

安全、便捷技术再生一次性医用口罩的实验研究

宋武慧¹, 潘滨², 阚海东², 徐燕意², 易志刚¹

1.复旦大学医学分子病毒学教育部/卫健委/医科院重点实验室; 2.复旦大学公共卫生学院环境卫生学教研室

摘要: 在防控新型冠状病毒 (2019 novel coronavirus, 2019-nCoV) 疫情中, 为了减少病毒的传播, 一次性医用口罩是普通民众必不可少的防护用品。然而, 随着新型冠状病毒肺炎 (novel coronavirus pneumonia, NCP) 的蔓延, 口罩短缺现象严重。本研究旨在探讨一次性医用外科口罩 (口罩) 的再生方法, 以达到既有个人防护的效果又能节省资源。用流行性感冒病毒模拟 2019-nCoV 污染口罩, 采用常用的恒温烘箱干烤及电吹风机热风处理 2 种方法, 对表面污染有流行性感冒病毒的医用口罩进行病毒灭活, 洗脱口罩上已灭活处理的病毒, 感染 Mardin-Darby 狗肾细胞 (Mardin-Darby canine kidney cell, MDCK 细胞), 观察细胞病变并定量检测病毒基因组拷贝数以评价病毒灭活效果。同时采用抽滤系统和 PM_{2.5} 监测仪对以 2 种相似热灭活方式处理过的口罩滤过截留 PM_{2.5} 的效果进行评价。结果显示电吹风机 30min 热风处理后病毒基因组拷贝数降低至原来的 1/1 000 000~1/10 000 000, 接近未感染组, 但烘箱 56°C 30min 干热处理仅灭活部分病毒。2 种热灭活方式对口罩的 PM_{2.5} 滤过截留效果无显著影响。本研究提供了一个安全、便捷的处理一次性医用外科口罩方法, 为个人防护用品口罩表面污染病毒的灭活及其再生利用提供了科学的依据。然而, 应注意的是在口罩匮乏的非常时期, 普通人群可采用该简便技术再生口罩后再次使用, 但该法不适合用于密切接触患者的人群、医护人员及实验室工作人员。

关键词: 热灭活; 医用口罩; 滤过截留; 流行性感冒病毒; 2019 新型冠状病毒

项目资助: 国家科技重大专项课题 (2017ZX10103009)

通信作者: 徐燕意, 易志刚

Correspondence to: XU Yanyi E-mail: yanyi_xu@fudan.edu.cn; YI Zhigang E-mail: zgyi@fudan.edu.cn

Evaluation of heat inactivation of virus contamination on medical mask

Song Wuhui¹, Pan Bin², Kan Haidong², Xu Yanyi², Yi Zhigang¹

1.Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2.Department of Environmental Health, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: As the outbreak of the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) and continuous spread to almost all the area of China, it is in urgent need of personal protective equipment (PPE). Inactivating contaminated pathogens on the surface of PPE prevents secondary contamination and makes it possible to re-use limited PPE, which may alleviate the great burden of needs of PPE. We assessed the effect of heating by baking or hair dryer on inactivation of influenza virus on the surface of medical mask. We also assessed mask filterability to PM_{2.5} after similar heating processes. Efficiency of inactivation of virus was evaluated by infecting MDCK cells with the rescued virus and quantifying the viral RNA levels in the supernatants from the infected cells. Hair dryer for 30min effectively inactivated virus whereas baking at 56°C for 30min partially inactivated virus. Both Hair dryer and baking did not significantly affect the mask filterability to ambient PM_{2.5}. Herein, we provided a simple method for heat inactivation of virus on the surface of personal protective equipment like medical mask, without damaging the filtration function of the treated masks. It should be noted that in the period that masks are insufficient for whole population, the community people can use this simple technique to regenerate masks for reuse, but this method is not suitable for people who are in close contact with patients, medical staffs and laboratory technicians.

