

【论 著】

一种复合碘皮肤黏膜消毒剂对病毒灭活效果研究

苏裕心¹, 李 杰², 张 哲¹, 任 哲¹, 余寿忠³, 帖金凤¹(1 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071; 2 北京市门头沟区疾病预防控制中心;
3 中关村国际医药检验认证科技有限公司)

摘要 目的 观察某复合碘皮肤黏膜消毒剂对病毒灭活效果及其毒性。**方法** 采用细胞感染法和动物试验法, 对该复合碘消毒剂灭活病毒的效果和毒性进行观察。**结果** 该消毒剂原液含有效碘 2 000 mg/L 和复合季铵盐 2 000 mg/L。以该复合碘消毒剂原液作用 3.0 min, 对脊髓灰质炎病毒 I 型疫苗株、肠道病毒 EV-71 和狂犬病毒 CVS11 的平均灭活对数值均 > 4.00。用该消毒剂原液擦拭皮肤作用 1 min, 对皮肤表面的自然菌平均杀灭对数值为 1.45。该复合碘皮肤黏膜消毒剂对小鼠经口 LD₅₀ > 5 000 (mg/kg · bw); 对小鼠骨髓嗜多染红细胞无致微核作用; 家兔破损皮肤和急性眼刺激反应强度属于无刺激; 多次完整皮肤刺激为轻微刺激。**结论** 该皮肤黏膜消毒剂对病毒灭活效果好、无毒性, 多次完整皮肤刺激有轻微刺激。

关键词 复合含碘消毒剂; 病毒; 灭活效果; 毒性

中图分类号: R187.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-7658(2019)12-0885-04

DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2019.12.002

Study on virus inactivation and safety of a compound iodine-containing skin mucosal disinfectant

SU Yu-xin¹, LI Jie², ZHANG Zhe¹, REN Zhe¹, YU Shou-zhong³, TIE Jin-feng¹

(1 Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071; 2 Beijing Mentougou District Center for Disease Control and Prevention; 3 Zhongguancun International Medical Inspection and Certification Co., Ltd., China)

Abstract Objective To observe the effect of a compound iodine-containing skin mucosal disinfectant on virus inactivation and its toxicity. **Methods** The virus inactivation effect and toxicity of the compound iodine-containing skin mucosal disinfectant were observed using cell infection method and animal test method. **Results** The compound disinfectant containing 2 000 mg/L of effective iodine and 2 000 mg/L of compound quaternary ammonium salt was used for 3.0 min, and the average killing logarithmic values of poliovirus type I vaccine strain, enterovirus EV-71 and rabies virus CVS11 were all > 4.00; the stock solution of disinfectant was used to wipe skin for 1 min, and the average killing logarithm value of natural bacteria on the skin surface was 1.45. The skin mucosal disinfectant had an oral LD₅₀ > 5 000 (mg/kg · bw) and no micro-nucleus effect on mouse bone marrow polychromatic red blood cells. Rabbit skin damage and acute eye irritation reaction intensity were non-irritating, and multiple intact skin irritation was slight stimulation. **Conclusion** This skin mucosal disinfectant has good inactivation effect on virus. It has no toxicity and slight stimulation for multiple skin irritation.

Key words iodine-containing compound disinfectant; virus; inactivation effect; toxicity

含碘类消毒剂包括碘酊、碘水、碘甘油、碘伏以及复合碘消毒剂。含碘消毒剂是最常用的消毒产品, 广泛用于外科手术前的皮肤和黏膜消毒、注射和穿刺部位皮肤消毒、手术切口及切口创面消毒^[1]。

复合碘类常规消毒剂是以有效碘和氯己定类、季铵盐类、乙醇为主要杀菌成分, 辅以增效剂、缓释剂和干燥剂等成分的配制的一种醇溶液^[2]。在皮肤消毒剂相关标准要求条件下^[3,4], 对无包膜病毒都达不到灭活效果。近几年, 病毒性传染病的流行多以无包膜病毒为主, 如手足口病毒、腺病毒等。因此, 亟需解决皮肤黏膜消毒剂对无包膜病毒的杀灭效果这一难题。有文献报道, 以碘与季铵盐复配或氯己定碘醇复合皮肤消毒剂对脊髓灰质炎病毒疫苗株进

