



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3840.1—2014

鞋类和鞋材 抗菌性能测试方法

Footwear and footwear components—
Test methods to assess antibacterial activity

2014-01-13 发布

2014-08-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

前 言

SN/T 3840《鞋类和鞋材》共分为 2 部分：

——第 1 部分：抗细菌性能测试方法；

——第 2 部分：抗真菌性能测试方法。

本部分为 SN/T 3840 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：陈学灿、郑晶、郑麟毅、黄晓蓉、吴谦、董健、郑洁、陈彬、林杰。

鞋类和鞋材 抗菌性能测试方法

1 范围

SN/T 3840 的本部分规定了评估鞋类和鞋材抗菌性能的定量测试方法。
本部分适用于抗菌鞋材和抗菌鞋类产品。

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。

EN 12353 化学消毒剂和防腐剂、杀菌剂、杀孢子剂和杀真菌剂活性测定用试验有机体的保存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌性能 antibacterial activity

抗菌材料防止或减缓细菌生长,减少或杀死细菌的性能。

3.2

对照样 contrast samples

用于同一测试未经过抗菌处理的相同材料。

4 设备和材料

4.1 振荡培养箱:(37 ± 2)℃,转速(120 ± 10)r/min。

4.2 二级生物安全柜。

4.3 恒温培养箱:(37 ± 2)℃。

4.4 高压灭菌器:温度可保持在 121℃,压力保持在 103 kPa。

4.5 恒温恒湿培养箱:温度可保持在 $37\text{℃}\pm 2\text{℃}$,相对湿度能保持在 90%。

4.6 旋涡振荡器。

4.7 紫外灯。

4.8 广口瓶:100 mL,带盖,可高压灭菌。

4.9 覆盖膜:不妨碍细菌生长和水分吸收的聚乙烯薄膜,厚度 0.05 mm~0.10 mm。

4.10 振荡器:二维或三维。

4.11 冰箱。

4.12 显微镜。

5 培养基和试剂

5.1 计数琼脂(EA),培养基和试剂的配制方法见附录 A。

- 5.2 营养琼脂(NA)。
- 5.3 营养肉汤(NB)。
- 5.4 SCDLP 培养基。
- 5.5 生理盐水(0.85%氯化钠溶液)。

6 试验菌种

6.1 试验菌种

试验菌种如下：

- a) 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* AS 1.89 or ATCC 6538;
- b) 肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* AS 1.1736 or ATCC 4352。

6.2 菌种的保存

取典型菌落接种在营养琼脂(5.2)斜面试管内,在 $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h。将斜面试管贮存于 $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 冰箱内,作为保存菌,每月传代一次。保存菌种传代次数不超过 10 代或保存期不超过一个月,否则应丢弃保存菌种。

菌种也可按供应商推荐的方式或 EN 12353 要求保存。

7 试验菌液的培养和制备

用接种环取营养琼脂培养基上的典型菌落接种于 20 mL 营养肉汤(5.3)中,在 $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 振动恒温培养箱内培养 16 h,用显微镜观察或者其他方法估算菌落数量。用加入 1% 营养肉汤的生理盐水溶液来调节菌液浓度,试验菌落浓度为 $2.5\times 10^5\text{ CFU/mL}\sim 10\times 10^5\text{ CFU/mL}$ 。

8 测试样制备

8.1 测试样的准备

一种抗菌材料占鞋内腔表面积的 80% 以上的,仅取该材料的测试样。如果一种抗菌材料面积小于鞋腔表面积的 80%,则应对其中两种主要抗菌材料进行分别取样。

从成鞋中制备测试样时,应从与脚直接接触的部位取样。测试样面积约为 500 mm^2 ,厚度不大于 2 mm,测试样共需要 6 份。应记录测试样的面积和重量。

8.2 测试样的预处理

测试样的预处理是可选操作,仅在高生物负荷(污染)的情况下是必要的。

预处理可采用高温高压灭菌或紫外线消毒。高温高压灭菌时测试样和对照样在 $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 和 103 kPa 条件下高温高压灭菌 15 min;紫外线消毒时,采用 30 W 紫外线灯,距离样品 300 mm,样品每侧各 1 h。

采用预处理的,应当测试报告中详细描述灭菌方法。

8.3 对照样的制备

对照样可采用未经抗菌处理的相同材料制备。若这种材料不可获得,可采用未经抗菌处理的 100% 棉织物。通常采用色牢度试验用的棉标准贴衬织物,经高温蒸煮并用蒸馏水洗涤作为对照样。对

