

Bacteriophage MS2를 이용한 소독제 효력시험 확립에 관한 연구

이채홍*[†] · 김수희[†] · 한복희 · 김영욱 · 허 문 · 정우석

농림축산검역본부 동물질병관리부 동물약품평가과

Method development for efficacy testing of veterinary disinfectants using bacteriophage MS2

Chae Hong Rhee*[†], Soohee Kim[†], Bokhee Han, Young-Wook Kim, Moon Her, Wooseog Jeong

Veterinary Drugs & Biologics Division, Department of Animal Disease Control & Quarantine, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

Received August 27, 2021
Revised September 26, 2021
Accepted September 26, 2021

Corresponding author:

Chae Hong Rhee

E-mail: chrhee82@korea.kr

https://orcid.org/0000-0003-3296-2346

[†]These first two authors contributed equally to this work.

In virucidal efficacy testing, the chemical inactivation cannot be determined for all viruses due to the difficulties or the inability to culture sufficiently or the risk of exposure to the viruses. Therefore, disinfectants against these viruses could be evaluated by different methods and surrogate viruses are used as alternative. In this study we developed a method for efficacy testing of veterinary disinfectants using one of the candidate surrogate viruses, bacteriophage MS2, as part of the research on the selection of surrogate viruses for efficiency of efficacy testing of veterinary disinfectants. This method is based on the Animal and Plant Quarantine Agency (APQA) guidelines for efficacy testing of veterinary disinfectants. Bacteriophage and disinfectant are reacted in suspension in accordance with the APQA guidelines and then a newly established double agar layer method is applied for the efficacy test. The double agar layer method is summarized as follows: 1) The bottom agar with 1.5% agar is boiled and cooled before poured into petri dishes at volume of 20 mL, and dried under biological safety cabinet. 2) The top agar with 0.7% agar is boiled and kept at 50°C before *E. coli* culture was seeded. 3) The serially diluted bacteriophage MS2-disinfectant mixtures 0.05 mL and *E. coli* host 0.01 mL (OD₆₀₀ 0.2~0.3) are mixed with 5 mL of top agar and incubate them at 50°C for 5 min for reaction. 4) The resulting mixture is poured over top of a bottom agar plate and rocked sufficiently to ensure that the top agar covers the entire surface of the bottom agar. 5) The double agar layer is then placed under biological safety cabinet to allow the agar layer to solidify and subsequently incubated at 37°C for 24 hr. 6) Following incubation, the plates may be inspected for plaques and record results.

Key Words: Bacteriophage MS2, Disinfectant, Double agar layer method, Virucidal efficacy

서론

바이러스의 특성상 배양이 어렵거나, 감염성이 높아 직접 실험이 어려운 바이러스의 경우 대체바이러스(surrogate virus)가 대안으로 이용되고 있다. 국제적으로 공인된 대체바이러스는 없지만 여러 문헌에서 실험 목적에 따라 대체 가능한 바이러스를 이용한 연구가 진행됨을 확인할 수 있다(Steinmann, 2004; Kampf 등, 2005; Morin 등, 2015; Prođělalová 등, 2017;

Eggers 등, 2021).

Bacteriophage는 virus의 일종으로 박테리아를 숙주세포로 삼기 때문에 세포 배양 시설 없는 실험실에서 쉽게 배양할 수 있어 H5N1 highly pathogenic avian influenza virus(HPAIV), Ebola virus, airborne virus, human enveloped virus 등에 대한 실험에 대체바이러스로 사용되어 왔다(Adcock 등, 2009; Turgeon 등, 2014; Ye 등, 2016; Aquino de Carvalho 등, 2017; Gallandat와 Lantagne, 2017). 특히

Leviviridae과에 속하는 bacteriophage MS2는 *Escherichia coli* (*E. coli*)를 숙주세포로 이용하는 coliphage로써 human norovirus (Buckley 등, 2020) 및 foot-and-mouth disease virus (FMDV) (US EPA, 2016; Wyrzykowska-Ceradini 등, 2019) 등에 대한 소독제 연구에 대체바이러스로 사용되고 있다.

현재 국내에는 바이러스에 대한 소독제로 허가를 받기 위해서는 허가대상 바이러스를 이용한 소독제 효력시험 자료가 필요하지만, 국내에서 발생보고가 없는 해외악성전염병에 대한 소독제 시험은 국내시험이 제한되고 있고(농림축산검역본부, 2018), 생물안전 3등급 연구시설을 요하는 경우가 많아 관련 연구가 어려운 실정이다.

