



生物安全实验室病毒悬液灭活试验方法标准转化研究

邓阿妹¹, 魏 凤¹, 吴 佳², 马海霞², 袁志明²

(1. 中国科学院武汉文献情报中心, 武汉 430071; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

【摘要】 化学消毒剂常用于病毒的灭活和实验室环境的消毒, 其对病毒灭活的效果及评价直接影响实验室的生物安全。鉴于目前我国尚缺乏对化学消毒剂杀病毒效果的评价标准, 本文在对欧盟现行的化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验标准的研究分析的基础上, 结合我国生物安全实验室的管理现状, 提出了欧盟现行标准转化的方案。建议以包括高致病性病毒的替代病毒在内的6种病毒作为试验用的模式病毒, 同时增加残留化学消毒剂的去除方法和试验结果95%置信区间计算方法内容。该建议提高了标准的科学性和可操作性, 并为我国实验室消毒灭菌标准制定提供了参考。

【关键词】 病毒灭活; 化学消毒剂; 生物安全; 标准; 定量悬浮试验; 杀病毒效果评估

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0027-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.006

Transformation and standardization of the inactivation test method for virus suspension in biosafety laboratory

DENG A-mei¹, WEI Feng¹, WU Jia², MA Hai-xia², YUAN Zhi-ming²

(1. Wuhan Library, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

【Abstract】 Chemical disinfectants are generally used for virus inactivation and environment disinfection in biosafety laboratory, and the efficacy and evaluation of the disinfection are critical to ensure the laboratory biosafety. However, there is a current lack of applied standard to evaluate the virucidal efficacy of chemical disinfectants in our country. In this paper, a European Union standard “*Method and Requirements of Virucidal Quantitative Suspension Test Method for Chemical Disinfectants Used in Human Medicine*” was analyzed and a standard transformation scheme has been proposed. It is suggested that the model viruses should be increased from 3 to 6, including the surrogate viruses to substitute highly pathogenic viruses, and that the method to remove the residual chemical disinfectant and the calculation of 95% confidence interval should be incorporated into the standard. The suggestion will improve the scientific and operational standards related to disinfection and sterilization in biosafety laboratory in China.

【Key words】 Virus inactivation; Chemical disinfectant; Biosafety; Standard; Quantitative suspension test; Virucidal effect evaluation

生物安全实验室活动涉及对包括病毒在内的多种高致病性病原微生物的操作和研究。采取消毒措施对被病毒污染的环境、仪器设备、实验废弃物及人体表面的消毒是避免实验室工作人员感染

【基金项目】 “十二五”国家卫生行业专项项目(2012ZX10004403); 国家自然科学基金项目(71103178); 中国科学院优秀人才择优支持项目; 武汉市科技项目“武汉市新发传染病与生物安全重点实验室”(201261638501)。

【作者简介】 邓阿妹(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 标准情报的研究与分析。E-mail: dengam@mail.whlib.ac.cn。

【通讯作者】 袁志明, E-mail: yzm@pentium.whiov.ac.cn。

和病毒向实验室外环境泄露的重要手段。消毒方法不当极易造成人员的感染和病毒的传播,从而导致极其严重的生物安全事故。2004 年北京发生了实验室 SARS 冠状病毒感染事件。事后查明,是由于采用未经论证和效果验证的非典病毒灭活方法,在不符防护要求的普通实验室内操作冠状病毒感染材料造成的^[1]。因此,做好消毒工作对于生物安全实验室的正常运行和人员的生命安全具有非常重要的意义。

利用化学消毒剂对病毒污染物进行消毒需要对病毒灭活的效果进行正确、科学的评价。目前,国际上主要采用病毒悬液灭活试验法和病毒载体灭活试验法在实验室条件下对化学消毒剂的杀病毒活性进行检测和评估,其中病毒悬液灭活试验法因操作相对容易而成为最常使用的方法^[2-4]。病毒悬液灭活试验法是在实验室中模拟实际使用条件对化学消毒剂杀病毒悬液的活性进行测试和验证,其结果可作为实际生活中选择化学消毒剂和评估杀病毒效果的主要参考依据。一些国家已将该方法作为标准推出以规范对该方法的使用,如欧盟标准 NF EN 14476 “化学消毒剂和防腐剂—人类医学中化学消毒剂和防腐剂的杀病毒定量悬浮试验—试验方法和要求”就是一个在欧盟被广泛使用、同时也被国际社会接受的标准。随着科学技术的进步和研究的深入,人们对于病毒性质和传播机制的了解逐步加深,这为病毒悬液灭活试验方法标准的改进和优化提供了有利条件。

基于中法生物安全标准化领域的研究与合作,本研究针对化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验这一方法标准开展相关分析和研究,希望通过调研和追踪该方法的最新研究进展发现标准存在的不足,并提出改进建议,为我国制定杀毒灭菌相关标准提供参考。

1 研究目标和方法

本研究的研究目标有 3 点:(1)对法国欧盟标准 NF EN 14476 “化学消毒剂和防腐剂—人类医学中化学消毒剂和防腐剂的杀病毒定量悬浮试验—试验方法和要求(第 2 阶段第 1 步)”^[5]的内容进行深入分析。该标准由欧盟委员会于 2005 年发布并被法国转化为国家标准。在内容上,该标准包括了“范围”、“规范性引用标准”、“术语和定义”、“试验要求”、“材料和试剂”、“试验方法”、“用于指定

病毒的试验程序”、“试验数据的计算”、“试验结果的表示”和“附录”等 10 个部分。通过对标准内容的深度分析,全面掌握标准涉及的关键信息;(2)通过检索分析的方法,利用 Web of Science 数据库对相关论文进行检索。Web of Science 数据库收录了从 1970 年至今的 8000 多种世界范围内最具有影响力的、经同行专家评审的高质量的期刊。本研究利用“disinfectant”、“virus inactivation”、“virucidal activity”、“quantitative suspension test”等关键词对该数据库中 2005 至 2015 年 10 年间全球发表的消毒灭菌相关论文进行检索。通过文献调研的方法对检索到的科技文献加以深度分析和研究,联合专家咨询的方法以期详细掌握化学消毒剂杀病毒悬液试验方法的研究进展。(3)掌握化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验方法标准在相关国家的应用状况。

通过以上 3 个目标的研究和分析,将掌握的该领域的研究进展与法国欧盟标准 NF EN 14476 开展比对分析,结合对标准实际应用情况的调研,对标准的内容给出改进和完善的建议。

2 标准 NF EN 14476 内容解析

标准 NF EN 14476 规定了化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验的方法和最低要求,篇幅较长、内容较多、信息量大。需对内容的关键信息进行总结和提炼,以便于同文献中的相关信息进行比对分析。现将该标准内容的关键信息及特点进行总结,如表 1。

标准 NF EN 14476 从制定到现在已过去 10 多年,上述表中涉及的一些技术和方法是当时科学研究所取得的成果,代表着当时科学技术的水平,该标准的提出和制定也是根据当时的科学研究的状况和实际的需求。随着时代的发展和科技的进步,该标准涉及的方法和技术是否落后?该标准是否还适用于当今的科学研究?是否能满足当今实际工作的需要?这些都是必须思考的问题。

3 标准 NF EN 14476 的分析和优化

根据对文献信息的深度挖掘和分析,化学消毒剂杀病毒悬液试验方法在试验模式病毒的种类、试验病毒的替代病毒、残留化学消毒剂的去除方法、对照和对比试验的设置及试验结果的计算和分析等方面均取得了新的研究进展和成效。针对标准 NF EN 14476,可以在这些方面对其进行优化,下面展开具体论述。

表 1 法国欧盟标准 NF EN 14476 内容关键信息总结

章节	关键信息	要求
范围	化学消毒剂的使用状态 化学消毒剂的适用范围 干扰物质	用硬水或水稀释形成的均一稳定的液体形态 仪器设备、手和表面的消毒 牛血清白蛋白和红细胞
材料和试剂	试验病毒的种类 试验病毒的浓度 消毒剂的配制 消毒剂的浓度设置	腺病毒、脊髓灰质炎病毒和细小病毒 不低于 10^8 TCID ₅₀ /mL 配制浓度应为使用浓度的 1.25 倍 2 个使用浓度和 1 个无效浓度
试验方法	试验温度 反应混合物体系 残留消毒剂活性去除方法 病毒滴度的测定方法	化学消毒剂: $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 化学-热消毒: $40^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 1 mL 干扰物质 + 1 mL 试验病毒悬液 + 8 mL 试验消毒剂溶液 物理稀释法和分子筛法 量子试验法和空斑试验法
结果的计算	计算方法 试验消毒剂合格的条件	$\log N_0 - \log N_x$ $\log N_0 - \log N_x \geq 4$

注: N_0 : 未经消毒剂处理的阳性病毒对照的滴度值; N_x : 消毒剂处理的病毒滴度值

表 2 法国欧盟标准 NF EN 14476 试验模式病毒优化前后对比

优化前的试验模式病毒(毒株)		优化后的试验模式病毒(毒株)	
化学消毒剂	类型 1 脊髓灰质炎病毒(LSc-2ab) 类型 5 腺病毒(Adenoid 75)	化学消毒剂	类型 1 脊髓灰质炎病毒(LSc-2ab) 类型 5 腺病毒(Adenoid 75) VACV(Elstree) BVDV(NADL) SV 40(777)
化学-热消毒	牛细小病毒(Haden)	化学-热消毒	牛细小病毒(Haden)

3.1 试验模式病毒的种类分析

在实验室环境下进行化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验时,设定试验的模式病毒非常必要。由于病毒种类繁多、性质各异,任何实验室都无法达到条件来测试所有消毒剂对全部已知病毒的杀灭活性,因此需采用模式病毒进行试验。试验模式病毒需具备安全性高、稳定性高、可操作性强、易增殖等特点。目前,世界上对于模式病毒没有统一的规定,各国都在积极寻找各种核酸类型的病毒作为试验的模式病毒。

标准 NF EN 14476 规定的试验模式病毒有 3 种,分别是作为无包膜 RNA 病毒类代表的类型 1 脊髓灰质炎病毒(毒株为 LSc-2ab)、作为无包膜 DNA 病毒类代表的类型 5 腺病毒(毒株为 adenoid 75 和 ATCC VR-5)和作为耐热病毒类代表的牛细小病毒(毒株为 Haden 和 ATCC VR-767)。根据有无包膜结构,病毒分为包膜病毒和无包膜病毒两大类。包膜结构对化学消毒剂比较敏感,一般认为,无包膜病毒对化学消毒剂的抵抗力强于包膜病毒,如果化学消毒剂对无包膜病毒具有杀灭活性,那么它对包膜病毒也应具有杀灭活性。但是,由于病毒性质的巨大差异,事实情况却并非如此,例如,含乙醇或甲醛的消毒剂可将无包膜的脊髓灰质炎病毒灭活,却不能将包膜病毒 SV40 灭活。事实上,除了无包膜

病毒之外,包膜病毒也可以作为试验的模式病毒。痘苗病毒(VACV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和猴多瘤病毒 40(SV40)拥有模式病毒要求的诸多特点,具备作为模式病毒的潜力。为此,研究者们开展了大量的研究工作,从实践上证明了这 3 种包膜病毒作为模式病毒的可行性^[6-11]。

标准 NF EN 14476 仅将无包膜病毒作为试验的模式病毒,忽视了包膜病毒作为模式病毒的必要性,从这一点来说,该标准不够科学和严谨。因此,应对标准 NF EN 14476 的试验模式病毒的种类进行扩充,在已有模式病毒的基础上将 VACV、BVDV 和 SV40 作为评估化学消毒剂对包膜病毒杀灭活性的模式病毒。标准 NF EN 14476 试验模式病毒优化前后对比见表 2 所示。

3.2 试验病毒的替代病毒分析

在实际生活中,存在一些如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、诺如病毒、SARS 冠状病毒(SARS-CoV)等流行度高、致病性强、危害性大的病毒,给人类的健康造成了极大威胁。实验室条件下检验化学消毒剂对这类高危病毒的杀灭活性时,仅使用模式病毒是不够的。直接利用这些病毒作为试验病毒理论上是最科学的,但是,由于这些病毒具有极强的感染性和致病性,而且还存在体外增殖困难的缺点,在实际操作上是不可行的。为

表 3 化学消毒剂杀病毒活性的试验病毒与替代病毒

试验病毒(英文缩写)	替代病毒(英文缩写)
乙型肝炎病毒(HBV)	鸭乙型肝炎病毒(DHBV)
丙型肝炎病毒(HCV)	牛病毒性腹泻病毒(BVDV)
人诺如病毒	鼠诺如病毒(MNV);猫杯状病毒(FCV)
SARS 冠状病毒(SARS-CoV)	牛冠状病毒(BCV);禽传染性支气管炎病毒(IBV)
痘苗病毒(VACV)	改良安卡拉痘苗病毒(MVA)

了解决这些问题,学者们开展了替代病毒的研究,以期发现或改造一些与这些病毒结构和属性类似、对人体不致病或致病性较弱且易于体外增殖的病毒来代替高致病性病毒开展试验。研究者们发现,可用鸭乙型肝炎病毒(DHBV)代替 HBV^[12]、用 BVDV 代替 HCV^[13]、用鼠诺如病毒(MNV)或猫杯状病毒(FCV)代替人诺如病毒^[14,15]、用牛冠状病毒(BCV)或禽传染性支气管炎病毒(IBV)代替 SARS-CoV^[16]开展化学消毒剂对以上高危病毒杀灭活性的试验。另外,虽然要求试验模式病毒对人体应具有安全性,但实际上,一些模式病毒仍可以使人体致病,寻找更加安全的模式病毒替代它们也是研究者们关心的问题^[17]。改良安卡拉痘苗病毒(MVA)是痘苗病毒经过人工改造后的变体,丧失了对人体的感染能力。有研究表明,改良安卡拉痘苗病毒可以作为痘苗病毒理想的替代物^[18]。目前,研究者们还没有寻找到合适的病毒来替代脊灰病毒作为模式病毒,这将是未来研究工作需要解决的问题。标准 NF EN 14476 没有涉及试验病毒的替代病毒,有必要依据以上研究结果对其进行补充和完善。以上病毒及替代病毒总结如表 3。

3.3 残留化学消毒剂的去除分析

试验过程中残留的化学消毒剂会使细胞培养物中毒,导致试验结果的可靠性降低,因此有必要将其去除。标准 NF EN 14476 中,对毒性较低的化学消毒剂采用稀释法将其去除,对毒性较高且稀释法无法取得理想效果的化学消毒剂,采用 Sephadex™ LH-20 凝胶过滤技术将其去除。标准 NF EN 14476 涉及的这两种方法在实际应用上都存在缺陷。由于化学消毒剂种类繁多、性质复杂,对毒性较低的化学消毒剂仅采用稀释法往往达不到预期的去除效果,且稀释过程还会延长化学消毒剂和病毒的接触时间。另外,利用 Sephadex™ LH-20 凝胶去除毒性较高的化学消毒剂也存在以下两点弊端:(1)去除过程耗时长,至少需要 2 min 甚至更长时间,这明显延长了病毒与化学消毒剂的接触时间;(2)适用化学消毒剂的范围较小,仅适用于少数的化学消毒剂,对大部分的化学消毒剂都不适用。

鉴于以上问题,有学者建议采用中和稀释法去除低毒性的化学消毒剂,即先用中和剂中和,再用稀释法进行连续稀释,即可实现残留化学消毒剂的有效去除^[19]。此外,法国学者介绍了两种新型凝胶 Sephadex™ G-10 和 Sephadex™ G-25 在去除高毒性化学消毒剂上的应用,这两种凝胶相比 Sephadex™ LH-20 凝胶具有明显优势,不仅适用于绝大多数的化学消毒剂,而且去除过程仅需 1 min,另外,使用成本也较低^[20]。

标准 NF EN 14476 在残留化学消毒剂去除上仅涉及两种物理方法,且这两种方法在使用上均存在缺陷。因此,应对标准 NF EN 14476 的该部分内容进行补充和完善,在兼顾物理方法和化学方法的同时,还应考虑两种新型凝胶 Sephadex™ G-10 和 Sephadex™ G-25 的应用。

3.4 对照和对比实验的设置分析

为了试验结果的可靠性和真实性,也为了便于对意外结果的分析,在试验过程中需设置多组对照和对比试验。就化学消毒剂杀病毒定量悬浮试验来说,需设置的对照实验包括评估化学消毒剂杀病毒活性的病毒对照实验、评估干扰物对病毒感染性影响的实验、评估干扰物对细胞影响的实验、评估化学消毒剂对细胞毒性的实验、评估稀释过程对病毒感染性影响的实验及甲醛对照实验。标准 NF EN 14476 虽在部分章节零星地提到了对照实验的设置,但缺少对这些对照进行系统性的归纳,且描述也不够详尽和全面,使标准的使用者对需要设置哪些对照实验及如何设置没有一个很清晰的理解。因此,应考虑在标准 NF EN 14476 内容上设立一个单独章节,对所需的对照实验进行系统条理的归纳和总结,并对设置方法做详细的说明,使标准的使用者能够快速准确地理解并掌握对照实验的设置方法。

3.5 试验结果的计算分析

标准 NF EN 14476 要求,对试验结果进行计算时,只需计算出未经化学消毒剂处理的病毒阳性对照的滴度对数值($\log N_0$)和反应混合物在各接触时间点的病毒滴度的对数值($\log N_x$),根据两者的差值

($\log N_0 - \log N_x$) 对结果进行分析和判断。如果该差值不低于 4 说明试验化学消毒剂对试验病毒具有杀灭活性,该化学消毒剂实验室试验合格;反之则说明试验化学消毒剂对试验病毒不具有杀灭活性,该化学消毒剂实验室试验不合格。但是,由于每次试验存在随机误差,仅计算病毒滴度的对数值是不够的。研究者越来越倾向于对实验结果置信区间的计算^[21]。基于置信区间的结果分析能够真正地反映化学消毒剂实际杀病毒活性的不确定度,使试验结果更加科学、严谨、可信。标准 NF EN 14476 对试验结果的计算要求较简单,不够科学严谨。因此,对标准 NF EN 14476 该部分内容进行补充和完善时,应要求每次试验不仅需计算出病毒的滴度值,还需对结果进行 95 % 置信区间的计算。

4 对我国相关生物安全工作的启示与建议

根据以上研究,针对我国相关的生物安全工作,给出以下建议:(1)重视生物安全实验室消毒灭菌技术方法标准和消毒灭菌效果评价方法标准的制订,完善生物安全实验室消毒灭菌方法及评价体系。不仅需要制定针对不同危险等级病毒的多种消毒灭菌方法,还需考虑空气、管道、仪器设备、防护服等被病毒污染的介质的消毒灭菌的特殊要求。建立健全消毒灭菌效果评价方法体系,指导化学消毒剂科学、合理、安全的使用,规范消毒灭菌方法的正确实施。此外,应加强对实验室工作人员消毒灭菌方法技术的培训和指导,增强工作人员的安全防范意识,提高个人的安全防护知识水平和突发事件处理技能。管理者应不断完善实验室生物安全防范措施,强化生物安全管理能力,提高生物安全管理水平。(2)加强顶层设计,统筹规划和协调,重视建立生物安全技术的研发体系,提高我国生物安全技术的研发水平和生物安全产品的国际竞争力。首先应加强生物安全领域的基础研究,包括病毒基本性质和传播致病机制的研究、环境风险的起因和性质研究、风险评估和风险管理的技术研究、实验室安全操作的技术研究、病原微生物专用检测技术及专用检测设备的研究等。此外,还应重视对高等级生物安全技术的研发,包括高致病性病原体隔离与防护技术的研究,比如结构气密性、风量控制、差压控制等技术的研究;化学淋浴消毒和连续消毒等新型消毒方法及消毒效果评价的技术研究;正压防护服、呼吸防护装置等高等级生物防护装备系统的

研究等。(3)加强生物安全的国际合作与交流,了解世界生物安全的发展动态和趋势,吸取国际生物安全事件的惨痛教训,吸收和引进国际先进的生物安全技术和方法。学习和借鉴国外在管理、监测、评估等方面的成功经验,提升我国的生物安全管理能力。加强对外宣传,树立我国生物安全管理的良好形象,保障我国生物技术从研究开发到生产应用对外合作的广泛开展。根据生物安全技术发展的特点和趋势,结合我国国情,规划我国生物安全的发展战略、优先行动和重点项目,以完善我国的生物安全体系和提升我国生物安全的国际化水平。

5 总结

本研究针对法国欧盟标准 NF EN 14476 内容的改进和完善开展了分析和研究工作,根据研究结果,对标准的内容给出以下几点优化建议:

(1)原标准中试验模式病毒的种类可由 3 种(脊灰病毒、腺病毒和牛细小病毒)增加至 6 种(脊灰病毒、腺病毒、痘苗病毒、牛病毒性腹泻病毒、猴多瘤病毒和细小病毒),以满足病毒对化学消毒剂抵抗力多样性的试验需求;

(2)在原标准的基础上,可增加实验危险病毒的替代病毒选项,增加试验方法的灵活性、适应性、实用性和安全性;

(3)原标准提到的残留化学消毒剂去除方法已经不太适用于当前复杂多变的病毒环境和日益增多的各式化学消毒剂制品,建议在原标准单纯物理稀释法的基础上增加化学中和方法,并考虑两种方法的融合交叉使用。此外,建议使用两种新型凝胶技术 Sephadex™ G-10 和 Sephadex™ G-25 对残留的高毒性化学消毒剂进行去除;

(4)在原标准的基础上可增加全面且详细的对照和对比实验信息,如评估化学消毒剂杀病毒活性的对照实验、评估干扰物对病毒感染性影响的对照实验、评估干扰物对细胞影响的对照实验、评估化学消毒剂对细胞毒性的对照实验、评估稀释过程对病毒影响的对照实验及证明试验病毒适用性的甲醛对照实验,以增强试验体系的科学性和严谨性;

(5)在试验结果的计算和分析方面,建议在原标准方法的基础上增加对试验数据的 95 % 置信区间的计算,以提高结果分析的准确性和科学性。

上述的分析研究结果将为我国制定符合国家发展状况、先进的消毒灭菌方法标准提供借鉴和参

考,以促进我国的生物安全标准化水平,帮助我国生物安全技术和水平管理的进一步提高。因此,我国不仅要加强生物安全相关技术的研发和应用布局,也应及时对现有标准进行内容更新和完善,将最新的研究成果加以应用和推广,满足我国当前生物安全技术的需求。

参考文献:

- [1] 李俊勇, 赵文红, 杨智明. 吸取 SARS 实验室感染教训预防鼠疫实验室感染发生 [J]. 医学动物防制, 2006, 22(2): 85 - 86.
- [2] 帖金凤, 张文福. 病毒灭活检测技术的研究进展 [J]. 中国消毒学杂志, 2005, 22(4): 450 - 452.
- [3] Sattar SA, Springthorpe VS, Adegbunrin O, et al. A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides [J]. J Virol Methods, 2003, 112: 3 - 12.
- [4] Moce-Llivina L, Papageorgiou GT, Jofre J. A membrane-based quantitative carrier test to assess the virucidal activity of disinfectants and persistence of viruses on porous fomites [J]. J Virological Methods, 2006, 135: 49 - 55.
- [5] AFNOR, 2007. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/ Step 1) [S]. NF EN 14476: 2005 + A1; 2007
- [6] Kampf G, Steinmann J, Rabenau H. Suitability of vaccinia virus and bovine viral diarrhea virus (BVDV) for determining activities of three commonly-used alcohol-based hand rubs against enveloped viruses [J]. BMC Infect Dis, 2007, 7: 5.
- [7] Heinzl M, Kyas A, Weide M, et al. Evaluation of the virucidal performance of domestic laundry procedures [J]. Int J Hyg Environ Health, 2010, 213: 334 - 337.
- [8] Sauerbrei A, Wutzler P. Virucidal efficacy of povidone-iodine-containing disinfectants [J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 51: 158 - 163.
- [9] Steinmann J, Paulmann D, Becker B, et al. Comparison of virucidal activity of alcohol-based hand sanitizers versus antimicrobial hand soaps in vitro and in vivo [J]. J Hosp Infect, 2012, 82: 277 - 280.
- [10] Steinmann J, Becker B, Bischoff B, et al. Virucidal activity of 2 alcohol-based formulations proposed as hand rubs by the World Health Organization [J]. Am J Infect Control, 2010, 38: 66 - 68.
- [11] Sauerbrei A, Schacke M, Glück B, et al. Does limited virucidal activity of biocides include duck hepatitis B virucidal action? [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 276 - 282.
- [12] Sauerbrei A, Schacke M, Gluck B, et al. Validation of biocides against duck hepatitis B virus as a surrogate virus for human hepatitis B virus [J]. J Hosp Infect, 2006, 64: 358 - 365.
- [13] Buckwold VE, Beer BE, Donis RO. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents [J]. Antiviral Res, 2003, 60: 1 - 15.
- [14] Belliot G, Lavaux A, Souihel D, et al. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(10): 3315 - 3318.
- [15] Gehrke C, Steinmann J, Goroncy-Bernes P. Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses) by different types of alcohol in vitro and in vivo [J]. J Hosp Infect, 2004, 56(1): 49 - 55.
- [16] Steinmann J. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants [J]. J Hosp Infect, 2004, 56: S49 - S54.
- [17] WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses. Second edition [M]. WHO/V. B/03.11. ORIGINAL; ENGLISH. World Health Organization. 2003.
- [18] S. Hartnack, Essbauer S, Truyen U. Substitution of Vaccinia Virus Elstree by Modified Vaccinia Virus Ankara to test the Virucidal Efficacy of Chemical Disinfectants [J]. Zoonoses Pub Health. 2008; 55: 99 - 105.
- [19] 张文福. 病毒灭活检验技术 [J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(3): 260 - 261.
- [20] Geller C, Fontanay S, Finance C, et al. A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model [J]. J Virol Methods, 2009, 159: 217 - 226.
- [21] Steinmann J, Wolff MH. Testing virucidal activity in Germany: an update [J]. GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär, 2007, 2(1): 1863 - 5245.

[修回日期] 2015-12-24