

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 647—2019

溶葡萄球菌酶和溶菌酶消毒剂卫生要求

Hygienic requirement for lysostaphin and lysozyme disinfectants

2019-01-30 发布

2019-07-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

目 次

前言.....	1
1 范围.....	2
2 规范性引用文件.....	2
3 术语和定义.....	2
4 原料要求.....	3
5 技术要求.....	3
6 应用范围.....	4
7 使用方法.....	4
8 运输、贮存和包装.....	5
9 标签、标志和说明书.....	5
10 检验方法.....	5
附录 A（规范性附录）溶葡萄球菌酶活性测定	7
附录 B（规范性附录）溶菌酶活性测定	9
附录 C（资料性附录）溶葡萄球菌酶色源底物制备	11

前 言

本部分按照 GB/T1.1—2009 给出的规则起草。

本部分起草单位：上海市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、复旦大学。

本部分主要起草人：田靓、朱仁义、袁政安、沈伟、沈瑾、邱侠、陆婉英、黄青山、李国栋、陆晔、赵晓蔚、黄晋江、吴宏宇。

溶葡萄球菌酶和溶菌酶消毒剂卫生要求

1 范围

本标准规定了溶葡萄球菌酶和溶菌酶消毒剂的原料要求、技术要求、应用范围、使用方法、运输贮存和包装、标签标志和说明书、检验方法。

本部分适用于以溶葡萄球菌酶和（或）溶菌酶为主要杀菌成分的酶类消毒剂。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB 27950 手消毒剂卫生要求

GB 27951 皮肤消毒剂卫生要求

GB 27954 黏膜消毒剂卫生要求

中华人民共和国药典（2015年版）

消毒技术规范（2002年版）卫生部（卫法监发〔2002〕282号）

消毒产品标签说明书管理规范 卫生部（卫监督发〔2005〕426号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

酶类消毒剂 enzyme disinfectant

以酶为主要杀菌成分的消毒剂。

3.2

溶葡萄球菌酶 lysostaphin

能水解细菌细胞壁肽聚糖中的甘氨酸肽键，使细菌死亡的酶。

3.3

溶菌酶 lysozyme

能水解细菌中黏多糖的酶。亦称胞壁质酶、*N*-乙酰胞壁质聚糖水解酶。

3.4

酶活性单位 enzyme activity unit

酶活性的度量单位。1个酶活性单位指在特定条件下，在单位时间内转化单位底物（或转化底物中单位有关基团）的酶量。

4 原料要求

4.1 溶葡萄球菌酶

白色或微黄色粉末，无臭、易溶于水；按干燥品计算，酶活性单位应 $\geq 100\text{U/mg}$ 。

4.2 溶菌酶

符合国家药品标准中溶菌酶的要求。

4.3 生产用水

符合《中华人民共和国药典（2015年版）》中纯化水的要求。

4.4 其他原料

为食品级或化学纯或符合药典规定的原料，符合国家有关规定，不得使用工业级。

4.5 禁用物质

不应含有抗生素、抗真菌药物、激素以及国家规定的其他禁用物质。

5 技术要求

5.1 外观

不分层、无沉淀和悬浮物、无异味。

5.2 理化指标

5.2.1 pH 值

pH值为5.0~8.0。

5.2.2 有效含量

消毒剂中溶葡萄球菌酶的活性范围为 $0.5\text{U/mL} \sim 20\text{U/mL}$ ，溶菌酶的活性范围为 $10000\text{U/mL} \sim 200000\text{U/mL}$ 。

产品有效成分含量在设定值或标示中心值的80%~150%之内。

5.2.3 稳定性

≥ 12 个月。

5.3 杀灭微生物指标

作用浓度和时间按产品标签说明书的要求，杀灭微生物指标应符合表1要求。

用于手消毒应符合GB 27950的要求；用于皮肤消毒应符合GB 27951的要求；用于黏膜消毒应符合GB 27954的要求。

表1 杀灭微生物指标

项目	杀灭对数值	
	悬液法	载体法
大肠杆菌（8099）	≥5.00	≥3.00
金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）	≥5.00	≥3.00
铜绿假单胞菌（ATCC 15442）	≥5.00	≥3.00
白色念珠菌（ATCC 10231）	≥4.00	≥3.00
自然菌（现场试验 ^a ）	≥1.00	
^a 用于手消毒做手现场试验，用于皮肤或黏膜消毒做皮肤现场试验。		