照样面积与测试样相同。

9 检测方法

不同材质的样品使用的检测方法见表 1。

表 1 各种鞋材检测方法列表

序号	鞋材类别	检测方法	材料示例
1	吸水性	静态竞争测试法,见附录 B	纺织品和皮革
2	非吸水性	膜接触测试法,见附录 C	有微孔的材料:如合成革,EVA 发泡材料,PU 发泡材料等。 致密材料:如致密型塑料或橡胶材料等
3	非溶出性	动态竞争测试法,见附录 D	固定型抗菌剂的制作的抗菌材料

10 结果表达

抗菌性能以抑菌率来表示,对于鞋类中的不同抗菌材料应分别计算。按照式(1)计算抑菌率(R),数值以百分率(%)计,保留三位有效数字。

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

式中:
R —— 抑菌率;
C_t —— 3 个对照样接种菌液并培养后测得的细菌数的平均值,单位为 CFU 每毫升(CFU/mL);
T_t —— 3 个测试样接种菌液并培养 24 h 后或者一定的培养时间内测得的细菌数的平均值,单位为 CFU 每毫升(CFU/mL)。
如果没有对照样,用 T₀ 代替式(1)中 C_t。

11 检测报告

检测报告应至少包含下列信息:

- a) 检测标准名称;
- b) 样品和对照样的描述;
- c) 样品的预处理(例如,灭菌方法等);
- d) 试验菌种名称、编号、代数及接种菌浓度;
- e) 试验方法;
- f) 试验温湿度;
- g) 抑菌率;
- h) 试验有效性的评价;
- i) 任何偏离本方法的情况;
- j) 试验人员和试验日期。

SN/T 3840.1—2014

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂的配制

A.1 计数琼脂(EA)

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 到 7.0 ± 0.2 。分装试管或锥形瓶,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 营养琼脂(NA)

A.2.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

除琼脂外,将其余成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 到 7.2~7.4,加入琼脂,加热溶解,分装适宜容器,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.3 营养肉汤(NB)

A.3.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

按上述成分混合溶解于蒸馏水中,调节 pH 到 7.2~7.4,加热溶解,分装适宜容器,121 ℃ 高压灭菌

15 min。

A.4 SCDLP 培养基

A.4.1 成分

酪蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	7.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将上述各成分加热煮沸至完全溶解,调节 pH 到 7.2 ± 0.1 ,分装适宜容器,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.5 生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

附 录 B
(规范性附录)
静态竞争测试法

B.1 测试程序

B.1.1 接种

取 6 个测试样和 6 个标准空白对照样分别放入经消毒灭菌的广口瓶中,用移液器准确移取已制备的菌液(7)(1.0 ± 0.1) mL 接种到每个广口瓶中,与样品混合均匀,盖好瓶盖。使用的色板样本数量根据样品类型而定。

如果没有标准空白对照样,则用不含样品的空广口瓶作为对照,以控制测试样的有效性。

B.1.2 接种后立即洗脱(T_0 时刻)

在 3 个测试样和 3 个标准空白对照样(如果有对照样品)中加入 20 mL SCDLP 培养基(5.4)。盖紧瓶盖,用手摇动 30 s,摆幅约 30 cm,或者用旋涡振荡器振荡 5 次,每次 5 s,将细菌洗脱。

B.1.3 培养

将其余 3 个测试样和 3 个标准空白对照样(如果有对照样)放入(37 ± 2)℃ 中培养(24 ± 1)h。

B.1.4 培养后的洗脱

在 B.1.3 培养后的测试样和对照样洗脱过程同 B.1.2。

B.1.5 菌落数的测定——平板倾注法

用经灭菌的移液器分别吸取 1.0 mL B.1.2 和 B.1.4 的洗脱液,加入装有(9.0 ± 0.1)mL 生理盐水(5.5)的试管中,充分振荡。用生理盐水稀释洗脱液,将试管中的洗脱液分别作 10 倍系列稀释液。

取 100 μ L 各系列稀释液分别加到两个计数琼脂培养基平板中。待培养基凝固后,倒置于培养皿培养 24 h~48 h。

培养后,取菌落数在 30 CFU 至 300 CFU 稀释度的培养皿进行菌落计数。若最小稀释倍数的菌落数<30,则按实际数量记录;若无菌落生长,则菌落数记为“<1”。

B.2 结果的表达

B.2.1 细菌数的计算

按式(B.1)计算每个测定样品中的菌落数:

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

式中:

- M —— 每个试样中的细菌数,单位为 CFU/mL;
- Z —— 两个培养皿菌落数的平均值,单位为 CFU/mL;
- B —— 稀释倍数;
- 20 —— 洗脱液的体积,单位为毫升 (mL)。

B.2.2 试验有效性的评价

接种后和培养后的 3 个对照样之间的极差值 $\lg \Delta C \leq 1$; 接种后的试验菌落数应大于 (1×10^5) CFU。平板计数法中, 按式(B.2)计算细菌增长值 F 。

$$F = \lg C_t - \lg C_o \quad \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

F ——对照样的细菌增长值;

