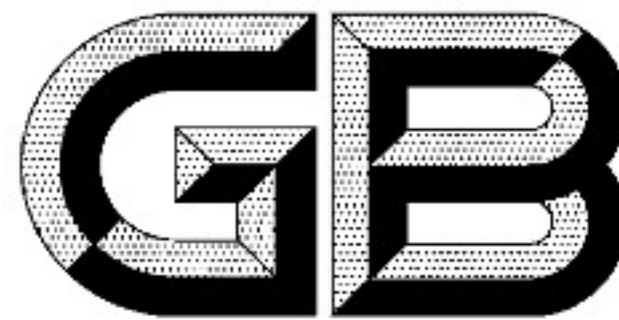


ICS 61.060
Y 78



中华人民共和国国家标准

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

鞋类和鞋类部件 抗菌性能评估试验方法

Footwear and footwear components—Test method to assess antibacterial activity

(ISO 16187:2013, IDT)

2019-08-30 发布

2020-03-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO 16187:2013《鞋类和鞋类部件 抗细菌性能评估试验方法》。

与本标准中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

——GB/T 2703—2017 鞋类 术语(ISO 19952:2005, NEQ)；

——GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法(ISO 3696:1987, MOD)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国制鞋标准化技术委员会(SAC/TC 305)归口。

本标准起草单位：中国皮革制鞋研究院有限公司、琪尔特股份有限公司、佛山林至高分子材料科技有限公司。

本标准主要起草人：张伟娟、李将元、王小刚、畅文凯。

鞋类和鞋类部件 抗菌性能评估试验方法

警示——本标准中规定的试验方法需要使用细菌。只有经过微生物学培训且具有实践经验的专业人员在具备处理微生物技术条件的实验室才可使用本标准的微生物检测方法。考虑到具体国家的法律法规,应采取适当的安全措施。

1 范围

本标准规定了评估鞋类和鞋类部件抗菌性能的定量试验方法。
本标准适用于所有使用非溶出抗菌处理的鞋类和鞋类部件。

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。

ISO 3696 分析实验室用水 规格和试验方法(Water for analytical laboratory use—Specification and test methods)

ISO 19952 鞋类 术语(Footwear—Vocabulary)

3 术语和定义

ISO 19952 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌活性 antibacterial activity

材料或材料表面具有阻止或减缓细菌生长、减少细菌数量或杀灭细菌的功效。

3.2

对照样 control sample

与试样相同但未经抗菌处理的材料。

4 安全性

微生物的使用具有潜在风险,需要较高的技术水平并符合目前国家的法律法规。只有经过微生物技术培训的人员可开展该试验。应严格遵守消毒杀菌行为法则和个人卫生。

注:建议试验员了解 IEC 60068-2-10 附录 A“人员风险”,以及 ISO 7218。

5 材料与设备

5.1 总则

常规实验室设备及以下设备。

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

- 5.2 生物安全柜。
- 5.3 培养箱。温度可控制在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。
- 5.4 高压灭菌锅。
- 5.5 湿度培养箱。温度可控制在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，相对湿度不低于 90%。
- 5.6 紫外灯。
- 5.7 广口瓶。具塞，100 mL，可配合高压灭菌锅(5.4)使用。
- 5.8 覆盖膜。不影响细菌生长或水分吸收，可用聚乙烯、聚丙烯或聚酯(聚乙烯对苯二酸酯)制作。膜厚为 0.05 mm~0.10 mm。
- 5.9 漩涡振荡器。
- 5.10 振荡器。二维或三维，可调至 50 r/min。
- 5.11 控温摇床。温度可控制在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，频率为 $(120 \pm 10)\text{r/min}$ 。

6 试剂和培养基

6.1 原则

为确保试验结果准确，试剂和培养基应新鲜配制。

注：可依据 ISO 11133，或依据国家法律法规。

试验用试剂应为分析纯和/或适合进行微生物试验。

仅使用 ISO 3696 规定的三级水。

6.2 营养肉汤培养基(NB)

6.2.1 成分

牛肉膏 3.0 g；
蛋白胨 5.0 g；
氯化钠(NaCl) 5.0 g；
水 1 000 mL。

6.2.2 制备

搅拌调节 pH 至 7.2 ± 0.2 (室温)。在电热板或沸水浴中搅拌加热至成分完全溶解。用高压灭菌锅(5.4)在 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。

6.3 营养琼脂培养基(NA)

6.3.1 成分

牛肉膏 5.0 g；
蛋白胨 10.0 g；
氯化钠(NaCl) 5.0 g；
琼脂 15.0 g；
水 1 000 mL。

注：若凝固不充分，可添加 15 g~18 g 琼脂。

6.3.2 制备

搅拌调节 pH 至 7.2 ± 0.2 (室温)。在电热板或沸水浴中搅拌加热至成分完全溶解。用高压灭菌锅(5.4)在 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。将培养基冷却并摇匀，倾倒至培养皿中。

6.4 SCDLP 培养基

6.4.1 成分

酪蛋白胨 17.0 g;
大豆蛋白胨 3.0 g;
氯化钠(NaCl) 5.0 g;
磷酸二氢钾 2.5 g;
葡萄糖 2.5 g;
卵磷脂 1.0 g;
吐温 80 7.0 g;
水 1 000 mL。

若中和能力不足,吐温 80 或卵磷脂的用量可进行调整,或添加其他中和剂。使用其他中和剂应记录名称和浓度。

注:可选抗菌中和剂的选择评价信息见 ASTM E 1054 和 EN 1040。

6.4.2 制备

搅拌调节 pH 至 7.2 ± 0.2 (室温),用高压灭菌锅(5.4)在 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。

6.5 氯化钠溶液(生理盐水)

6.5.1 成分

氯化钠(NaCl) 8.5 g;
水 1 000 mL。

6.5.2 制备

搅拌调节 pH 至 6.9 ± 0.2 (室温),用高压灭菌锅(5.4)在 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。

7 试验微生物

7.1 试验菌种

以下菌种用于所有抗菌试验。

- a) 金黄色葡萄球菌(AS 1.89 或 ATCC 6538)。
- b) 肺炎克雷伯氏菌(AS 1.1736 或 ATCC 4352)。

注 1: 根据客户要求,也可选用其他菌株作为试验菌株。但由于抗菌剂的不同效果,所选菌株需至少包括一种革兰氏阴性菌和一种革兰氏阳性菌。

试验菌株应属于世界培养物保藏协会(WFCC)。

菌种及其来源应在试验报告中注明。

注 2: AS 属于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),ATCC 是美国菌种保藏中心。

7.2 菌种保藏

将菌种接种于营养琼脂培养基(NA)(6.3)上,在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下培养 24 h。在 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ 下保藏(不应超过 1 个月),作为保藏菌种。每个月转接一次。

菌种可依据供应商规范或 EN 12353 进行保藏。

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

8 接种液制备

使用无菌接种环,将一个菌落(7.2)移至 20 mL 营养肉汤培养基(NB)(6.2)中,在(37±2)℃摇床(5.11)中培养约 16 h(隔夜培养)。使用显微镜或其他方法估算细菌的数量。准备含有 1%营养肉汤(NB)(6.2)的生理盐水(6.5),用其制备细菌浓度为(2.5~10)×10⁵ CFU/mL 的菌悬液。

如有必要,接种液在冰上保存,并在 4 h 内使用。

9 试样制备

9.1 总则

仅对声明抗细菌的部件或材料进行测试。若整鞋声明抗细菌,则对鞋的主要部件包括帮面、衬里、内底、内垫、外底分别进行测试。

若仅声明一个部件中的一种材料抗菌,如果可以分离,则对材料进行测试。否则应测试整个部件。

所取样的材料,面积应占材料或部件面积的 80%以上。若单一材料面积不足 80%,需裁取 2 种主要材料。

试样可直接从鞋材上裁取。

9.2 试样

试样的面积约 500 mm²。对于方法 A(见附录 A),试样厚度应小于 2.0 mm。试样的面积和重量应在试验报告中注明。若试样面积较大,应按比例增加菌悬液的体积。

若不可能减少试样的厚度(例如,试样较厚且不能在不改变其关键特性的情况下进行裁切,如表面形态会影响细菌与表面的相互作用),需在试验报告中注明厚度。

对于每个菌种,每种材料或部件至少需要 6 组试样。

9.3 试样预处理

仅在微生物负载高(污染)等必要时进行试样预处理。

如需进行灭菌,要在报告中说明,灭菌方法不能影响材料本身的抗菌性能。

注:试样和对照样可以用灭菌锅(5.4)在(121±2)℃和 103 kPa 条件下灭菌 15 min,或者紫外线[紫外灯(5.6),30 W,距样品 300 mm,每侧灭菌 1 h]及其他合适的方法灭菌。

10 试验方法

表 1 列出了不同情况所适用的试验方法。

方法 A(见附录 A)仅用于吸水性材料。方法 B(见附录 B)仅用于非吸水性材料。方法 C(见附录 C)适用于吸水性及非吸水性材料,或组合型材料。

注:对于单一材料,推荐使用方法 A 和方法 B。

表 1 试验方法

序号	材料类型	试验方法	备注
1	吸水性	菌液吸收法(附录 A)	织物和皮革
2	非吸水性	膜接触法(附录 B)	微孔材料,如贴膜革或重革,合成或人造材料,EVA 发泡材料,PU 发泡材料;致密材料,如塑料或包膜材料
3	吸水性和非吸水性	振荡法(附录 C)	不同的鞋类部件材料;成型材料;具有非溶出抗菌技术的材料

11 结果表达

鞋类或鞋类部件抗菌性能用抗菌率分别表示。

依据式(1)计算抗菌率(R),或依据式(2)计算 R^* 。结果保留 3 位有效数字,用百分数表示。

$$R = \frac{C_t - T_t}{C_t} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C_t ——24 h 或规定培养时间后,3 个对照样菌落数的平均值,用 CFU/mL 表示。

T_t ——24 h 或规定培养时间后,3 个试样菌落数的平均值,用 CFU/mL 表示。

若没有合适的对照样,用以 T_0 代替式(1)中 C_t 的式(2)来计算 R^* :

$$R^* = \frac{T_0 - T_t}{T_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

T_0 ——接种 0 h 后 3 个试样菌落数的平均值,用 CFU/mL 表示。

12 试验报告

试验报告至少应包括以下内容:

- a) 本标准编号;
- b) 试样及其位置、面积和重量;
- c) 不同材料所用的试验方法;
- d) 试样制备,包括不同样品的预处理方法(如果有),比如灭菌方法;
- e) 菌种,不同材料试验菌种的编号和活菌数量;
- f) 接种液中添加的表面活性剂及其浓度;
- g) 结果有效性的判断;
- h) 不同材料或部件的抗菌率;
- i) 与本试验方法的任何偏差。

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

附 录 A

(规范性附录)

菌液吸收法

A.1 试验步骤

A.1.1 接种

将 6 个试样和 6 个对照样分别置于无菌广口瓶(5.7)中。移取 (1.0 ± 0.1) mL 第 8 章制备的接种液于样品上,塞紧瓶塞。使用样本的数量取决于样品类型。

若没有合适的对照样,在没有样品的广口瓶中接种作为对照样来判断试验的有效性。

A.1.2 接种后洗脱(0 h)

在 3 个接种后的试样和对照样(如果有)中加入 20 mL SCDLP 培养基(6.4)。塞紧瓶塞,用约 30 cm 的摆幅晃动 30 s,或使用 5 s \times 5 圈的漩涡振荡器(5.9)进行混合,将细菌洗脱至培养基中。

A.1.3 培养

将 3 个接种后的试样和对照样(如果有)在 (37 ± 2) °C 条件下培养 (24 ± 1) h。

A.1.4 培养后洗脱(24 h)

依据 A.1.2 进行。

A.1.5 活菌数量的测定——表面培养

用无菌移液管移取 1 mL A.1.2 以及 A.1.4 制备的洗脱液至试管中,加入 (9.0 ± 0.1) mL 生理盐水(6.5)摇匀。用生理盐水(6.5)稀释洗脱液制备 10 倍梯度溶液。

在营养琼脂(NA)(6.3)上接种各梯度缓冲液 100 μ L,平行双份,将营养琼脂培养基倒置培养 24 h~48 h。

培养后,记录数量在 30~300 之间的菌落数。若菌落数量低于 30,仍记录平皿中菌落数量。若平皿中没有菌落,则数量记为 <1 。

A.2 结果表达

A.2.1 活菌数的计算

用式(A.1)计算每一样品的活菌数量:

$$M = Z \times B \times 20 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

M ——每一样品的活菌数量;

Z ——两平皿上活菌数的平均值;

B ——稀释倍数;

20 ——洗脱液的体积,单位为毫升(mL)。

A.2.2 有效性判断

3 个对照样接种和培养后菌落数极差 $\Delta(\lg C) \leq 1$ 。对照样在接种后菌落数平均值至少为 1×10^5 CFU。在平板计数法中,用式(A.2)计算细菌生长值(F), F 应 ≥ 0 。

$$F = \lg C_t - \lg C_0 \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

F ——对照样细菌生长值;

C_t ——3 个对照样培养后的菌落平均值,用 CFU/mL 表示。

C_0 ——3 个对照样接种后的菌落平均值,用 CFU/mL 表示。

当以上条件都满足时,试验结果有效。若不满足所有的条件,试验结果无效,应重新测试。

A.2.3 抗菌率的计算

依据第 11 章计算抗菌率。

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

附录 B
(规范性附录)
膜接触法

B.1 样品制备**B.1.1 试样**

若样品量充足,尽量取比 9.2 规定尺寸大的样品。试样尺寸应在试验报告中注明。

注:根据样品组成,在覆盖膜放置于样品上时,将接种液涂布于培养皿上。

B.1.2 覆盖膜

覆盖膜的尺寸和形状应与试样和对照样相匹配。应保证接种液不能从膜边缘溢出。覆盖膜应比样品小。实际尺寸和形状需在报告中注明。

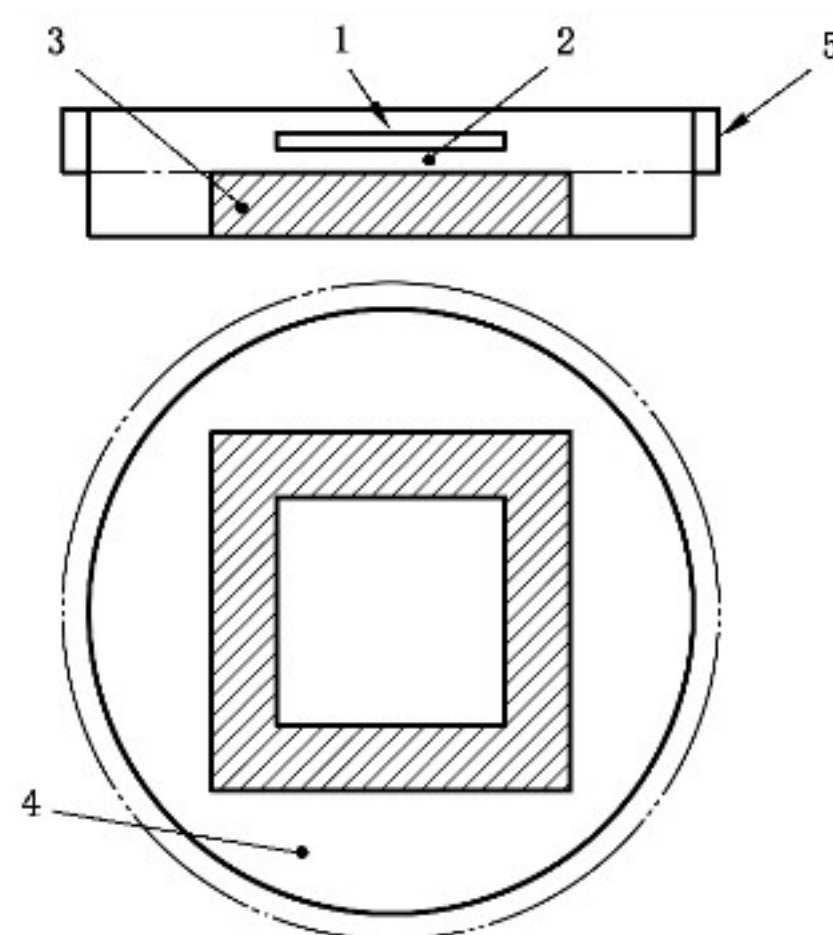
覆盖膜由 PE、PP、PET 等不影响细菌生长的材料制成。其厚度约为 0.05 mm~0.1 mm。

B.1.3 样品的灭菌(可选)