〔基金项目〕 生物安全关键技术研发计划(2017YFC1200404)

〔作者简介〕 苏裕心(1981-), 男, 河南省鄱陵人, 博士, 实验师, 从事消毒学研究工作。

〔通讯作者〕 帖金凤, Email: 535398750@qq.com

行了灭活试验^[5]。本研究以碘为主要成分,辅以复合季铵盐和非离子型表面活性剂等成分,配制复合碘皮肤黏膜消毒剂,在实验室进行了病毒灭活试验、皮肤消毒效果现场试验以及毒理学安全性评价。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用碘、碘化钾、复合季铵盐、非离子型表面活性剂、薄荷醇和芦荟胶等配制复合含碘皮肤黏膜消毒剂,该消毒剂为红棕色透明溶液,含有效碘 2 000 mg/L 和复合季铵盐 2 000 mg/L, pH 值为 3.50。

试验病毒株和敏感细胞为脊髓灰质炎病毒 I 型 (PV-I) 疫苗株、肠道病毒 EV-71 型,宿主细胞为 Vero-E6 细胞;狂犬病毒标准攻击毒株 (CVS-11 株),宿主细胞为 BHK-21 细胞,购自美国标准菌库。

试验动物 KM 小鼠由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,为 SPF 级;日本大耳白兔由北京市昌扬西山养殖场提供,为普通级。动物许可证号为小鼠 SCXK(京)2016-0002。

1.2 病毒灭活试验方法

1.2.1 病毒悬液制备 依据 2002 年版《消毒技术规范》^[6] 进行病毒增殖和病毒滴度测定,制备成滴度大于 10^7 TCID₅₀/0.1 ml 的病毒悬液,置于 -80 ℃ 保存备用。

1.2.2 中和剂鉴定试验 依据 2002 年版《消毒技术规范》^[6] 规定,采取残留消毒剂化学中和法的病毒悬液定量试验程序,分 6 组进行中和剂鉴定试验和结果判定。试验重复 3 次,且 3 次重复试验结果一致。

1.2.3 病毒灭活试验 ①脊髓灰质炎病毒 I 型 (PV-I) 疫苗株和肠道病毒 EV-71 型病毒灭活试验依据 2002 年版《消毒技术规范》^[6] 规定,采取悬液定量灭活试验程序进行试验操作、培养、观察并记录细胞病变情况,计算半数细胞感染剂量 (TCID₅₀) 和平均灭活对数值。试验重复 3 次,且 3 次重复试验结果一致。②狂犬病毒 CVS-11 株病毒灭活试验参照 2002 年版《消毒技术规范》^[6] 规定,采取悬液定量灭活试验程序进行试验操作后,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,用磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次,吹干,80% 丙酮固定 20 min,加入内含 1:8 000 伊文斯兰染色液的异硫氰酸荧光素标记抗体狂犬病毒核蛋白 (RV NP),放 37 ℃ 恒温箱染色 45 min 后,用磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次,吹干,加入甘油,用荧光显微镜观察免疫荧光阳性细胞数 (噬斑数),其中免疫荧光阳性细胞占视野中细胞总

数 >75% 记为“+++”、50%~75% 记为“++”、25%~50% 记为“+”、10%~25% 记为“+”、<10% 记为“-”,计算 TCID₅₀^[7]。

1.3 皮肤消毒现场试验

依据 2002 年版《消毒技术规范》^[6],选择 30 人份志愿者。将志愿者一侧前臂内侧中段作为阳性对照组,用无菌棉拭子在含 10 ml 稀释液的试管中沾湿,在志愿者前臂内侧置规格板框定的区域内采样,以无菌操作方式将采样端剪入原稀释液试管内;取 2 ml 复合型含碘皮肤黏膜消毒剂原液,对志愿者另一侧前臂相同位置的皮肤擦拭消毒 1.0 min。用无菌棉拭子在含有 10 ml 中和剂溶液试管中沾湿,对其前臂进行采样,作为试验组;以未接种的试验用的培养基、中和剂和稀释液作为阴性对照。将阳性对照组、试验组样液进行系列稀释,取适宜稀释度和阴性对照一起接种平皿、培养,计数存活菌落数,计算杀灭对数值。

