
**Пластмассы. Измерение
противобактериальной активности на
пластмассовых поверхностях**

Plastics – Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22196:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94397706-066d-4f26-8a98-61258ded9b32/iso-22196-2007>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 22196:2007

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22196:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94397706-066d-4f26-8a98-61258ded9b32/iso-22196-2007>



ДОКУМЕНТ ОХРАНЯЕТСЯ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2007

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 734 09 47
E-mail copyright @ iso.org

Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	1
4 Материалы	2
4.1 Бактерии, используемые в анализе	2
4.2 Реактивы, питательные среды и растворы	3
5 Аппаратура	5
6 Стерилизация оборудования и хранение исходных культур	5
6.1 Стерилизация сухим жаром	5
6.2 Стерилизация паром под давлением	6
6.3 Подготовка стеклянной посуды	6
6.4 Поддержание исходных культур	6
7 Проведение анализа	6
7.1 Предварительный посев бактерий	6
7.2 Подготовка образцов для анализа	6
7.3 Подготовка посевного материала для анализа	7
7.4 Посев на испытуемые образцы	7
7.5 Инкубирование засеянных испытуемых образцов	8
7.6 Выделение бактерий на испытуемых образцах	8
7.7 Определение количества жизнеспособных бактерий подсчетом на чашках	9
8 Обработка результатов	9
8.1 Определение количества жизнеспособных бактерий	9
8.2 Условия получения достоверных результатов анализа	10
8.3 Расчет противобактериальной активности	10
8.4 Эффективность противобактериального вещества	11
9 Повторяемость и воспроизводимость	11
10 Протокол испытания	11
Приложение А (нормативное) Качество биологических материалов	12
Приложение В (информативное) Повторяемость и воспроизводимость	13
Библиография	16

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) представляет собой всемирную федерацию, состоящую из национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по разработке международных стандартов обычно ведется Техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в теме, для решения которой образован данный технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, поддерживающие связь с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, установленными в Части 2 Директив ISO/IEC.

Основное назначение технических комитетов заключается в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Техническими комитетами, направляются комитетам-членам на голосование. Для их опубликования в качестве международных стандартов требуется одобрение не менее 75 % комитетов-членов, участвовавших в голосовании.

Внимание обращается на тот факт, что отдельные элементы данного документа могут составлять предмет патентных прав. ISO не несет ответственность за идентификацию каких-либо или всех подобных патентных прав.

ISO 22196 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 61, *Пластмассы*, Подкомитетом SC 6, *Старение, стойкость к воздействию химических веществ и внешнему воздействию*.

[ISO 22196:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94397706-066d-4f26-8a98-61258ded9b32/iso-22196-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94397706-066d-4f26-8a98-61258ded9b32/iso-22196-2007>

Пластмассы. Измерение противобактериальной активности на пластмассовых поверхностях

1 Область применения

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Работа с потенциально опасными микроорганизмами требует высокой степени технической компетенции и может быть предметом действующего национального законодательства и регламентов. Подобную работу может осуществлять только персонал, обученный технике работы с микробиологическим материалом. Необходимо строго соблюдать правила дезинфекции, стерилизации и личной гигиены.

Настоящий международный стандарт устанавливает метод оценки противобактериальной активности обработанных противобактериальными средствами пластмассовых продуктов (включая промежуточные продукты).

ПРИМЕЧАНИЕ Стандарт также можно применять к некоторым непористым материалам.

Данный стандарт не предназначен для оценки воздействия и распространения бактерий на пластмассах без противобактериальной обработки. ISO 846^[6] описывает испытания для оценки воздействия и распространения бактерий на пластмассах, которые отличаются от материалов, подпадающих под действие настоящего международного стандарта. Заинтересованные данной проблемой пользователи могут обратиться к стандарту ISO 846:1997, метод С.

Вторичные эффекты противобактериальной обработки, такие как предотвращение биоразложения и появления запаха, не охватываются данным международным стандартом, который не предназначен для применения или ссылки как на метод описания биоразложения пластмасс. В отношении биологического разложения см. ISO 14851, ISO 14852 и ISO 14855 (см. Библиографию) и связанные с ними стандарты.

Настоящий международный стандарт не касается пластмассовых строительных материалов, таких как ПВХ или композиты, если они не рассматриваются как обработанные изделия.