이에 따라, 본 연구자들은 소독제 효력시험 효율화를 위한 대체바이러스 선정에 관한 연구를 진행하고 있다. US EPA에서 고유기물 조건에서 스프레이 형태의 소독제 효력 평가를 위해 FMDV 대신 bacteriophage MS2를 이용한 보고서(US EPA, 2016)를 참고하여 bacteriophage MS2를 대체바이러스 후보로 선정하였고, 이를 이용한 소독제 효력시험법을 확립하였다.

재료 및 방법

시험미생물

Table 1은 본 연구에 사용된 bacteriophage의 특성을 나타낸다(배와 신, 2016; U.S. EPA, 2016; Ye 등, 2016; Gallandat와 Lantagne, 2017). Bacteriophage MS2는 *Escherichia coli* (*E. coli*) C3000을 숙주세포로 하는 바이러스로써 외피가 없고(non-enveloped) 지름이 약 25~30 nm인 정이십면체 구조이며, 3.5~3.6 kb의 단일가닥 양성(positive sense) RNA를 게놈으로 한다. Bacteriophage MS2 (ATCC 15597-B1)와 *E. coli* C3000 (ATCC 15597)는 ATCC에서 구매하여 사용하였다.

사용배지 및 시액

모든 배지의 제조는 초순수(deionised water, DI water)를 사용한다. 실험에 사용되는 초자(glassware)는 121°C에서 15분

멸균(autoclaving)과 건조 과정을 거친 후 사용하였다.

Culture broth

Tryptone (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA; Cat. 211705) 10 g, yeast extract (BD Difco; Cat. 212750) 1 g, sodium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cat. 7647-14-5) 8 g에 DI water를 첨가하여 950 mL가 되게 한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 50°C로 식힌 후 supplement를 첨가하였다. Supplement는 glucose (Sigma-Aldrich; Cat. 50-99-7) 10 g, calcium chloride (Sigma-Aldrich; Cat. 10043-52-4) 0.294 g, thiamine (Sigma-Aldrich; Cat. 67-03-8) 0.01 g에 DI water를 첨가하여 50 mL이 되게 한 후 여과멸균하여 사용하였다.

Bottom agar

Tryptone 10 g, yeast extract 1 g, sodium chloride 8 g, agar 15 g에 DI water를 첨가하여 950 mL가 되게 한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 50°C로 식힌 후 상등의 supplement를 첨가한다. 20 mL씩 90×15 mm 페트리 디쉬(petri dish)에 부어 굳힌 후 사용하였다.

Top agar

Tryptone 10 g, yeast extract 1 g, sodium chloride 8 g, agar 7 g에 DI water를 첨가하여 950 mL가 되게 한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 50°C로 식힌 후 상등의 supplement를 첨가한다. 50°C dry oven에서 사용 전까지 보관하였다.

경수

DI water 1,000 mL에 calcium chloride 0.305 g과 magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 0.139 g(w/v)을 함유한 것을 의미한다. 본 연구에서는 경수를 (주)큐어바이오(CureBio, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

유기물 희석액

제조법에 따른 소독제의 희석과 바이러스의 희석을 위해 사용되는 유기물을 함유한 경수를 의미한다. 경수에 비동화(56°C에 30분 처리)된 5% (v/v) FBS (fetal bovine serum; Corning Inc., Corning, NY, USA)을 함유한 것을 사용하였다.

중화배지

소독제와 바이러스의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하

Table 1. Characteristics of bacteriophage MS2

Host	<i>Escherichia coli</i> C3000 (ATCC 15597)
Family/genus	Leviviridae/Levivirus
Genome	3.5~3.6 kb single-stranded positive sense RNA
Morphology	Non-enveloped, 25~30 nm in diameter, icosahedral

기 위하여 사용하였다. Culture broth에 비등화한 10% (v/v) FBS를 함유한 것을 사용하였다.

미생물 배양

Culture broth 25~30 mL에 *E. coli* 0.1~1.0 mL을 접종하여 37°C shaking incubator (100~150 rpm)에서 약 6시간 동안 배양 후 흡광도 값(optical density, OD₆₀₀)을 0.2~0.3으로 조정하여 실험에 사용하였다.

