МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 20645— 2014

Изделия текстильные

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Диффузное испытание в чашках с агаровой средой

(ISO 20645:2004, Textile products — Determination of antibacterial activity — Diffusive test in agar plate, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол от 14 ноября 2014 г. № 72-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 мая 2016 г. № 376-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 20645—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 20645:2004 «Изделия текстильные. Определение антибактериальной активности. Диффузное испытание в чашках с агаровой средой» («Textile fabrics — Determination of antibacterial activity-agar diffusion plate test», IDT).

Международный стандарт разработан международным Техническим комитетом ISO/TC 38 «Текстиль»

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Меры безопасности 1
4 Сущность метода 1
5 Оборудование, реагенты и питательные среды, средства измерений 2
6 Тестовые бактерии 2
7 Подготовка культур бактерий 3
8 Подготовка образцов для испытаний 3
9 Проведение испытаний 4
10 Результаты испытаний 4
11 Обработка результатов 5
12 Протокол испытаний 5
Приложение А (справочное) Специальные экземпляры и испытания 6
Приложение В (справочное) Европейские поставщики АТСС 7
Библиография 8

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Изделия текстильные

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Диффузное испытание в чашках с агаровой средой

Textile products. Determination of antibacterial activity.
Diffusive test in agar plate

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения антибактериальной активности текстильных материалов (далее — метод).

Настоящий стандарт распространяется на все виды воздухопроницаемых текстильных материалов для испытания гигиенических отделок или антибактериальных компонентов, введенных в волокно.

Метод не подходит для тестирования материалов с антибактериальной отделкой, которая может вступить в реакцию с агаром.

Примечание — Другие, не текстильные материалы также можно тестировать данным методом при соответственной их адаптации.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

2.1 **антибактериальная активность** (antibacterial effect): Подавление роста бактерий в нормальных условиях.

3 Меры безопасности

Метод требует соблюдения условий, которые способствуют росту бактерий. Так как бактерии могут быть патогенными, испытания должны проводиться обученным персоналом при соблюдении надлежащих мер безопасности.

4 Сущность метода

Экземпляры испытуемого материала следует поместить на двухслойные агаровые пластинки. Нижний слой состоит из питательной среды, лишенной бактерий, а верхний слой привит отобранными бактериями. Текстильный материал испытывается с обеих сторон.

Уровень антибактериальной активности оценивается исследованием степени роста бактерий в зоне контакта между агаром и испытуемым экземпляром и при наличии подавления бактерий вокруг образца.

Издание официальное

5 Оборудование, реагенты и питательные среды, средства измерений

5.1 Оборудование

5.1.1 Термостат, способный поддерживать температуру (37 ± 1) °С.
5.1.2 Автоклав, способный функционировать при температуре 121 °С и давлении 205 кПа (2,05 бар).
5.1.3 Баня водяная, способная поддерживать температуру (45 ± 2) °С.
5.1.4 Шейкер для пробирок.
5.1.5 Микроскоп с 20-кратным увеличением и имеющий подсветку снизу.
5.1.6 Чашки Петри из стекла или пластмассы с внутренним диаметром 9 см.

5.2 Реагенты и питательные среды

5.2.1 Реагенты

Используют реагенты только аналитического качества и дистиллированную воду или воду одинаковой чистоты.

5.2.2 Питательные среды

5.2.2.1 Агар сухой промышленный следующего состава[1)].

Если коммерчески доступный агар не подходит для испытания материала, питательная среда должна быть приспособлена или соответственно заменена. Такие изменения должны быть отображены в протоколе испытаний.

5.2.2.2 Состав питательной среды для испытуемых штаммов:
триптон пептон — 17 г;
фитон пептон — 3 г;
хлористый натрий — 5 г;
калия двузамещенный фосфат водорода — 2,5 г;
декстроза — 2,5 г;
вода дистиллированная — 1000 $см^3$.

Подготавливают питательную среду, нагревая вышеупомянутые вещества в воде, пока они не растворятся полностью. Стерилизуют среду при температуре 121 °С и давлении 205 кПа в автоклаве в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть (7,3 ± 0,1) ед. pH при температуре 20 °С.

5.2.2.3 Состав среды для испытаний:
триптон пептон — 15 г;
фитон пептон — 5 г;
хлористый натрий — 5 г;
агар-агар — 15 г;
вода дистиллированная — 1000 $см^3$.