Все результаты, полученные с применением данного международного стандарта, рекомендуется относить к данному стандарту и используемым в нем условиям. Результаты, полученные с применением данного стандарта, указывают на противобактериальную активность в установленных условиях эксперимента и не отражают активность в других условиях, в которых необходимо учитывать различные факторы, такие как температура, влажность, различные виды бактерий, условия питания и т.д. В данном методе необходимо также учитывать минимальную диффузию противобактериальных средств, химических веществ в испытуемый посевной материал.

Рекомендуется для работы пользоваться ISO 7218.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы необходимы для применения данного документа. Для датированных ссылок применяется только издание, указанное ниже. Для недатированных ссылок применяют самое последнее издание ссылочного документа (включая все изменения).

ISO 7218, *Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Общие требования и правила микробиологических исследований*

3 Термины и определения

Применительно к данному документу используются следующие термины и определения.

3.1
противобактериальный (бактерицидный)
antibacterial

термин, описывающий состояние, в котором рост бактерий на поверхностях изделий подавляется, или описывающий влияние вещества, которое подавляет рост бактерий на поверхностях изделий

3.2
противобактериальное (бактерицидное) вещество
antibacterial agent

вещество, которое подавляет рост бактерий на поверхностях изделий при противобактериальной обработке поверхности, лекарственное средство

3.3
противобактериальная (бактерицидная) активность
antibacterial activity

разность логарифмов количества жизнеспособных бактериальных клеток, обнаруженных на поверхности изделия, подвергшегося противобактериальной обработке, и на поверхности необработанного изделия после посева и инкубации микроорганизмов

3.4
противобактериальная (бактерицидная) эффективность
antibacterial effectiveness

способность противобактериального вещества подавлять рост бактерий на поверхности пластмассы, обработанной бактерицидным веществом, определенная по значению противобактериальной активности

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4 **Материалы**

4.1 **Бактерии, используемые в анализе**

Необходимо использовать в анализе бактерии двух следующих видов:

- a) Стафилококки, *Staphylococcus aureus*;
- b) Кишечные палочки, *Escherichia coli*.

В дополнение к приведенным выше двум видам бактерий можно использовать другие виды, если требуется. Если используют другие виды, то эти виды и причину их использования необходимо включить в протокол испытания.

В Таблице 1 показаны бактериальные штаммы, предлагаемые для использования в анализе. Если используются бактериальные штаммы от культур, отличных от приведенных в Таблице 1, эти культуры необходимо получать в агентстве, являющемся членом Всемирной федерации коллекции культур (the World Federation for Culture Collections (WFCC)) или Японском обществе коллекций культур (the Japan Society for Culture Collections (JSCC)) и должны быть такими же штаммами, как показаны в Таблице 1. Исходные (чистые) культуры указанных видов выращивают в соответствии с инструкциями поставщика.

Таблица 1 — Бактериальные штаммы для применения в анализе

Наименование	Штамм
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P CIP 53.156 DSM 346 NBRC 12732 NCIB 8625
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 CIP 53.126 DSM 1576 NBRC 3972 NCIB 8545

4.2 Реактивы, питательные среды и растворы

Воду необходимо использовать дистиллированную или деионизированную, имеющую электропроводность < 1 МкСм/см.

Все реактивы должны быть аналитической чистоты и/или специального класса для микробиологических исследований.

4.2.1 Неионное поверхностно-активное вещество (сурфактант)

Используют полиоксиэтилен сорбитан моноолеат.

4.2.2 Биологические материалы

Требуются следующие биологические материалы:

- лецитин;
- D-глюкоза; <http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94397706-066d-4f26-8a98-61258ded9b32/iso-22196-2007>
- дрожжевой экстракт;
- мясной экстракт (см. Приложение А);
- пептон (см. Приложение А);
- казеиновый пептон;
- соевый пептон;
- триптон.

4.2.3 Питательная среда

4.2.3.1 Общие положения

Необходимо использовать питательную среду, описанную ниже. Питательную среду можно получить от поставщиков. В этом случае ее необходимо готовить для применения в соответствии с инструкциями изготовителя.

4.2.3.2 Суспензия — питательный бульон 1/500 (1/500 NB)

Готовят питательный бульон путем растворения 3,0 г мясного экстракта, 10,0 г пептона и 5,0 г хлорида натрия в 1 000 мл дистиллированной или деионизированной воды. Разбавляют питательный бульон дистиллированной или деионизированной водой до 500-кратного объема и регулируют pH до значения от 6,8

до 7,2 гидроксидом натрия или соляной кислотой. Стерилизуют в автоклаве (см. 6.2). Если среду не используют немедленно после приготовления, ее хранят при температуре от 5 °С до 10 °С. Бульон 1/500 NB, который хранили в течение одной недели или больше после приготовления, использовать нельзя.