6 应用范围

适用于手、皮肤和黏膜的消毒。

按产品说明书并有实验依据的产品可增加其他应用范围。

7 使用方法

7.1 手消毒

7.1.1 卫生手消毒

取适量消毒剂于手心，双手互搓使均匀涂布每个部位，作用时间符合GB 27950的要求。

7.1.2 外科手消毒

外科洗手后，取适量消毒剂均匀涂布于双手、前臂和上臂下1/3的皮肤，作用时间符合GB 27950的要求。

7.2 皮肤消毒

7.2.1 完整皮肤

取消毒剂原液，或将消毒剂原液用符合《中华人民共和国药典（2015年版）》的纯化水或无菌水稀释至说明书规定浓度，均匀喷雾或用医用棉拭子擦拭皮肤表面，作用时间应符合GB 27951的要求。

7.2.2 破损皮肤

从原包装倒出后一次性使用。取消毒剂原液，或将消毒剂原液用符合《中华人民共和国药典（2015年版）》的纯化水或无菌水稀释至说明书规定浓度，冲洗破损皮肤表面，作用时间应符合GB 27951的要求。

7.3 黏膜消毒

7.3.1 口腔黏膜

从原包装倒出后一次性使用。用消毒剂原液，或将消毒剂原液用符合《中华人民共和国药典（2015年版）》的纯化水或无菌水稀释至说明书规定浓度，均匀喷雾或用医用棉拭子擦拭或含漱，作用时间按照说明书，最长作用时间5 min。

7.3.2 阴道和外生殖器黏膜

从原包装倒出后一次性使用。用消毒剂原液，或将消毒剂原液用符合《中华人民共和国药典（2015年版）》的纯化水或无菌水稀释至说明书规定浓度，用医用棉拭子擦拭或灌洗或冲洗，作用时间按照说明书，最长作用时间5 min。

8 运输、贮存和包装

8.1 运输

运输产品时应避免日晒、雨淋。不可与有异味或影响产品质量的物品混装运输。

8.2 贮存

室温阴凉处保存，避光、密闭、干燥，不可与有异味或影响产品质量的物品同处贮存。

8.3 包装

产品的包装无毒和清洁，包装材质符合相应材料的化妆品包装要求。产品的包装密封，能保证产品的稳定性以及在储存运输、使用过程中的安全性。包装储运图示标志应符合GB/T 191要求。

9 标识要求

9.1 标签和说明书

符合《消毒产品标签说明书管理规范》

9.2 注意事项

说明书至少包括以下内容：

- 避免接触拮抗物。不能与阴离子表面活性剂、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等同时使用。
- 置于儿童不易触及处。
- 对蛋白质过敏者慎用。

10 检验方法

10.1 外观

用肉眼观察其色泽、形态，用嗅觉鉴别其气味。

10.2 pH值测定

按《消毒技术规范（2002年版）》规定方法测定。

10.3 有效含量测定

10.3.1 溶葡萄球菌酶活性测定

按照附录A规定方法测定。

10.3.2 溶菌酶活性测定

按照附录B规定方法测定。

10.4 稳定性测定

按《消毒技术规范（2002年版）》的方法，用微生物法进行稳定性实验。有效期<24个月，用自然留样法测定；有效期为24个月，根据产品性能，选用37℃存放90d的方法，或用自然留样法测定。

在有效期内，有效成分含量不得低于标示量的下限值。

10.5 杀灭微生物试验

按《消毒技术规范（2002年版）》有关规定测定。宜采用悬液法；若选用载体法时，应采用非吸附性材料（金属、玻璃、猪皮等）做载体。

附 录 A

（规范性附录）

溶葡萄球菌酶活性测定

A.1 原理

以偶联活性艳蓝染料KNR的金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖（KNR-PG）为色源底物，根据酶作用过程中定量地释放带有KNR染料基团的小分子可溶性片段产物，在除去未反应的不溶性底物后，对上清液进行比色测定溶葡萄球菌酶活性。