Key words: Heat inactivation; Medical mask; Filterability; Influenza virus; 2019 novel coronavirus

2019年12月在我国武汉出现的不明原因肺炎是由一种新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)感染所致^[1-4]。随后, 2019-nCoV蔓延至全国, 截止2020年2月9日, 已导致37289人感染, 死亡人数达813人。2019-nCoV主要经呼吸道和接触传播, 以聚集性传播尤为严重。呼吸道防护是防控该疾病的关键之一, 可减少二次传播的概率。由于疫情持续蔓延, 口罩等个人防护用品短缺现象严重。目前, 流传许多口罩再生方法, 但大多缺乏科研数据, 未曾证明灭活病毒的效果, 以及灭活病毒处理后对口罩滤过功能的影响。

流行性感冒病毒与2019-nCoV均为有包膜病毒, 理化性质相似, 且均主要经呼吸道传播。本研究以普通一次性医用口罩为例, 用流行性感冒病毒作为模型病毒, 模拟2019-nCoV污染, 采用常用的恒温烘箱干烤和电吹风机热风处理2种方法, 对表面污染有流行性感冒病毒的一次性医用口罩进行处理, 检测热处理对病毒的灭活效果及口罩滤过截留PM_{2.5}效果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

一次性医用外科口罩(ASTM F2100, 等同于YY0469-2011)^[5]。某品牌家用电吹风机(50Hz, 1400W)。流行性感冒病毒H1N1 A/PR8 / 34毒株从美国模式培养物集存库(ATCC® VR-95™)引进; Mardin-Darby狗肾细胞(Mardin-Darby canine kidney cell, MDCK细胞)购自中国科学院上海生命科学研究院, 培养基为含5%胎牛血清的DMEM培养基(购自Gibco公司)。TPCK-胰酶购自Sigma公司。病毒采样管购自友康生物科技有限公司。QIAamp Viral RNA抽提试剂盒购自Qiagen公司(货号: 52904)实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)采用One Step PrimeScript RT-PCR 试剂盒(TAKARA公司, RR064A)。

1.2 病毒灭活

恒温烘箱干热处理: 流行性感冒病毒浓缩液(3.6×10^7 pfu/ml), 各取10 μ L分别滴加于口罩防水层(蓝色)表面3个不同位置(病毒操作在生物安全柜中进行), 滴加病毒的口罩置于锡箔纸上后放入铝质饭盒, 加盖后放入恒温烘箱56°C 30min干热处理。

电吹风热风处理：将滴加有病毒的口罩用保鲜袋包裹，然后在生物安全柜中用电吹风机（最大档）在口罩上方约10~20cm处进行热风处理。

1.3 病毒洗脱及感染

1.3.1 细胞培养 将 0.25 ml MDCK 细胞（ 4×10^5 细胞 / mL）铺板于 48 孔板中培养。

1.3.2 病毒感染 经上述热处理后的口罩，可见病毒滴液斑痕，利用 250 μ L 病毒采样管中的病毒保存液冲吸数次，洗脱病毒至病毒滴液斑痕消失。取 125 μ L 洗脱的病毒悬液并添加 5 μ g/mL TPCK-胰酶，接种于细胞中，37 $^{\circ}$ C 下病毒吸附 1h，然后吸取病毒悬液，用 1mL DMEM 培养液洗涤 2 遍，然后加入新鲜的 1 μ g/mL TPCK-胰酶的 DMEM 培养液。感染 2 天后，观察细胞病变，并收集细胞上清液。

1.4 qRT-PCR 检测病毒 RNA

收集140 μ L感染细胞的上清液，用QIAamp Viral RNA抽提试剂盒抽提RNA（根据试剂盒说明书操作）。50 μ L无RNase的H₂O洗脱。取2 μ L RNA标本，使用One Step PrimeScript RT-PCR试剂盒，利用引物Yi-js-O-97，Yi-js-O-98及FAM标记的TaqMan荧光探针Yi-js-P-1进行qRT-PCR。PCR反应体系如下：12.5 μ L的 2 \times one step RT-PCR缓冲液，0.5 μ L的Ex Taq HS，0.5 μ L的RT Enzyme，7.0 μ L的H₂O，0.8 μ L的Yi-js-O-97 (10 μ mol/L, 终浓度400nmol/L)，0.8 μ L的Yi-js-O-98 (10 μ mol/L,终浓度400nmol/L)，0.4 μ L的Yi-js-P-1荧光探针 (10 μ mol/L, 终浓度200nmol/L)及2.0 μ L RNA样品。反应程序如下：42 $^{\circ}$ C 10min，95 $^{\circ}$ C 10s; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min（同时收集荧光信号），共 40个循环。样本中病毒RNA的相对拷贝数以 $2^{-\Delta Ct}$ 方法进行处理，比值由 $2^{-(\text{处理组}Ct-\text{未处理组}Ct)}$ 公式计算得出。各处理方法相对于未处理感染病毒组为对照。