C_t ——3 个对照样接种并培养 18 h~24 h 后测得的细菌数的平均值, 单位为 CFU/mL;

C_o ——3 个对照样接种后立即测得的细菌数的平均值, 单位为 CFU/mL。

$F \geq 0$ 时, 判定试验有效, 否则判定试验无效, 应重新测试。

B.2.3 抑菌率的计算

按式(B.3)计算抑菌率, 数值以百分率(%)计, 保留三位有效数字。

$$R = \frac{C_t - T_t}{C_t} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.3)$$

式中:

R ——抑菌率;

C_t ——3 个对照样接种菌液并培养后测得的细菌数的平均值, 单位为 CFU/mL;

T_t ——3 个测试样接种菌液并培养 24 h 后或者一定的培养时间内测得的细菌数的平均值, 单位为 CFU/mL。

如果没有对照样, 用 T_o 代替式(B.3) C_t , T_o 是对 3 个样品接种后立即测定的菌落数的平均值, 单位为 CFU/mL。

附 录 C
(规范性附录)
膜接触测试法

C.1 试样制备

C.1.1 样品制备

制取形状大小合适的薄膜贴于测试样或空白对照样。制备时注意接种菌悬液不能从覆盖膜的边缘漏出,覆盖膜应略小于样品。薄膜的实际形状大小应在测试报告中说明。

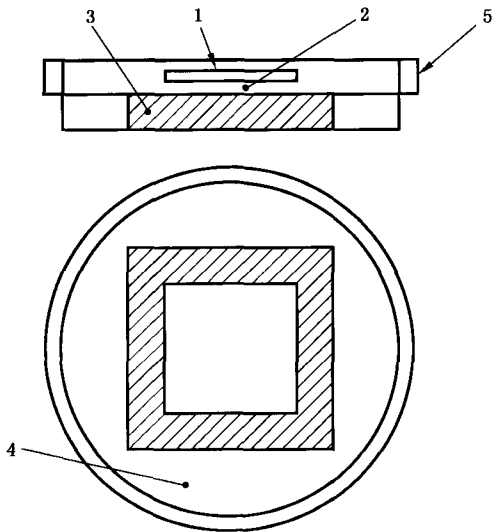
C.1.2 样品的灭菌(可选)

如果需要对样品进行预处理,可选以下步骤:取对照样和测试样,用 70%乙醇溶液擦拭其表面,5 min 后用无菌蒸馏水冲洗干净,自然干燥。对不适于消毒剂处理的样品,可根据样品特性直接用无菌蒸馏水冲洗或采用其他方法消毒,但不得影响其抗菌性能和干扰试验结果。

C.2 测试步骤

C.2.1 接种

取 6 个测试样和 6 个空白对照样,分别放入灭菌培养皿中,保持测试表面向上。用移液器准确移取 (0.1~0.2) mL 已制备的菌液(7),缓慢地滴加到样品表面。用无菌镊子夹起覆盖膜平铺在样品表面,不要在表面有任何气泡产生,使接种菌液与样品表面紧紧接触,均匀覆盖,盖好培养皿盖子。如图 C.1 所示。



- 说明:
- 1——覆盖膜;
 - 2——试验菌液;
 - 3——测试样;
 - 4——培养皿;
 - 5——培养皿盖。

图 C.1 试样接种和覆盖膜放置示意图

如果没有对照样,直接将菌液滴加于不含样品的空培养皿作为对照,以控制测试样的有效性。

C.2.2 接种后立即洗脱(T_0 时刻)

在已接种菌液的3个测试样培养皿或者3个对照样培养皿中分别加入10 mL SCDLP培养基(5.4)后,将培养皿放在二维或三维振荡器上轻轻振荡5 min,将样品和覆盖膜上细菌洗脱下来。

C.2.3 培养

将接种菌液的其余6个培养皿(3个对照样和3个测试样),在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度不小于90%的条件下培养 $(24 \pm 1)\text{h}$ 。

C.2.4 培养后洗脱(24 h)

在培养后的各培养皿(C.2.3)中,分别加入SCDLP培养基10 mL,重复C.2.2实验步骤。

C.2.5 菌落数的测定

按B.1.5方法测定C.2.2和C.2.4中各洗脱液中的细菌数。

C.3 结果的表示

C.3.1 细菌数的计算

按式(C.1)计算每个测定样品中的菌落数:

$$M = Z \times B \times 10 \times I \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

M ——每个试样中的细菌数,单位为CFU/mL;

Z ——两个培养皿菌落数的平均值,单位为CFU/mL;

B ——稀释倍数;

10 ——洗脱液的体积,单位为毫升(mL);

I ——稀释因子。

如果接种0.1 mL, $I=10$;如果接种0.2 mL, $I=5$ 。

C.3.2 试验有效性的评价

试验满足以下条件,判断为有效,否则试验判断为无效,应重新测试:

- a) 初始空白对照样的菌落数平均值应不小于 $(1.0 \times 10^4)\text{CFU}$ 。
- b) 接种后和培养后的3个对照样之间,细菌数的对数值应满足式(C.2)要求:

$$\frac{L_{\text{最大}} - L_{\text{最小}}}{L_{\text{平均}}} \leq 0.2 \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

式中:

$L_{\text{最大}}$ ——活菌数的最大对数值,单位为CFU/mL;

$L_{\text{最小}}$ ——活菌数的最小对数值,单位为CFU/mL;

$L_{\text{平均}}$ ——三个样片的活菌数对数的平均值,单位为CFU/mL。

- c) 对照样不应有明显的抗菌作用。经接触一定时间后对照样回收菌落数不应低于“0”接触时间回收菌落数的十分之一。

C.3.3 抑菌率计算

按B.2.3方法计算抑菌率。

附 录 D

(规范性附录)

动态竞争测试法

D.1 测试步骤

D.1.1 接种

取 6 个测试样和 6 个标准空白对照样分别放入 250 mL 已消毒灭菌的三角烧瓶中,用移液器准确移取制备好的菌液(7)(50 ± 0.5)mL 分别接种到每个三角烧瓶中。

如果没有标准空白对照样,则在不含样品的无菌三角烧瓶中直接接种作为对照,以保证测试样的有效性。

D.1.2 接种后洗脱(T_0 时刻)

用移液器从 3 个测试样和 3 个标准空白对照样中分别吸取 2 mL 到盛有 18 mL SCDLP 培养基的消毒灭菌的烧瓶中以中和抗菌活性。

用手摇动烧瓶,摆幅约 30 cm,摇 30 s,或者用旋涡振荡器振荡混合 5 次,每次 5 s,将细菌洗脱。

D.1.3 培养

将其余 3 个测试样和 3 个对照样放入振荡转速为 120 r/min 的振荡培养箱中培养(24 ± 1)h,温度为(37 ± 2)℃。

D.1.4 培养后洗脱(24 h)

在 D.1.3 培养后的测试样和对照样洗脱步骤同 D.1.2。

D.1.5 活菌落数的测定

用灭菌移液器分别吸取 1 mL D.1.2 和 D.1.4 的洗脱液,加入装有(9.0 ± 0.1)mL 生理盐水(5.5)的试管内充分振荡。用生理盐水稀释洗脱液,将 D.1.2 和 D.1.4 的洗脱液分别作 10 倍系列稀释液。取 100 μ L 各系列稀释液分别加到两个计数琼脂培养基平板中。待培养基凝固后,倒置于培养皿中培养 24 h~48 h。培养后,取菌落数在 30 CFU~300 CFU 稀释度的培养皿进行菌落计数。若最小稀释倍数的菌落数 <30 ,则按实际数量记录;若无菌落生长,则菌落数记为“ <1 ”。

D.2 结果的表示

D.2.1 活菌落数的计算

按式(D.1)计算每个测定样品中的活菌落数:

$$M = Z \times B \times 10 \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

M ——每个试样中的活菌落数,单位为 CFU/mL;

Z ——两个培养皿中活菌落数的平均值,单位为 CFU/mL;

B ——稀释倍数;

10 ——中和稀释因子。

D.2.2 试验有效性的评价

试验满足以下条件,判断为有效,否则试验判断为无效,应重新测试:

- 接种后和培养后的 3 个空白对照样之间的极差值应满足 $\lg \Delta C \leq 1$;
- 接种后立即测定的空白对照样的试验菌落数应大于 (1×10^5) CFU;
- 平板计数法中,按式(D.2)计算细菌生长率 F :

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

式中:

F ——空白对照样的细菌生长率;

C_t ——空白对照样接种并培养 24 h 后测得的细菌数的平均值,单位为 CFU/mL;

C_0 ——空白对照样 T_0 时刻初始加菌量的平均值,单位为 CFU/mL。

只有当 $F \geq 0$ 时,判定试验有效,否则判定试验无效,应重新测试。

D.2.3 抑菌率的计算

按式(D.3)计算抑菌率,数值以百分率(%)计,保留三位有效数字。

$$R = \frac{C_t - T_t}{C_t} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (D.3)$$

式中:

R ——抑菌率;

C_t ——3 个对照样接种菌液并培养后测得的细菌数的平均值,单位为 CFU/mL;

T_t ——3 个待测抗菌性能试样接种菌液并培养 24 h 后或者一定的培养时间内测得的细菌数的平均值,单位为 CFU/mL。

如果没有对照样,用 T_0 代替式(D.3) C_t , T_0 是对 3 个样品接种后立即测定的菌落数的平均值,单位为 CFU/mL。