Bacteriophage MS2-소독제 반응

Bacteriophage와 소독제의 반응단계는 농림축산검역본부 고시 제2018-16호 소독제 효력시험지침(농림축산검역본부, 2018)에 따라 실험하였다. 4°C의 bacteriophage MS2 1.0 mL을 4°C 유기물 희석액 19.0 mL에 섞은 후 혼합액 2.5 mL를 꺼내어 4°C에 있는 동량의 소독제가 들어 있는 시험관에 넣고 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며 도중에 10분마다 혼합하여 주었다. 이때 소독제 대신 유기물 희석액을 넣은 실험 대조군을 반드시 포함시켜 실험을 진행하고, 소독제의 농도조정이 필요한 경우 유기물 희석액으로 희석 후 사용하였다. Bacteriophage와 소독제의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 증화하기 위하여 즉시 1.0 mL를 꺼내어 37°C의 동량의 증화배지에 넣고 혼합하고, 증화가 끝난 혼합액은 culture broth를 이용하여 10배 단계 희석을 하였다.

Double agar layer method

소독제 효력시험에 double agar layer method를 적용하여 진행하였다. 본 연구에서 사용한 double agar layer method는 여러 연구에서 보고된 bacteriophage MS2 시험법(US EPA, 2001; Cho 등, 2005; Cormier과 Janes, 2014; 서 등, 2019)에서 배지조성, 배지양, 미생물의 반응 방법 및 조건 등을 변경하여 확립하였다. 각각의 시험관에 top agar 5 mL과 *E. coli* 0.01 mL를 접종하여 혼합한 후 증화가 끝난 bacteriophage MS2-소독제 반응액의 10배 단계 희석액 0.05 mL을 각각 무균적으로 접종하고 부드럽게 섞었다. Top agar가 굳는 것을 방지하기 위해 시험관을 50°C dry heating block에 넣어 5분간 반응시킨 후 bottom agar가 응고된 페트리 디쉬에 전량을 골고루 부어 접종하였다. Agar가 응고되면 페트리 디쉬를 뒤집어 37°C에서 24시간 배양한 후 생성된 플라크를 계수하고 계산법에 따

라 역가를 측정하였다. 본 방법은 Fig. 1에서 간략히 표기하였다.

플라크(plaque) 수 산정

Bacteriophage의 용해작용에 의해 형성되는 플라크를 계수하였다. 확산 플라크가 없고, 1개의 페트리 디쉬당 10~100개의 플라크를 생성한 것을 택하여 플라크 수를 계산하는 것을 원칙으로 하였다(US EPA, 2001). 아래의 계산식 1과 예시에 나타난 바와 같이 한 페트리 디쉬당 플라크 수에 상당 희석배수에 접종량(0.05 mL)를 곱한 값을 나누어 그 수치를 plaque forming units (PFU)/mL로 나타낸다.

$$\text{Plaque forming units/mL} = \frac{\Sigma(\text{플라크 수})}{\Sigma(\text{희석배수} \times \text{바이러스 접종량})} \quad (1)$$

예시)*

희석배수	플라크 수/페트리 디쉬	바이러스 접종량 (mL)
원액	-	0.05
1:10,000	80	0.000005
1:100,000	10	0.0000005
1:1,000,000	0	0.00000005

*(80+10)/(0.000005+0.0000005)=90/0.0000055=16,363,636 PFU/mL (상용대수 환산값: Log₁₀16,363,636=7.21)

대조군의 검정 등

병원체 대조군은 소독제 대신 경수를 넣어 실험하고 증화반응 단계에서 병원체의 역가가 mL당 2×10⁵ PFU 이상임을 확인하였다. 또한, 병원체 대신 경수를 반응시키는 독성 대조군에서는 소독제에 의한 세균 독성이 일어나지 않았음을 확인하였다.

바이러스 감염력 상실 정도 측정

실험 대조군과 비교하여 병원체가 mL당 10⁴배(상용대수로 환산한 값 4) 이상의 사멸 또는 불활화가 확인된 소독제를 효력이 있다고 판정하였다.