1.5 口罩滤过截留效率的评价

采用抽滤瓶（蜀牛，GG-17）和PM_{2.5}监测仪（TSI，AM510），评估一次性普通医用口罩的烘干处理对其PM_{2.5}滤过截留效果的影响。将口罩分为4组：①洁净组(未使用过的口罩)；②未处理组（口罩正常使用4h后未作任何处理）；③烘箱处理组（烘箱内56 $^{\circ}$ C 30min干热处理）；④吹风机处理组。将口罩（N=3个/组）严密束缚在抽滤瓶瓶口，使用AM510粉尘仪同时检测口罩正上方和抽滤瓶上嘴出口处的PM_{2.5}浓度，抽滤时间为4h，每隔30min记录PM_{2.5}

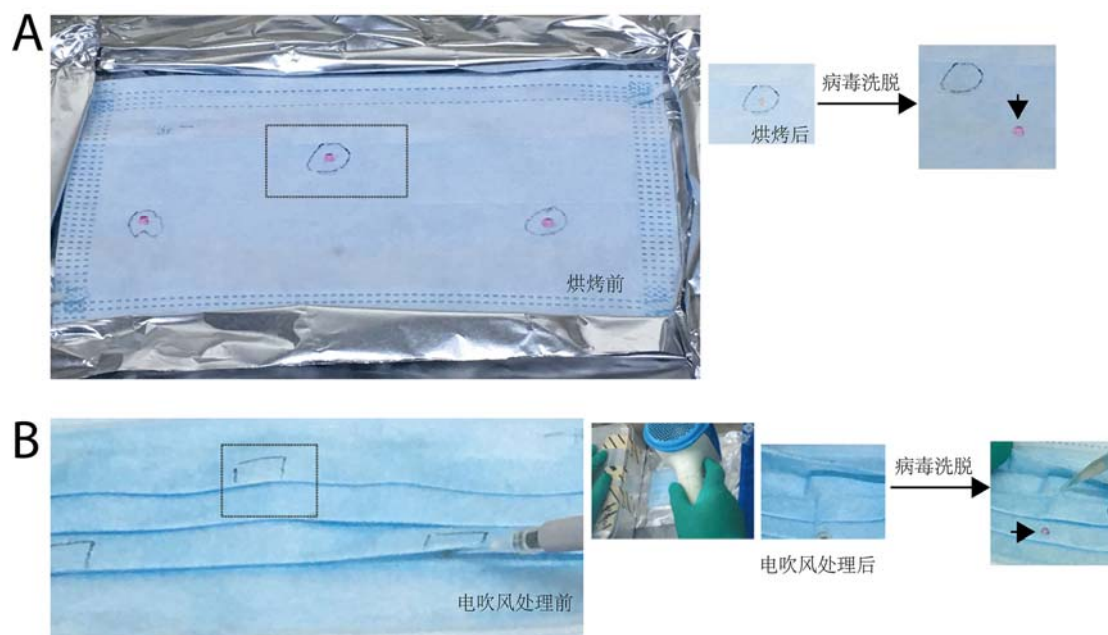
浓度数据，每次重复检测 3 次。

2 结果

2.1 口罩表面的病毒灭活

将一次性医用外科口罩置于锡箔纸上，在口罩蓝色的防水层表面3个不同位置滴加流行性感冒病毒A/PR8悬液（图1A），每个位点滴加10 μ L（含 3.6×10^5 pfu 病毒）。口罩表面的病毒将采用下述2种方法处理（每种方法3个口罩）。