1.4 毒理学试验

依据 2002 年版《消毒技术规范》^[6] 选用体重 18~22 g 的 KM 小鼠,雌雄各半,采用一次最大限度试验进行急性经口毒性试验和小鼠骨髓嗜多染红细胞 (PCE) 微核试验 (操作方法略),并判断消毒剂对试验动物的急性毒性作用和强度,以及对染色体损伤毒性。

选用体重 2.0~2.5 kg 日本大耳白兔,均为雌性。依据 2002 年版《消毒技术规范》^[6] 进行一次破损皮肤刺激、多次完整皮肤刺激和急性眼刺激试验,并根据刺激反应进行评分和判定受试物对破损皮肤、完整皮肤和眼睛的刺激强度。

2 结果

2.1 中和剂鉴定试验结果

试验结果表明,在 20 ℃ ± 1 ℃ 恒温条件下,用含 50% D/E 中和肉汤的 PBS 作为中和剂,可有效中和该复合型含碘皮肤黏膜消毒剂原液对 PV-I、EV-71 和 CVS-11 的残留作用,各组平均滴度的对数值均符合 2002 年版《消毒技术规范》要求,且中和剂和中和产物对 PV-I、EV-71、CVS-11 及其敏感细胞的生长无影响 (表 1)。

2.2 病毒灭活试验结果

试验结果显示,在 20 ℃ 恒温条件下,该复合碘皮肤黏膜消毒剂原液作用 3.0 min,对悬液内 PV-I、CVS-11 和 EV-71 的平均灭活对数值均 >4.00 (表 2)。

2.3 皮肤消毒现场试验结果

现场试验结果显示,复合型含碘皮肤黏膜消毒

剂原液 2 ml 在志愿者前臂试验区域擦拭消毒 1 min,对皮肤表面的自然菌平均杀灭对数值为 1.45,范围为 1.10~1.57(表 3)。

表 1 复合碘皮肤黏膜消毒剂中和剂鉴定试验结果			
组别	平均 TCID ₅₀ 对数值		
	PV - 1	EV - 71	CVS - 11
消毒剂 + 病毒悬液	3.33	3.90	3.33
(消毒剂 + 病毒悬液) + 中和剂	4.50	4.56	4.44
中和剂 + 病毒悬液	6.65	5.95	6.78
(消毒剂 + 中和剂) + 病毒悬液	6.63	5.59	6.50
病毒悬液	6.88	5.57	6.56
阴性对照	细胞生长正常		
注:第 1 组和第 2 组中 PV - 1 和 EV - 71 作用 1.0 min、对 CVS - 11 作用 0.5 min。			

表 2 复合型含碘皮肤黏膜消毒剂对病毒灭活效果				
病毒株	阳性对照病毒滴度 (TCID ₅₀ 对数值)	作用不同时间(min) 的平均灭活对数值		
		1.5	3.0	4.5
PV-1	6.65	2.54	≥5.65	≥5.65
CVS-11	6.78	4.25	≥5.78	≥5.78
EV-71	5.92	2.51	≥4.92	≥4.92

表 3 复合碘皮肤黏膜消毒剂对皮肤消毒现场试验结果				
组序	采样 人数	对照组平均菌落数 (cfu/30cm ²)	试验组平均菌落数 (cfu/30cm ²)	平均杀灭 对数值
1	5	2 448	184	1.49
2	5	1 550	46	1.57
3	5	2 498	67	1.49
4	5	1 185	45	1.49
5	5	3 312	75	1.53
6	5	727	62	1.10
平均值				1.45

2.4 毒理试验结果

2.4.1 急性经口毒性试验 结果表明,采用一次最大限度试验,观察期间试验动物一般状况均良好,体重均未减轻,无死亡出现。根据 2002 年版《消毒技术规范》中的急性毒性评价规定,小鼠急性经口毒性 LD₅₀>5 000 (mg/kg·bw),表明复合碘皮肤黏膜消毒剂急性经口毒性分级属实际无毒级。

2.4.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 该复合碘皮肤黏膜消毒剂诱导小鼠骨髓 PCE 微核试验的结果表明,该消毒剂高、中、低剂量组与阴性对照(溶剂)组相比,动物骨髓 PCE 微核率差异无显著意义($P>0.05$);阳性对照(环磷酰胺)组与阴性对照组相比,差异有非常显著的意义($P<0.01$)。所有组别动物骨髓 PCE/NCE 的比值均>0.1,表明该消毒剂对骨髓没有明显抑制作用,且高、中、低 3 个剂

量组 PCE/NCE 的比值与阴性对照组比较无显著性差异($P>0.05$)(表 4)。根据 2002 年版《消毒技术规范》的评价规定,可判定该消毒剂对体内染色体无损伤作用。

2.4.3 一次性破损皮肤刺激试验 该复合碘皮肤黏膜消毒剂原液作用于家兔破损皮肤 4 h,分别于去除消毒剂后 1 h、24 h 和 48 h,观察皮肤局部反应,给药部位皮肤与对照皮肤比较无明显差别,观察期内无皮肤红斑和水肿出现,皮肤刺激指数均为 0。

2.4.4 多次完整皮肤刺激试验 该复合碘皮肤黏膜消毒剂作用于家兔皮肤后 24 h 观察皮肤局部反应可见红斑,但在观察期结束之前均完全自然恢复。根据皮肤刺激反应评分,平均积分即刺激指数为 0.55。根据皮肤刺激强度分级,该刺激强度属轻微刺激。

2.4.5 急性眼刺激试验 该复合碘皮肤黏膜消毒剂滴于 3 只家兔一侧的眼结膜囊内,于 1 h、24 h、48 h 后分别肉眼观察 3 只家兔染毒侧的眼结膜、虹膜和角膜,并与滴入生理盐水的对照侧眼比较,均未见异常。

3 讨论

近年来,病毒性传染病频发,因此病毒性传染病的防治已成为人类需要共同面对的挑战。目前,手足口病仍然在亚太地区肆虐,成了我国严重危害儿童健康的高危传染病之一;被犬、猫伤害后引发狂犬病恐惧症及狂犬病导致的死亡已成为我国严重的公共卫生安全问题之一。狂犬病和手足口病的危害性,不仅表现在对人们健康的影响上,更重要的是没有治疗的特效药物^[8-10],世界卫生组织提出,以化学或物理方法消除感染部位的狂犬病病毒,能起到最有效的保护作用。面对如此严峻的形势,亟需找到可以有效杀灭狂犬病毒和 EV-71 等引发手足口病的病毒的消毒剂。本研究以碘为主要成分,复合季铵盐和非离子型表面活性剂为载体,辅以薄荷醇、芦荟胶等协同成分,配制了具有快速灭活病毒的新型复合含碘皮肤黏膜消毒剂。

根据文献报道和市场调研,聚维酮碘消毒虽然可以灭活脊髓灰质炎病毒,但多数在 5 min 内达不到杀灭悬液内的脊髓灰质炎病毒 I 型疫苗株的效果^[11-14]。试验证明,而该消毒剂在有效碘浓度 500 mg/L、季铵盐含量 2 000 mg/L 时,可以对悬液中 PV-1 在 5 min 达到消毒效果^[5];在有效碘含量为 2 000 mg/L、季铵盐含量 2 000 mg/L 时,对悬液中 PV-1、CVS-11 和 EV-71 在 3 min 可以达到消毒效果。并经皮肤现场消毒试验证明,该消毒剂对