세균 독성 확인

4°C의 경수 1.0 mL을 4°C 유기물 희석액 19.0 mL에 섞은 후 혼합액 2.5 mL를 꺼내어 4°C에 있는 동량의 소독제가 들어 있

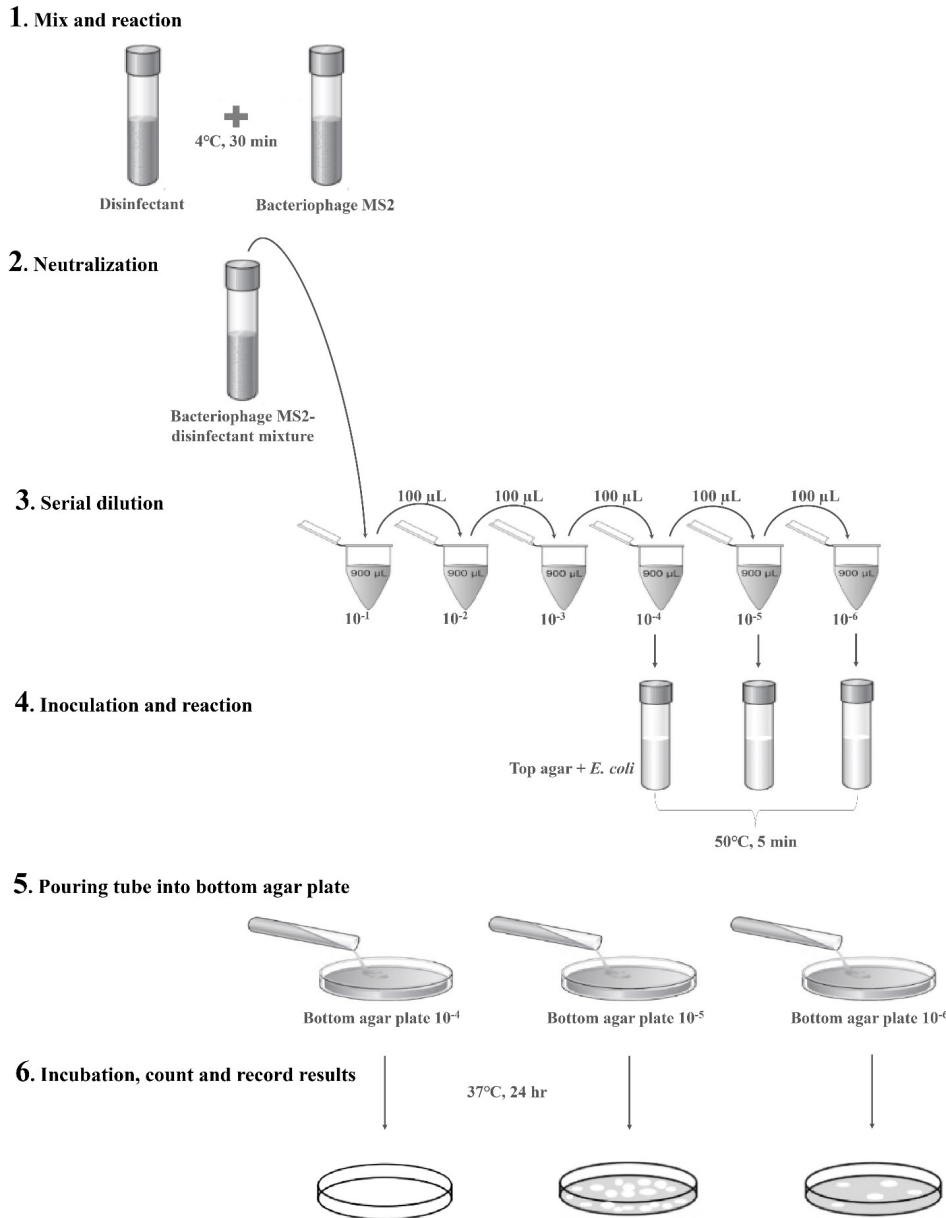


Fig. 1. Schematic representation of double agar layer method for disinfectant efficacy test.

는 시험관에 넣고 혼합한 다음, 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며 도중에 10분마다 혼합하여 주었다. 경수와 소독제의 반응이 끝나면 즉시 1.0 mL를 꺼내어 37°C의 동량의 중화배지에 넣고 혼합하고 double agar layer method 실험을 진행하였다. 플라크가 생성되었으면 세균 독성이 있다고 판정하였다.

결 과

본 연구는 bacteriophage MS2를 이용하여 소독제 효력을 확인하기 위한 시험법 개발을 목적으로 수행하여 double agar layer method를 확립하였고, Fig. 1에서 간략히 표기하였다.