①用普通烘箱干烤：将滴加病毒的口罩（下垫锡箔纸），放入铝盒，加盖后放入普通烘箱，56 $^{\circ}$ C 30min干热处理（56 $^{\circ}$ C 30min通常为灭活血清等标本中病毒的条件），见图1A。干热处理后，口罩表面可见病毒悬液斑痕，由于口罩表面的疏水性，待病毒洗脱后，病毒悬液斑痕溶于洗脱液，斑痕消失（图1A），口罩表面的疏水性无明显改变（图1A，向下箭头所指）。②用家常用电吹风机热风处理：将滴加有病毒的口罩用保鲜袋包裹，在口罩上方约10~20cm处电吹风机加热吹风（最大档），电吹风机热风处理1min 30s 后，风口温度可升至70 $^{\circ}$ C，并持续维持在该温度），热风处理共30min。口罩先用保鲜袋包裹是因为口罩表面疏水性强，不便于热风处理，为防止吹风将沾染的病原体散布，可将10 μ L病毒悬液（含 3.6×10^5 pfu病毒）滴加于口罩的褶皱层中，用保鲜袋包裹，然后加热吹风（图1B）。30min热风处理后，洗脱滴加于口罩的病毒，电吹风机热风处理不影响口罩表面的疏水性（图1B，向右箭头所指）。