5.2.2.4 Линейка стальная с делением, мм.
5.2.2.5 Часы с погрешностью измерения до 1 с.

6 Тестовые бактерии

Используют следующий грамположительный штамм и один из двух грамотрицательных штаммов:
- Стафилококк золотистый грамположительный ATCC[2)] 6538 или NCCB[3)] 46064.
- Кишечная палочка грамотрицательная ATCC 11229 или NCCB 1500.
- Клебсиелла пневмонии грамотрицательная ATCC 4352 или NCCB 89160.

Для гарантирования сопоставимости должны использоваться только штаммы, поставляемые из признанных коллекций бактериальных культур.

Примечание — В зависимости от области применения и состава ткани спектр тестовых бактерий может быть увеличен. При использовании бактерий, отличных от тех, что определены, метод культивирования, среда

[1)] Триптиказо-Соевый Агар/Питательная среда (BBL); Триптиказо-Соевый Агар/Питательная среда (Difco); КСПТ Агар/Питательная среда (Merck); Триптоно-Соевый Агар/Питательная среда (Oxoid) — примеры подходящих продуктов, доступных коммерчески. Эта информация дана для удобства пользователей настоящего стандарта.

[2)] Американская коллекция типовых культур, 10801, Университетский Бульвар, Манассас, штат Вирджиния 20110-2209, США, тел: +703.365.2700.

[3)] Нидерландская коллекция бактериальных культур, Университет Утрехт, Уппсала 8, Почтовый ящик 85167, 3508 Утрехт, Нидерланды, тел: +31 (30) 2122634.

культивирования и инкубационная температура должны быть изменены в соответствии с инструкцией об использовании этих бактерий. Все изменения должны отображаться в протоколе испытаний.

7 Подготовка культур бактерий

7.1 Общие положения

Описанная процедура относится к подготовке штаммов бактерий для конкретных испытаний. Хранение штаммов бактерий в лаборатории — по [1].

7.2 Культивирование из лиофилизированных бактерий

Вносят лиофилизированные бактерии в 1000 $см^3$ питательного бульона, получают суспензии. Суспензии используют для подготовки пластинки с агаровой культурой. Проверяют чистоту культуры на пластинке микроскопическим исследованием и методом Грама. Эффект передачи «жидкости к жидкости» составляет максимум три дня, чтобы избежать возможности загрязнения. Инкубируют культуру в течение 24 ч при температуре (37 ± 1) °С.

Проверяют чистоту и идентичность колоний, распределив культуру бактерий на агаре.

Если серии трех-четырех передач «жидкости к жидкости» прерываются выходными от 16 до 24 ч, испытываемую культуру помещают в холодильник при температуре от 3 до 4 °С в пятницу и повторно пересевают не позднее вторника через 24 ч.

В конце недели уничтожают все рабочие культуры и заменяют новыми, подготовленными из запасных штаммов, выращенных на агаре или взятых из лиофилизированных бактерий.

7.3 Культивирование из агара

Подготавливают первую жидкую субкультуру из агара и пластинку агаровой культуры. Срок хранения жидкой культуры не должен превышать четырех недель. Проверяют чистоту культуры по слоям пластинки и подтверждают микроскопическим исследованием идентичность по Граму. Эффект передачи «жидкости к жидкости» составляет максимум три дня, чтобы избежать возможности загрязнения. Инкубирование культуры проводят в течение 24 ч при температуре (37 ± 1) °С.

Проверяют чистоту колоний, снова распределив культуру на агаре.

Если серии трех-четырех передач «жидкости к жидкости» прерываются выходными от 16 до 24 ч, испытываемую культуру помещают в холодильник при температуре от 3 до 4 °С в пятницу и повторно пересевают не позднее вторника через 24 ч.

Максимум после 6 мес. исследований все новые культуры должны быть основаны на лиофилизированных бактериях.

8 Подготовка образцов для испытаний

8.1 Общие положения

Испытуемые образцы текстильного материала должны быть круглой формы с диаметром (25 ± 5) мм. Испытание проводят на четырех образцах, с двух сторон каждого из образцов.

Примечание — В определенных случаях испытуемые образцы должны быть подготовлены в соответствии с приложением А.