Bottom agar와 top agar는 agar powder 함량이 각각 1.5% (w/v), 0.7% (w/v)가 되게 하였고, 배지량은 20 mL와 5 mL에서 플라크가 가장 잘 보였다. *E. coli* 0.01 mL을 top agar 5 mL에 접종 후 손으로 가볍게 돌리면 섞고 bacteriophage MS2-소독제 반응액 0.05 mL를 접종하여 배지 내에서 미생물이 반응할 수 있도록 하였다. 여러 기존법보다 미생물을 낮은 농도로 접종하는 대신 50°C dry heating block에 시험관을 꽂아 5분의 미생물 간 반응시간을 주어 플라크 형성이 더 잘 될 수 있도록 하였다. Dry heating block 사용은 water bath를 사용하는 것 보다 오염 가능성을 낮출 수 있는 장점이 있다. 반응이 끝난 혼합액은 즉시 bottom agar 페트리 디쉬에 부어 좌우와 앞

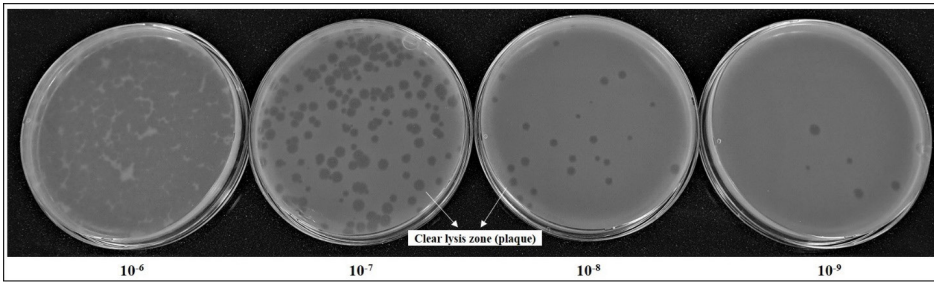


Fig. 2. Example of phage lysis plaque phenotypes observed in bacteriophage MS2 onto *E. coli* C3000 lawn. The presence of phage can be identified as clear zones, or plaques, on a cloudy suspension of bacterial cells growing in the soft agar.

뒤로 가볍게 돌려 top agar가 골고루 퍼지게 하고 굳혔다.

Fig. 2는 double agar layer method를 이용한 bacteriophage MS2의 소독제 효력시험 결과의 예로써 실험 대조군의 10^{-6} ~ 10^{-9} 희석액에서 생성된 플라크의 모습이다. 소독제 대신 유기물 희석액을 bacteriophage MS2와 반응시킨 후 중화과정을 거쳐 10배 단계 희석을 하고, 각각의 희석액 0.05 mL을 top agar 5 mL과 *E. coli* 0.01 mL 혼합액에 접종, 반응 후 bottom agar 위에 부어 37°C에서 24시간 배양하였다. 숙주세포인 *E. coli*로 덮여 있는 agar에 희석단계가 높아질 수록 투명한 세포용해 영역(clear lysis zones)인 플라크가 계수 가능할 정도로 확인되었다. 따라서, 한 페트리 디쉬당 10~100개의 플라크를 생성한 10^{-8} 희석액의 결과를 선택하여 실험 대조군의 역가 계산에 사용하였다. 대조군의 역가는 10^{-8} 희석액에서 25개의 플라크가 생성되어 25에 희석배수인 10^{-8} 과 접종량 0.05를 곱한 값을 나누어 5×10^{10} PFU/mL이며, 상용대수로 환산한 값은 약 10.7이다. FMDV에 효력이 확인된 소독제를 처리한 실험군의 바이러스 감염력 상실 정도 측정 결과 대조군과 비교하여 플라크 수가 ≥ 4 -log 감소함을 확인하여 본 방법으로 소독제 효력시험 평가가 가능함을 확인하였다.

고 찰

소독제 효력시험 시 바이러스의 특성상 배양이 어렵거나 감염성이 높아 위험을 초래할 수 있는 경우 대체바이러스를 사용하여 시험을 하며, 이러한 대체바이러스의 도입은 주요 병원성 바이러스의 작용과 불활화에 대한 중요한 정보를 제공하고 있다.

Bacteriophage MS2는 바이러스 오염 제거제의 효능을 평가하는 데 가장 일반적으로 이용되는 대체바이러스이며 (Wyrzykowska-Ceradini 등, 2019), 배양이 가능한 특성은 대체바이러스로 널리 사용되는 이유 중 하나이다 (Turgeon 등, 2014). 특히 bacteriophage MS2는 FMDV 오염 제거에 권장되는 소독제에 민감한 것으로 보고되었다 (Wyrzykowska-Ceradini 등, 2019). 본 연구의 목적은 소독제 효력시험 효율

화를 위한 대체바이러스 후보 바이러스 중 하나인 bacteriophage MS2를 이용한 소독제 효력시험법을 확립하는 것이었다.

Double agar layer method의 신뢰성과 정확도는 플라크의 가시성 확보에 따른 일관성 있는 플라크 계수에 영향을 받는다. Agar layer의 조성량과 배지양, 숙주세포인 박테리아의 접종량 등이 최적의 조건이 아닌 경우, 플라크가 흐리거나 너무 작아 정확한 정량적 평가가 힘들다. 따라서 정확한 방법으로 플라크 선명도를 증가시켜 플라크 구별을 쉽게 하는 것이 중요하다. 본 연구에서 확립한 시험법으로 대조군 시험 시 bacteriophage의 희석이 진행될수록 플라크 수가 정량 및 계수가 가능할 정도로 정확하게 농도에 따라 변하는 것을 확인할 수 있었다.

Lillehaug (1997)는 top agar가 부드럽고(낮은 agar 함량) 얇을수록 phage의 확산 속도가 높아지고, 영양분을 제공하는 bottom agar는 pH 감소를 완충하며 부드럽고 얇을수록 가시성을 높여준다고 하였다. 따라서 본 연구에서도 top agar와 bottom agar의 agar의 함량과 배지의 양을 조절하여 플라크의 가시성을 확보하고 계수가 쉽도록 하였다.

미생물 배양에는 여러 가지 방법이 있으며, 세포와 배지를 다루는 모든 실험과정을 무균적으로 수행해야 한다. 본 연구에서는 top agar에 bacteriophage와 숙주세포인 *E. coli*를 혼합하여 bottom agar에 부어서 접종하는 방법(pouring method)을 선택하였다. 이 방법은 도포하는 방법(spreading method)보다 간편하지만, agar가 굳으면 phage가 갇히게 되어 *E. coli*를 감염시킬 수 없을 수 있고 균질성의 문제가 있어 실험 시 agar가 굳지 않는 온도를 유지하고 증충시킨 후 즉시 좌우로 잘 흔들어 골고루 분포될 수 있도록 하는 것이 중요하였다. 배지에 supplement를 첨가함으로써 *E. coli*의 최적 성장 조건(glucose, thiamine)을 제공하고 세포막의 투과성을 증가(CaCl₂)시켜 bacteriophage MS2의 증식과 숙주세포와의 반응에 도움을 주었다(Cormier과 Janes, 2014).

연구진행 시 시험의 목적이나 대상 미생물에 따라 가장 적합한 실험법을 선택할 수 있지만, 기존의 실험법에서 조정하거나 개발하는 것도 중요하다(Sanders, 2012). 본 연구에서는 박테

리아를 숙주세포로 사용하는 바이러스의 특성을 이용하여 기존의 double agar layer method에서 배지조성, 배지양, 미생물의 반응 방법 및 조건 등을 변경하여 최적의 시험법을 확립하였다. 본 연구에서 개발된 방법은 소독제 효력시험을 위해 bacteriophage MS2를 대상으로 수행되었지만, 플라크 분석이 가능한 다른 용해성 phage에도 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 bacteriophage MS2를 이용한 소독제 효력 시험법을 확립하였다. 시험법 개발 시 농림축산검역본부 고시 제2018-16호 소독제 효력시험지침(농림축산검역본부, 2018)을 기준으로 하였으며, 병원체인 bacteriophage와 숙주세포의 배양 조건 및 반응 조건 등을 확립하여 double agar layer method를 개발하였다.

감사의 글

본 연구는 농림축산검역본부의 지원을 받아 수행되었다(I-1543073-2020-22-01).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Chae Hong Rhee, <https://orcid.org/0000-0003-3296-2346>

Soohee Kim, <https://orcid.org/0000-0002-7337-0366>

Bokhee Han, <https://orcid.org/0000-0002-6881-4700>

Young-Wook Kim, <https://orcid.org/0000-0003-0498-6594>

Moon Her, <https://orcid.org/0000-0002-6684-7170>

Wooseog Jeong, <https://orcid.org/0000-0002-3214-9323>

REFERENCES

농림축산검역본부. 2018. 소독제 효력시험지침. 농림축산검역본부 고시 제2018-16호.