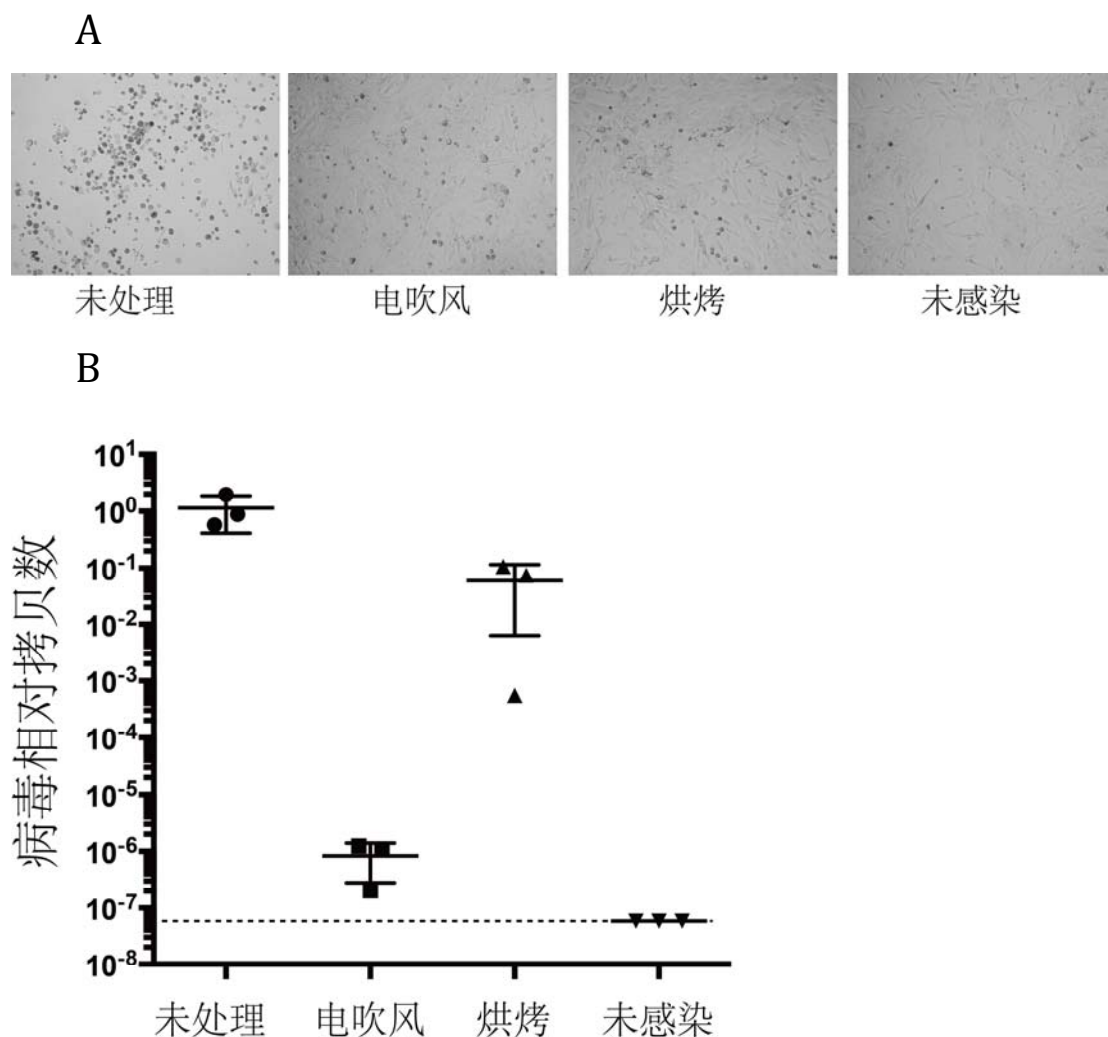
A: 采用烘箱56℃干热处理。B: 采用电吹风机热风处理。

图1 口罩的病毒灭活实验设计。

2.2 电吹风机热风处理灭活病毒的效果优于烘箱干烤

将滴加于口罩上并经灭活方法处理的流行性感冒病毒A/PR8洗脱感染MDCK细胞，观察细胞病变及测定细胞上清液中的病毒基因组拷贝数，分别评价烘箱干烤和电吹风机热风处理灭活病毒的效果。未经灭活处理组的病毒洗脱液接种至MDCK细胞后，细胞出现明显病变；但经烘箱干烤和电吹风机热风处理，洗脱液接种的细胞均未出现明显细胞病变（图2A）。

收集感染细胞上清液，提取RNA，利用qRT-PCR检测病毒基因组拷贝数。电吹风机30min热风处理组的感染细胞上清液中病毒拷贝数降低至原来的1/1000000~1/10000000，接近未感染组水平。然而，烘箱干热处理组感染细胞上清液中的病毒拷贝数降低至原来的1/10~1/100，但仍高于未感染组（图2B），提示病毒未被充分灭活。



A: 感染细胞的细胞病变。B: 感染细胞上清液中病毒基因组RNA拷贝数。利用qRT-PCR进行测定（相对于未处理组的相对拷贝数）(n=3)。

图2 病毒灭活效果评价

2.3 热处理后口罩滤过截留效率不变

为探讨经烘箱干烤和电吹风机热风处理对口罩的滤过截留效率的影响，进一步检测了处理后的口罩滤过截留 PM_{2.5} 的效果（图 3A）。将口罩分为 4 组：①洁净组（未使用口罩）；②未处理组（口罩正常使用 4h 后未作任何处理）；③烘箱干热处理组（烘箱内 56°C 30min 干热处理）；④吹风机热风处理组。将口罩（N=3 个/组）严密束缚在抽滤瓶瓶口，使用 AM510 粉尘仪同时检测口罩正上方和抽滤瓶上嘴出口处的 PM_{2.5} 浓度，抽滤时间为 4h，每隔 30min 记录 PM_{2.5} 浓度数据。

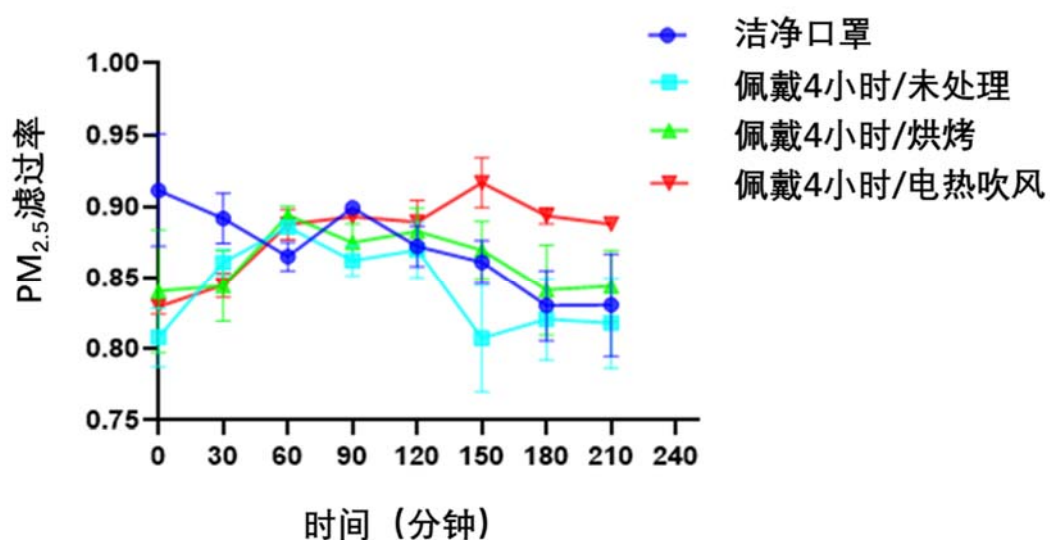
从图 3B 中可见，4 组口罩的 PM_{2.5} 滤过截留效果随抽滤时间的改变而有所

变化，但其改变均不显著。其中，洁净口罩的 $PM_{2.5}$ 滤过截留效率随抽滤时间的增长而略微降低；电吹风机烘干的已使用的口罩 $PM_{2.5}$ 滤过截留效率随抽滤时间的增长略有提升，但不显著；另外 2 组（未处理组和烘箱干烤处理组） $PM_{2.5}$ 滤过效率在 4h 的抽滤过程中略有波动，但基本保持稳定。如图 3C 所示，4h 内口罩的平均 $PM_{2.5}$ 滤过效率表明，使用前、后的口罩滤过截留 $PM_{2.5}$ 的效率基本无变化，而烘箱或吹风机加热处理后的口罩 $PM_{2.5}$ 滤过截留效率也基本无改变，整体维持在 85% 左右。结果提示，烘箱或电吹风机烘干处理基本不会影响普通一次性医用口罩滤过截留大气细颗粒物的效率。

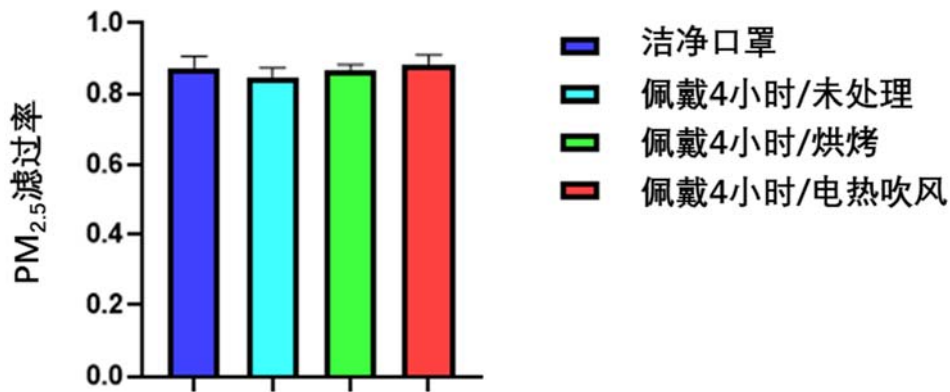
A



B



C



A: 实验装置, 将口罩严密束缚在抽滤瓶瓶口, 用 AM510 粉尘仪同时检测口罩正上方和抽滤瓶上嘴出口处的 PM_{2.5} 浓度, 抽滤时间为 4h, 每隔 30min 记录 PM_{2.5} 浓度。B: 口罩的 PM_{2.5} 滤过截留效果随抽滤时间的改变情况, Two-way ANOVA。C: 4 组口罩抽滤 4h 的平均 PM_{2.5} 滤过截留效率, One-way ANOVA。利用抽滤瓶和 AM510 粉尘仪分别检测洁净组、未处理组、烘箱干烤处理组和电吹风机热风处理组 4h 抽滤过程中大气 PM_{2.5} 的滤过截留效率。

图 3 口罩滤过截留效果评价

3. 讨论

个人防护用品灭活其表面潜在的病毒后再利用可以节省资源, 减少二次传播。2006 年台湾地区 NIOSH 曾对 N95 等几种口罩的重复利用做过报道, 认为 70°C 30min 干热及 250nm 紫外线照射可杀灭大肠埃希菌而不损坏口罩本身, 可以重复利用 (https://labor-elearning.mol.gov.tw/co_report_detail.php?rid=115)。报道发现, 有机溶剂, 如酒精、湿热等, 均会损伤滤膜, 不宜使用。最近, 北京大学报道了用微波炉处理再生口罩的实验 (https://www.sohu.com/a/370944754_803988), 但考虑到有些口罩含有金属条, 处理前需先去口罩的金属丝, 处理后再将金属丝复位。此外, 各种报道的口罩再生方法是否影响滤过截留功能以及对病毒的灭活效果有待实验验证。