8.2 Подготовка материала для испытаний

Необходимо использовать исключительно нестерилизованные испытуемые образцы. В отчет испытания необходимо включать любые отклонения.

8.3 Материал для контрольных испытаний

Подготавливают различные образцы текстильных материалов для исследования без антибактериальной обработки. Если такие материалы недоступны, используют хлопчатобумажную ткань без антибактериальной обработки для контроля роста бактерий.

8.4 Условия хранения образцов

Хранят испытуемые образцы от 12 до 24 ч в стерилизованных чашках Петри при комнатной температуре.

9 Проведение испытаний

9.1 Подготавливают необходимый объем агара для нижнего слоя пластинки без бактерий. Вносят (10 ± 0,1) $см^3$ в каждую из стерилизованых чашек Петри и оставляют агар застывать.

9.2 Для верхнего слоя пластинки подготавливают необходимое количество агара и остужают до температуры (45 ± 1) °С в водяной бане (см. 5.1.3). На нижний слой агара на 150 $см^3$ (1 ± 0,1) $см^3$ наносят бактериальную рабочую культуру в количестве 1—5 · 10^8 КОЕ/$см^3$ (КОЕ — колониеобразующая единица).

Энергично встряхивают сосуд, чтобы распределить бактерии равномерно. Вносят (5 ± 0,1) $см^3$ в каждую чашку Петри и оставляют агар застывать. Используют агаровые пластинки с бактериальной рабочей культурой в течение 1 ч.

9.3 Так как агаровые пластинки имеют тенденцию сохнуть на поверхности после разливания и различные степени сухости от одной зоны до другой могут привести к неравномерному росту бактерий, используют за один раз не более 50 пластинок, то есть 500 $см^3$ агара (250 $см^3$ на слой).

9.4 Прессуют испытуемые образцы текстильных материалов парой стерилизованных пинцетов или стеклянным согнутым прутом равномерно на питательной среде, пока не возникнет хорошего контакта между образцом и агаром. Если необходимо, помещают на испытуемых образцах стерилизованное стеклянное или стальное кольцо, чтобы гарантировать этот контакт.

Примечание — Другие материалы могут потребовать специальных исследований (см. приложение А).

9.5 Выдерживают пластинки от 18 до 24 ч при температуре (37 ± 1) °С после размещения испытуемых образцов на агаре и затем проверяют на бактериальный рост. Убеждаются, что есть контакт между испытуемым образцом и агаром в течение всего инкубационного периода. Все изменения должны отображаться в отчете.

10 Результаты испытаний

10.1 Оценка основана на отсутствии или присутствии бактериального роста в зоне контакта между агаром и испытуемым образцом и на возможном появлении зоны подавления бактерий вокруг испытуемых образцов.

10.2 Вычисляют ширину зоны подавления роста бактерий H, мм, то есть зоны, лишенной бактерий около края образца, используя следующую формулу:

$$H = \frac{D - d}{2}, \quad (1)$$

где D — общий диаметр испытуемого образца и зоны подавления, мм;

d — диаметр испытуемого образца, мм.

10.3 После измерения зоны подавления удаляют образцы с агара пинцетом. Исследуют зоны контакта под образцами для измерения бактериального роста с помощью микроскопа с 20-кратным увеличением и с подсветкой снизу.

10.4 Оценивают антибактериальный эффект антибактериальной обработки испытуемого образца в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Антибактериальный эффект антибактериальной обработки

Зона подавления (мм)	Рост[a)]	Описание	Оценка
> 1	Нет	Зона подавления превышает 1 мм, роста нет[b)]	Хороший эффект
1—0	Нет	Зона подавления до 1 мм, роста нет[b)]	
0	Нет	Нет зоны подавления, роста нет[c)]	
0	Легкий	Нет зоны подавления, только некоторые ограниченные колонии, рост почти полностью подавлен[d)]	Предел эффективности

Окончание таблицы 1

Зона подавления (мм)	Рост[a)]	Описание	Оценка
0	Средний	Нет зоны подавления, в сравнении с контрольным рост уменьшен до половины[e)]	Недостаточный эффект
0	Густой	Нет зоны подавления, по сравнению с контрольным отсутствует сокращение роста или только легкое уменьшение роста	

[a)] Рост бактерий в питательной среде под образцом.