皮肤表面的自然菌有较好的消毒效果。经毒理试验证明,该消毒剂无毒、无致突变作用、对黏膜和破损皮肤无刺激性,仅在对动物进行多次完整皮肤连续14 d 刺激试验中,连续使用可能引起过敏性红斑,但均可自然恢复。

表4 小鼠骨髓PCE微核试验结果

组别	剂量(mg/kg)	动物数(只)	受检PCE数(个)	含微核PCE数(个)	微核细胞率(‰)($\bar{x} \pm s$)	PCE/NCE($\bar{x} \pm s$)
消毒剂	5 000	10	10 000	12	1.20 \pm 1.03	1.786 \pm 0.755
	2 000	10	10 000	18	1.80 \pm 1.23	2.007 \pm 0.276
	500	10	10 000	15	1.50 \pm 0.71	2.739 \pm 0.810
阴性对照		10	10 000	16	1.60 \pm 0.97	2.397 \pm 0.880
阳性对照CP		10	10 000	242	24.20 \pm 6.41 **	1.854 \pm 0.556

注: ** 表示与阴性对照组相比 $P < 0.01$ 。

参 考 文 献

[1] 林文华,郝俊. 消毒剂在医院的应用问题讨论[J]. 中国消毒学杂志,2011,28(4):527.

[2] 秦晓云,韩燕,祝文澜. 手术部位皮肤消毒的研究进展[C]. 中华护理学会会议论文集. 湖南长沙,2012:989-992.

[3] 中华人民共和国卫生部. GB 27951-2011 皮肤消毒剂通用技术要求[S]. 2012.

[4] 中华人民共和国卫生部. GB 27954-2011 黏膜消毒剂通用技术要求[S]. 2012.

[5] 帖金凤,苏裕心,张哲,等. 一种复方皮肤黏膜消毒剂的病毒灭活效果及稳定性研究[J]. 中国消毒学杂志,2016,33(3):201-203.

[6] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002.

[7] 帖金凤,陈金龙,王长德,等. 一种专用黏膜消毒剂对病毒的灭活效果及安全性研究. 中国消毒学杂志,2011,28(6):665-668.

[8] 刘纭江,环境对手足口病流行状况影响[J]. 全科口腔医学电子杂志,2019,20(6):27.

[9] 李石平,王志鑫,顾睿,等. 金银花中抗手足口病毒 HEV71 活性成分的虚拟筛选[J]. 中药药理与临床,2015,31(3):67-70.

[10] 中华人民共和国卫生部. 中国狂犬病防治现状[S]. 2009.

[11] 徐燕,周品众,冷红英,等. 四种消毒剂对脊髓灰质炎病毒灭活效果的研究[J]. 中国消毒学杂志,2006,23(2):103-105.

[12] 徐燕,陈越英,周品众,等. 脊髓灰质炎病毒与 F2 噬菌体对部分消毒剂抗力的比较研究[J]. 中国消毒学杂志,2006,23(5):381-383.

[13] 蒋莉,袁庆霞,武雪冰,等. 聚维酮碘对脊髓灰质炎病毒杀灭效果及影响因素的观察[J]. 中国消毒学杂志,2005,22(4):368-370.

[14] 王玲,徐燕,陈越英,等. 一种聚维酮碘消毒液对微生物杀灭效果的实验研究[J]. 中国消毒学杂志,2007,24(2):135-136.

(收稿日期:2019-10-26)

【读者·作者·编者】

关于论文中统计学处理的注意事项

1. 统计研究设计:文中应说明统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计应说明为前瞻性、回顾性或横断面调查研究;实验设计则应说明具体设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等。统计设计应遵循重复、随机、对照、均衡的基本原则进行,对于如何控制重要非试验因素的干扰和影响需进行必要的解释。

2. 资料的表达:服从正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似,呈偏态分布的定量资料用 M(QR) 表达;编制统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;使用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,注意区分百分率与百分比。

3. 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说明对比组之间的差别具有显著性(或非常显著性)的意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t = 3.45, \chi^2 = 4.68, F = 6.79$ 等)应尽可能给出具体的 P 值(如: $P = 0.0239$);当涉及到总体参数(如:总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 置信区间。