再生一次性医用口罩的方法, 还需要考虑以下方面的因素, 既不能影响过滤效率, 还必须去除其可能沾染的病原体, 且尽可能地方便操作。医用外科口罩由 3 部分组成, 从外到内分别由蓝色的防水层、中间的过滤层及白色的无

纺织舒适层。为评价口罩经热处理对其过滤效率的影响，首先，我们测试了处理前、后口罩对 PM_{2.5} 的滤过截留效果。由于医用外科口罩并不能阻挡纳米级的病毒，采用了 PM_{2.5} 的滤过截留效果作为参考。结果未观察到热处理对口罩 PM_{2.5} 滤过截留效果的影响。由于用过的医用外科口罩上可能沾有病原体，为了模拟新型冠状病毒，我们依据流行性感冒病毒与新型冠状病毒都有包膜等相似理化性质，以污染有流行性感冒病毒的医用外科口罩作为模型，用常用的热灭活方式（烘箱内 56°C 30min 干热处理和比较有普及性及简便的家用电吹风机 30min 热风处理），评价 2 种其对病毒的灭活效果。结果显示，电吹风机 30min 热风处理后病毒拷贝数降低至原来的 1/1 000 000~1/10 000 000，接近未感染水平。由于本研究中使用了高剂量的病毒悬液，电吹风机 30min 热风处理后仍然检测到病毒 RNA，可能为感染后未完全洗涤干净的病毒残留（我们认为病毒已全部灭活）。但烘箱 56°C 30min 干热处理仅降低病毒拷贝数至原来的 1/10~1/100，显示未能完全灭活病毒（图 2B）。处于生物安全考虑，我们进行烘箱干热处理时，口罩置于封闭铝质饭盒内，可能会影响饭盒内口罩表面的实际温度，适当延长干烤时间可能有更好的效果，或口罩如直接放置于烘箱内可能效果更佳。因此提示，用于热灭活病原体时需要考虑热灭活的穿透性能。

为解决当前普通医用口罩短缺的问题，课题组通过滤过截留及病毒灭活实验，检验了用热处理进行普通医用口罩的再生利用，将用过的口罩用保鲜袋包裹（防止吹风将沾染的病原体散布），用家用简便电吹风机 30min 热风处理即可安全、有效地再生医用外科口罩。目前我们尚未测试一次性医用外科口罩最多可再生几次，有关研究正在进行中。

然而，值得指出的是：在口罩匮乏的非常时期，普通人群可采用该简便技术再生口罩后再次使用，但该法再生的个人防护用品不适合用于密切接触患者的人群、医护人员及实验室工作人员。

致谢：感谢实验参与人员在短期内完成上述工作；感谢闻玉梅院士给予的指导！

参考文献

- [1] Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [2] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- [3] Chen L, Liu W, Zhang Q, Xu K, Ye G, Wu W, Sun Z, Liu F, Wu K, Zhong B, Mei Y, Zhang W, Chen Y, Li Y, Shi M, Lan K, Liu Y. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 313-319.
- [4] Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, Ren R, Leung KSM, Lau EHY, Wong JY, Xing X, Xiang N, Wu Y, Li C, Chen Q, Li D, Liu T, Zhao J, Li M, Tu W, Chen C, Jin L, Yang R, Wang Q, Zhou S, Wang R, Liu H, Luo Y, Liu Y, Shao G, Li H, Tao Z, Yang Y, Deng Z, Liu B, Ma Z, Zhang Y, Shi G, Lam TTY, Wu JTK, Gao GF, Cowling BJ, Yang B, Leung GM, Feng Z. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia [J]. *N Engl J Med*, 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [5] ASTM International. Standard specification for performance of materials used in medical face masks [S/OL]. ASTM, 2018.
<https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/F2100-11.htm>.