[b)] Степень подавления нужно лишь частично принять в расчет. Большая зона подавления может указать на определенные запасы активных веществ или слабое сгущение продукта на основании пластинки.

[c)] Отсутствие роста, даже без зоны подавления, можно расценивать как хороший эффект, поскольку формирование такой зоны, возможно, было предотвращено низкой диффузией активного вещества.

[d)] «Отсутствие роста бактерий» указывает на пределы эффективности, расценивается как хороший эффект.

[e)] Уменьшение роста бактерий означает уменьшение числа колоний или диаметра колонии.

11 Обработка результатов

Требования антибактериальной обработки в 10.4 (хороший эффект) выполнены и грамотрицательными и грамположительными бактериями, предписанными для исследований.

Каждая сторона испытуемого образца должна быть оценена отдельно.

12 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующую информацию:

a) ссылку на метод, стандарт;

b) описание типа исследуемого материала;

c) предварительную обработку исследуемого образца (например, промывание, выдержку на свету, выветривание);

d) размер, число и подготовку образцов;

e) хранение образцов перед исследованием;

f) исследуемые бактерии;

g) отступления от метода;

h) результаты исследования согласно оценочной схеме (см. раздел 10);

i) дату, подпись и название исследовательской организации.

Приложение А
(справочное)

Специальные экземпляры и испытания

А.1 Текстильные материалы для испытаний не должны быть гидрофильными и воздухонепроницаемыми. При недостаточности контакта между поверхностью агара и образцами образцы должны быть соответствующим образом изменены.

А.2 Отдельные волокна, скопление пуха, волокна с большой длиной должны быть разделены на маленькие части и применены в форме толстого слоя на агаре. Чтобы облегчить операцию, стеклянное кольцо нужно поместить сначала на агаре, заполнить материалом и затем удалить.

При необходимости ворсовые материалы с различной длиной ворса нужно равномерно измельчить для обеспечения хорошего контакта с поверхностью агара.

Лишние волокна должны быть удалены из испытуемого экземпляра перед исследованием.

Примечания

1 Если образец состоит из смеси пряжи и волокон, исследование можно проводить.

2 Образцы могут подавлять рост тестовых бактерий из-за недостатка воздуха между ними и поверхностью агара. В таком случае образцы должны быть разделены на маленькие полоски и сгруппированы на агаре, оставляя небольшое пространство между каждой полоской.

Приложение В
(справочное)

Европейские поставщики АТСС

Справочные материалы в LGC
Квинс Роад
Теддингтон
Миддлсакс TW11 0LY
Великобритания
Тел: +44(0)20 8943 7565
Факс: +44(0)20 8943 7554
Email: gost.e-ecolog.ru
(Великобритания, Ирландия, другие страны не упомянуты)

LGC France SARL
Научный парк инноваций
Улица Tobias Stimmer
F-67400 Иллкирх
Страсбург
Франция
Тел: +33 (0)3 88 55 03 60
Факс: +33 (0)3 88 55 03 61
Email: gost.e-ecolog.ru
(Франция, Швейцария)

LGC Nordic AB
Бринеллгатан4
Почтовый ящик 1737 SE-501 17 Бурос
Швеция
Тел: +46(0)33 165315/25
Факс: +46(0)33 165310
Email: gost.e-ecolog.ru ия, Исландия, Норвегия, Финляндия, Эстония, Латвия, Литва, Дания)

LGC Deselaers SL Peru, 104 Наве 3 08018
Барселона
Испания
Тел: +34 (0)93 266 2731
Факс: +34 (0)93 307 3612
(Испания, Португалия)

Библиография

[1] EN 12353:2006 Chemical desinfektants and antiseptics — Preservation of microbial strains used for the determination of bactericidal and fungicidal activity (Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Хранение бактерий и грибков, которые используются для определения бактерицидного и фунгицидного действия)

УДК 677:006.354 МКС 59.080.01 IDT

Ключевые слова: антибактериальная активность, штаммы, бактерии, подавление, агар, агаровая пластинка, зона контакта, зона подавления

Редактор *Л.Л. Штендель*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *С.В. Косторновой*

Сдано в набор 25.05.2016. Подписано в печать 16.08.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,4.

Набрано в ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Издано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995, Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru