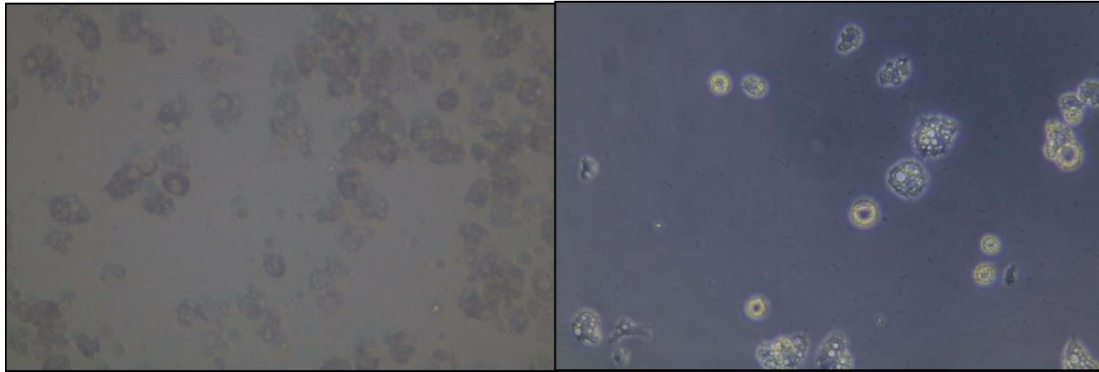
	
阳性中和剂孔	阳性试验孔
因中和剂中的吐温/卵磷脂，而显浑浊/黄色	
单层大肠杆菌被棘阿米巴消耗	单层大肠杆菌被棘阿米巴消耗
存在棘阿米巴滋养体/包囊	存在棘阿米巴滋养体/包囊

图 J.7 和图 J.8 阳性结果（200 倍下的图片）

	
阴性中和剂孔	阴性试验孔
因中和剂中的吐温/卵磷脂，而显浑浊/黄色	

因单层大肠杆菌，而致外观呈颗粒状	因单层大肠杆菌，而致外观呈颗粒状
无棘阿米巴滋养体/包囊	无棘阿米巴滋养体/包囊

图 J.9 和图 J.10 阴性结果（400 倍下的图片）



阳性中和剂孔	阳性试验孔
因中和剂中的吐温/卵磷脂，而显浑浊/黄色	
单层大肠杆菌被棘阿米巴消耗	单层大肠杆菌被棘阿米巴消耗
存在棘阿米巴滋养体/包囊	存在棘阿米巴滋养体/包囊

图 J.11 和图 J.12 阳性结果（400 倍下的图片）

参 考 文 献

- [1] Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50:1-26.
- [2] Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16:273-307.
- [3] Borazjani RN, Kilvington S. Efficacy of multipurpose solutions against *Acanthamoeba* species. *Cont Lens Anterior Eye* 2005;28:169-75.
- [4] Johnston SP, Sriram R, Qvarnstrom Y, et al. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J Clin Microbiol* 2009;47:2040-5.
- [5] Joslin CE, Tu EY, Shoff ME, et al. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 2007;144:169-180.
- [6] Verani JR, Lorick SA, Yoder JS, et al. National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1236-42.
- [7] Kilvington S, Heaselgrave W, Lally JM, Ambrus K, Powell H. Encystment of *Acanthamoeba* during incubation in multipurpose contact lens disinfectant solutions and experimental formulations. *Eye Contact Lens* 2008;34:133-9.
- [8] Ahearn, DG, Gabriel MM. Contact Lenses, Disinfectants, and *Acanthamoeba* Keratitis. *Advances in Applied Microbiology* 1997;43:35-56
- [9] Mowrey-McKee M, George M. Contact Lens Solution Efficacy Against *Acanthamoeba castellanii*. *Eye & Contact Lens* 2007;33(5):211
- [10] Worthington Tissue Dissociation Guide. Worthington Biochemical Corporation. 730 Vassar Ave., Lakewood, NJ 08701. 2013.
- [11] Hughes R, Kilvington S, Comparison of hydrogen peroxide contact lens disinfection systems and solutions against *Acanthamoeba polyphaga*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45, 2038-2043.
- [12] Kilvington S, Lam A. Development of standardized methods for assessing biocidal efficacy of contact lens care solutions against *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2013;54(7):4527-37.
- [13] Reed LJ, Muench HA. Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938;27:493-497.
- [14] Hierholzer JC, Killington RA. Virus Isolation & Quantitation in *Virology Methods Manual*. 1996: p.
- [15] MA Ramakrishnan, M Dhanavelu. Influence of Reed-Muench median Dode Calculation method in *Virology in the Millennium*. *Antiviral Research*. December 2018: p. 16-18.