在pH 10.0的1.2 mL反应体系下，37℃温度下，在波长595 nm处，每分钟使KNR-PG溶液吸光度值增加0.35的酶量为1个溶葡萄球菌酶活性单位。

A.2 仪器

A.2.1 紫外-可见分光光度计或酶标仪。

A.2.2 高速冷冻台式离心机。

A.2.3 电子天平。

A.2.4 电热恒温水浴锅。

A.2.5 10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL移液枪及配套枪头。

A.2.6 旋涡混合仪。

A.2.7 定时器或秒表。

A.3 试剂

A.3.1 溶葡萄球菌酶标准品溶液：按照溶葡萄球菌酶活性单位定义，对溶葡萄球菌酶冻干粉进行标定。需要时，用Tris-HCl缓冲液溶解，配制成0.9 U/mL的标准品溶液，-20℃贮存，每次试验用1支，避免反复冻融。

A.3.2 甘氨酸：分析纯。

A.3.3 氢氧化钠：分析纯。

A.3.4 三羟甲基氨基甲烷（Tris）：分析纯。

A.3.5 95%乙醇：分析纯。

A.3.6 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液：0.2 mol/L，pH 10.0。

A.3.7 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液（Tris-HCl缓冲液）：0.05 mol/L，pH 7.5。

A.3.8 色源底物KNR-PG溶液：按照附录C方法制备色源底物KNR-PG，用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液以1:5质量体积比例均匀悬浮。

A.4 试验步骤

A.4.1 标准曲线的制备

取洁净干燥的微量离心管6只，标号，按表A.1顺序每管中加入对应量的溶葡萄球菌酶标准品溶液（A.2.2.1），再加入不同量的0.2 mol/L甘氨酸-氢氧化钠缓冲液（A.2.2.3）。然后按序号加入色源底物KNR-PG溶液（A.2.2.5）130 μL，每管加入底物后迅速在旋涡混合仪上混匀。将加好溶液的微量离心管迅速移入37℃的恒温水浴锅中定时反应20 min。从水浴中取出微量离心管，每管中加入300 μL 95%乙醇终止反应，并于10000 r/min离心10 min，离心结束后，取上清液于595 nm处，以0号管为空白测定吸光度。根据测得的吸光度值及相对应的标准品溶葡萄球菌酶活性（U/mL），求得线性回归曲线：

$$C_0 = (A-B) / K \cdots \cdots \cdots (A.1)$$

式中：

C_0 ——标准品溶葡萄球菌酶活性 (U/mL)；

A——吸光度；

B——截距；

K——标准曲线的斜率。

表A.1 标准曲线制备

	管号					
	0	1	2	3	4	5
溶葡萄球菌酶标准品溶液/ μL	0	20	40	60	80	100
甘氨酸-氢氧化钠缓冲液/ μL	770	750	730	710	690	670
底物/ μL	130	130	130	130	130	130
95%乙醇/ μL	300	300	300	300	300	300
溶葡萄球菌酶标准品溶液终浓度/U/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1

A.4.2 样品的测定

待测样品的测定方法同标准曲线，取50 μL 用于测定。平行测定3次，计算平均值。

A.5 结果计算

根据标准曲线，计算未知溶液中溶葡萄球菌酶活性，见下式：

$$C = C_0 \times V_{\text{反}} / V_{\text{样}} \times N \cdots \cdots \cdots (A.2)$$

式中：

C——样品溶葡萄球菌酶活性 (U/mL)；

C_0 ——标准品溶葡萄球菌酶活性 (U/mL)；

$V_{\text{反}}$ ——反应体系体积，为0.9mL；

$V_{\text{样}}$ ——样品加入体积，为0.05mL；

N——样品稀释倍数。

附 录 B
(规范性附录)
溶菌酶活性测定

B.1 原理

溶菌酶通过溶解革兰阳性菌细胞壁使细菌溶解，菌液在可见光范围内的吸光度降低，以溶壁微球菌为底物，用分光光度法，以450nm波长处菌液单位时间内吸光度降低程度测定溶菌酶活性。