作为 9.3 给出的一个可选步骤,可依据以下要求进行。用 70%乙醇溶液擦拭对照样与试样表面。5 min 后,用无菌蒸馏水冲洗,自然晾干。不用乙醇处理的样品可直接用无菌蒸馏水冲洗,或使用其他不影响抗菌效果和试验结果的灭菌方法。

B.2 试验步骤**B.2.1 接种**

将 6 个试样和 6 个对照样分别置于培养皿中,试验面向上。准确移取 0.1 mL~0.2 mL 菌悬液至试验表面。用无菌夹钳将覆盖膜(5.8)移至试验面上,不能有气泡,以保证接种液能均匀接触样品。盖上皿盖。见图 B.1。



说明:

- 1——覆盖膜;
2——接种液;
3——试样;

- 4——培养皿;
5——皿盖。

图 B.1 接种及覆盖膜的位置

若没有合适的对照样,在没有样品的培养皿中接种作为对照样来判定结果有效性。

B.2.2 接种后洗脱(0 h)

在接种后的 3 个试样和空白样的培养皿中,分别添加 10 mL SCDLP 培养基(6.4)。用二维或三维振荡器(5.10)以 50 r/min 的频率振荡 5 min,使细菌从试样或对照样上洗脱下来。

B.2.3 培养

将 3 个试样和 3 个对照样在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度不低于 90%的条件下培养 $(24 \pm 1)\text{h}$ 。

B.2.4 培养后洗脱(24 h)

依据 B.2.2 进行。

B.2.5 活菌数量的测定

依据 A.1.5 测定 B.2.2 或 B.2.4 每个样品洗脱液中的活菌数量。

B.3 结果表达

B.3.1 菌落数的计算

用式(B.1)计算每一试样的活菌数量:

$$M = Z \times B \times 10 \times I \quad \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

式中:

M ——每一样品的活菌数量;

Z ——两平皿上活菌数的平均值;

B ——稀释倍数;

10 ——洗脱液的体积,单位为毫升(mL);

I ——稀释因子,0.1 mL 接种液为 10,或 0.2 mL 接种液为 5。

B.3.2 有效性判断

a) 对照样在接种后菌落数平均值至少为 1×10^4 CFU。

b) 3 个对照样接种后活菌数量的对数值需满足式(B.2)的要求:

$$\frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\text{mean}}} \leq 0.2 \quad \dots\dots\dots (\text{B.2})$$

式中:

L_{\max} ——最大活菌数的常用对数值(基于 10 的对数);

L_{\min} ——最小活菌数的常用对数值;

L_{mean} ——平均活菌数的常用对数值。

对照样不应有明显抗菌性能。培养后每个对照样的活菌数不应小于接种后活菌数的 1/10。若满足以上条件,该试验结果有效。否则,试验结果无效,需重新进行试验。

B.3.3 抗菌率计算

依据第 11 章计算抗菌率。

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

附 录 C

(规范性附录)

振 荡 法

C.1 试验步骤

C.1.1 接种

将 6 个试样和 6 个对照样分别置于 250 mL 无菌锥形瓶中。

移取 (50.0 ± 0.5) mL 第 8 章制备好的接种液于每个试样和对照样。

若没有合适的对照样,在没有样品的无菌锥形瓶中接种作为对照样来判断试验的有效性。

C.1.2 接种后洗脱(0 h)

从 3 个接种后的试样和对照样中分别移取 2 mL 溶液至含有 18 mL SCDLP 培养基(6.4)的无菌烧瓶中,以中和抗菌活性。

以约 30 cm 的摆幅晃动 30 s,或使用 5 s×5 圈的漩涡振荡器(5.9)进行混合。

C.1.3 培养

将接种后的 3 个试样和 3 个对照样在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、120 r/min 条件下,于摇床(5.11)中培养 (24 ± 1) h。

C.1.4 培养后洗脱(24 h)

依据 C.1.2 进行。

C.1.5 活菌数量的测定

依据 A.1.5 测定 C.1.2 或 C.1.4 每个样品洗脱液中的活菌数量。

C.2 结果表达

C.2.1 活菌数的计算

用式(C.1)计算每一样品的活菌数量。

$$M = Z \times B \times 10 \quad \dots\dots\dots(\text{C.1})$$

式中:

M ——每一样品的活菌数量,用 CFU/mL 表示;