배경선, 신귀암. 2016. 하수 처리 과정의 염소 소독에 대한 여러 박테리오파지들의 저항성 평가; 물 재이용 과정의 안전

성 관리를 위한 바이러스 지표미생물의 개발. 상하수도학회지 30: 285-291.

서영석, 김애린, 조민. 2019. 전해 염소수/자외선 결합 시스템을 이용한 병원성 미생물의 불활성화 키네틱스 평가. 상하수도학회지 33: 379-388.

Adcock NJ, Rice EW, Sivaganesan M, Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE. 2009. The use of bacteriophages of the family *Cystoviridae* as surrogates for H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in persistence and inactivation studies. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 44:1362-1366.

Aquino de Carvalho NA, Stachler EN, Cimabue N, Bibby K. 2017. Evaluation of Phi6 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate. *Environ Sci Technol* 51: 8692-8700.

Buckley D, Dharmasena M, Wang H, Huang J, Adams J, Pettigrew C, Fraser A, Jiang X. 2020. Efficacy of novel aqueous photo-chlorine dioxide against a human norovirus surrogate, bacteriophage MS2 and *Clostridium difficile* endospores, in suspension, on stainless steel and under greenhouse conditions. *J Appl Microbiol* 130: 1531-1545.

Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J. 2005. Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Appl Environ Microbiol* 71: 270-275.

Cormier J, Janes M. 2014. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2. *J Virol Methods* 196: 86-92.

Eggers M, Schwebke I, Suchomel M, Fotheringham V, Gebel J, Meyer B, Morace G, Roques C, Visa P, Steinhauer K. 2021. The European tiered approach for virucidal efficacy testing - rationale for rapidly selecting disinfectants against emerging and re-emerging viral diseases. *Euro Surveill* 26 pii=2000708. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2000708>.

Gallandat K, Lantagne D. 2017. Selection of a Biosafety Level 1 (BSL-1) surrogate to evaluate surface disinfection efficacy in Ebola outbreaks: Comparison of four bacteriophages. *PLoS ONE* 12: e0177943.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177943>.
- Kampf G, Grotherr D, Steinmann J. 2005. Efficacy of three ethanol-based hand rubs against feline calicivirus, a surrogate virus for norovirus. *J Hosp Infect* 60: 144-149.
- Lillehaug, D. 1997. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *J Appl Microbiol* 83: 85-90.
- Morin T, Martin H, Soumet C, Fresnel R, Lamaudière S, Le Sauvage AL, Deleurme K, Maris P. 2015. Comparison of the virucidal efficacy of peracetic acid, potassium monopersulphate and sodium hypochlorite on bacteriophages P001 and MS2. *J Appl Microbiol* 119: 655-665.
- Prodělalová J, Malenovská H, Moutelíková R, Titěra D. 2017. Virucides in apiculture: persistence of surrogate enterovirus under simulated field conditions. *Pest Manag Sci* 73: 2544-2549.
- Sanders ER. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J Vis Exp* 63: e3064. doi:10.3791/3064.
- Steinmann J. 2004. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants. *J Hosp Infect* 56: S49-S54.
- Turgeon N, Toulouse MJ, Martel B, Moineau S, Duchaine C. 2014. Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies. *Appl Environ Microbiol* 80: 4242-4250.
- US EPA. 2001. Method 1601: Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by two-step enrichment procedure. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA 821-R-01-030. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method_1601_2001.pdf.
- US EPA. 2016. Effectiveness of spray-based decontamination methods for spores and viruses on heavily soiled surfaces. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-16/162. file:///C:/Users/LG/Downloads/EFFECTIVENESS+OF+SPRAY-BASED+DECONTAMINATION.PDF.
- Wyrzykowska-Ceradini B, Calfee M, Touati A, Wood J, Mickelsen R, Miller L, Colby M, Slone C, Gatchalian N, Pongur S, Aslett D. 2019. The use of bacteriophage MS2 for the development and application of a virucide decontamination test method for porous and heavily soiled surfaces. *J Appl Microbiol* 127: 1315-1326.
- Ye Y, Ellenberg RM, Graham KE, Wigginton KR. 2016. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environ Sci Technol* 50: 5077-5085.