在室温25℃、pH为6.2时，在波长450nm处，每分钟引起吸收度下降0.001为1个溶菌酶活性单位。

B.2 试剂

B.2.1 磷酸盐缓冲液：取磷酸二氢钠10.4 g与磷酸氢二钠7.86 g及乙二胺四乙酸二钠0.37 g，加水溶解至1000 mL，调节pH至6.2。

B.2.2 溶壁微球菌[*Micrococcus lysodeik*, CGMCC1.0634]。

B.3 试验步骤**B.3.1 样品溶液制备**

量取样品，用磷酸盐缓冲液稀释成约1000U/mL的溶液，稀释所用倍数记为N。

B.3.2 底物悬浮液的制备

临用前配制。称取溶壁微球菌15 mg~20 mg，加磷酸盐缓冲液0.5 mL~1 mL，在研钵内研磨3 min，再加磷酸盐缓冲液适量，使总体积约为50 mL，悬浮液于25℃±0.1℃在450 nm波长处测得的吸收度为0.70±0.05。

B.3.3 样品测定

量取25℃±0.1℃的底物悬浮液3 mL，置比色池中，在450 nm的波长处测定吸收度，作为0 s的读数A₀，然后量取25℃±0.1℃的供试品溶液0.15 mL（相当于溶菌酶7.5 μg），加到比色池中，迅速混匀，用秒表计时，至60 s时再测定吸收度A；同时量取磷酸盐缓冲液0.15 mL，同法操作，做为空白试验，测得0 s的读数A'₀及60 s的读数A'。

平行测定3次，计算平均值。

B.4 结果计算

计算未知溶液中溶菌酶活性，见下式：

$$C = \frac{(A_0 - A) - (A'_0 - A')}{0.15} \times N \times 10^3 \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

C——样品溶菌酶活性（U/mL）；

A₀——样品0 s时的吸收度；

A——样品60 s时的吸收度；

A'₀——空白0 s时的吸收度；

A'——空白60 s时的吸收度；

N——稀释倍数。

附 录 C
(规范性附录)
溶葡萄球菌酶色源底物制备

C.1 试剂

C.1.1 三氯乙酸 (TCA)

10%TCA: 取三氯乙酸10 g, 溶解于100mL纯水中。

5%TCA: 取三氯乙酸5 g, 溶解于100mL纯水中。

C.1.2 0.05mol/L三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液 (Tris-HCl)

取三羟甲基氨基甲烷6.0g, 加水800mL溶解, 用盐酸调节pH至7.5后, 用水稀释至1000mL。

C.1.3 0.25mol/L 氢氧化钠溶液

取氢氧化钠10.0g, 加水1000mL溶解。

C.1.4 其他试剂

金黄色葡萄球菌、生理盐水、胰蛋白酶、艳蓝染料 (KNR染料)、叠氮钠、纯水。

C.2 制备方法

C.2.1 按照《消毒技术规范 (2002年版)》有关规定制备金黄色葡萄球菌悬液。

C.2.2 对菌悬液121℃ 20min灭菌后进行离心, 收集菌体。

C.2.3 菌体沉淀用生理盐水离心洗涤2次。

C.2.4 用7倍菌体质量的10%TCA溶液悬浮菌体, 4℃放置72h。

C.2.5 离心, 将菌体用生理盐水离心洗涤一次。

C.2.6 用5倍菌体质量的5%TCA溶液悬浮菌体, 90℃水浴10min。

C.2.7 离心收集沉淀, 生理盐水离心洗涤3次。

C.2.8 用5倍菌体质量的Tris-HCl悬浮菌体, 按0.5mg/mL浓度加入胰蛋白酶, 置于37℃水浴24h。

C.2.9 菌体于90℃水浴10min, 灭活胰蛋白酶。

C.2.10 离心收集沉淀, 用纯水离心洗涤3次。

C.2.11 用少量纯水悬浮菌体, 于4℃下对纯水透析24h。

C.2.12 离心, 收集沉淀。

C.2.13 按7倍菌体质量, 配制0.25N的氢氧化钠溶液适量。

C.2.14 用配制好的0.25N的氢氧化钠溶液的一半体积悬浮菌体。

C.2.15 按1/7的菌体质量称取KNR染料, 用剩余的氢氧化钠溶液进行溶解。

C.2.16 在悬浮的菌液中加入配制好的染料, 37℃水浴24h。

C.2.17 离心, 纯水洗涤至上清液无色, 用少量纯水悬浮菌体, 转移至保存容器内, 按10mg/L浓度加入叠氮钠, 4℃保存。