Z ——两平皿上活菌数的平均值;

B ——稀释倍数;

10 ——中和剂的稀释比例。

C.2.2 有效性判断

3 个对照样接种和培养后菌落数极差 $\Delta(\lg C) \leq 1$ 。对照样在接种后菌落数平均值至少为 1×10^5 CFU/mL。在平板计数法中,用式(C.2)计算细菌生长值(F), F 应 ≥ 0 。

$$F = \lg C_t - \lg C_0 \quad \dots\dots\dots(\text{C.2})$$

式中:

F ——对照样细菌生长值;

C_r ——3个对照样培养后的菌落平均值,用 CFU/mL 表示。

C_0 ——3个对照样接种后的菌落平均值,用 CFU/mL 表示。

当以上条件都满足时,试验结果有效。若不满足所有的条件,试验结果无效,应重新测试。

C.2.3 抗菌率的计算

依据第 11 章计算抗菌率。

附 录 D
(资料性附录)
比对试验结果

D.1 背景

2010 年,中国、德国和英国的几家实验室进行了第一轮比对试验。根据试验结果完善了试验方法。
2011 年,中国、德国、英国、葡萄牙和西班牙的几家实验室用六种样品进行了第二轮比对试验,通过 D.3 中的结论确认了试验方法。

D.2 样品测试

以表 D.1 中的试验方法对下列样品进行了试验。

表 D.1 样品测试

样品	试验方法
1# 织物	A(附录 A),C(附录 C)
2# 发泡材料	A(附录 A),C(附录 C)
3# EVA	B(附录 B)
4# PU 外底/中底	B(附录 B),C(附录 C)
5# PU 涂层织物(灰色)	B(附录 B)
6# PU 涂层织物(灰色)	B(附录 B)
注:样品 5# 和 6# 的抗菌性不同。	

D.3 比对试验结论

- 对于样品 1 和样品 2,无论用方法 A(附录 A)还是方法 C(附录 C),各实验室试验结果的重复性都很好。这意味着采用试验方法 A 或 C 的试验结果(R 和 R^*)是相似的。
- 样品 3 以方法 B 进行试验的结果(R 和 R^*)可重复性与样品 1 和样品 2 的一样好。
- 样品 4 以方法 B 进行试验,如果用高压灭菌器做灭菌处理, R 和 R^* 都是 0.0%,但如果用酒精做灭菌处理, R^* 是 64.4%。因此,可以得出结论:不同的灭菌方法会影响试验结果。抗菌样品宜尽可能避免灭菌处理。
- 每种材料适用的试验方法宜由有经验的技术人员确定。
- 因为不同的灭菌处理影响试验结果,样品 4 和样品 5 以方法 B 进行试验的结果相似。
- 所有参加对比试验的实验室都报告样品 6 的抗菌性差。

参 考 文 献

- [1] ISO 5725 (all parts), Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
 - [2] ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs—General requirements and guidance for microbiological examinations
 - [3] ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guidelines on preparation and production of culture media—Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
 - [4] ISO/TS 11133-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Guidelines on preparation and production of culture media—Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media
 - [5] ISO 20645, Textile fabrics—Determination of antibacterial activity—Agar diffusion plate test
 - [6] ISO 20743, Textiles—Determination of antibacterial activity of textile products
 - [7] ISO 22196, Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces
 - [8] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
 - [9] IEC 60068-2-10, Environmental testing—Part 2-10: Tests—Test J and guidance: Mould growth
 - [10] EN 1040, Chemical disinfectants and antiseptics—Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics—Test method and requirements (phase 1)
 - [11] EN 12353, Chemical disinfectants and antiseptics—Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, sporicidal and fungicidal activity
 - [12] ASTM E 1054, Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents
 - [13] ASTM E 2149-10, Standard test methods for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions
 - [14] JIS L1902—2008, Testing for antibacterial activity and efficacy on textiles products
 - [15] AATCC Test Method 100—2004, Antibacterial Finishes on Textile Materials; Assessment of
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

鞋类和鞋类部件
抗细菌性能评估试验方法

GB/T 38017—2019/ISO 16187:2013

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址:www.spc.org.cn

服务热线:400-168-0010

2019年8月第一版

*

书号:155066·1-63245

版权专有 侵权必究



GB/T 38017-2019