4.2.3.3 Питательный агар

Питательный агар готовят путем растворения 5,0 г мясного экстракта, 10,0 г пептона, 5,0 г хлорида натрия и 15,0 г порошка агара в 1 000 мл дистиллированной или деионизированной воды. Нагревают при помешивании на нагревательной плитке или на кипящей водяной бане, пока агар не растворится. Регулируют pH до значения от 7,0 до 7,2 (при температуре 25 °С) с помощью гидроксида натрия или соляной кислоты. Стерилизуют в автоклаве (см. 6.2). Если среду не используют немедленно после приготовления, ее хранят при температуре от 5 °С до 10 °С. Питательный агар, который хранили в течение одного месяца или больше после приготовления, использовать нельзя.

4.2.3.4 Агаризованная питательная среда для подсчета микроорганизмов в чашках

Питательную агаризованную среду в чашках готовят путем растворения 2,5 г дрожжевого экстракта, 5,0 г триптона, 1,0 г глюкозы и 15,0 г порошка агара в 1 000 мл дистиллированной или деионизированной воды. Нагревают при помешивании на нагревательной плитке или на кипящей водяной бане, пока агар не растворится. Регулируют pH до значения от 7,0 до 7,2 (при температуре 25 °С) с помощью гидроксида натрия или соляной кислоты. Стерилизуют в автоклаве (см. 6.2). Если среду не используют немедленно после приготовления, ее хранят при температуре от 5 °С до 10 °С. Питательную агаризованную среду в чашках, которую хранили в течение одного месяца или больше после приготовления, использовать нельзя.

4.2.3.5 Скошенная питательная среда

Заливают от 6 мл до 10 мл питательного агара, который нагревали до растворения, в пробирку с завинчивающейся крышкой. Стерилизуют в автоклаве (см. 6.2). После стерилизации помещают пробирку под углом наклона поверхности 15° к горизонтали и дают содержимому застыть. Если среду не используют немедленно после приготовления, ее хранят при температуре от 5 °С до 10 °С. Скошенную питательную среду, которую хранили в течение одного месяца или больше после приготовления, использовать нельзя.

4.2.3.6 Бульон на основе перевара соевого пептона и казеина с лецитином и полиоксиэтилен сорбитан моноолеатом (бульон SCDLP)

Готовят бульон SCDLP путем растворения 17,0 г казеинового пептона, 3,0 г соевого пептона, 5,0 г хлорида натрия, 2,5 г гидрофосфата натрия, 2,5 г глюкозы и 1,0 г лецитина в 1 000 мл дистиллированной или деионизированной воды. Тщательно перемешивают и добавляют 7,0 г неионного сурфактанта. Регулируют pH до значения от 6,8 до 7,2 (при температуре 25 °С) с помощью гидроксида натрия или соляной кислоты. Стерилизуют в автоклаве (см. 6.2). Если среду не используют немедленно после приготовления, ее хранят при температуре от 5 °С до 10 °С. Бульон SCDLP, который хранили в течение одного месяца или больше после приготовления, использовать нельзя.

ПРИМЕЧАНИЕ SCDLP в большинстве случаев является обычным нейтрализатором. Дополнительную информацию в отношении подбора и оценки альтернативных противобактериальных нейтрализующих средств можно получить в стандартах ASTM E 1054 ^[4] и EN 1040 ^[5].

4.2.3.7 Фосфатный буферный раствор

Готовят фосфатный буферный раствор следующим образом: помещают 34,0 г дигидрофосфата калия в мерную колбу вместимостью 1 000 мл. Добавляют 500 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешивают до растворения. Регулируют pH до значения от 6,8 до 7,2 (при температуре 25 °С) с помощью гидроксида натрия. Добавляют дистиллированной или деионизированной воды, чтобы довести объем до 1 000 мл. Стерилизуют в автоклаве (см. 6.2). Фосфатный буферный раствор нельзя использовать после хранения в течение месяца или больше после приготовления.

4.2.3.8 Физиологический солевой раствор на основе фосфатного буфера

Готовят физиологический солевой раствор, поместив 8,5 г хлорида натрия в 1 000 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешав до растворения. Разбавляют фосфатный буферный раствор, приготовленный в 4.2.3.7, физиологическим солевым раствором до 800-кратного объема. Стерилизуют физиологический раствор с фосфатным буфером в автоклаве (см. 6.2). Если раствор не используют немедленно после приготовления, его хранят при температуре от 5 °С до 10 °С. физиологический солевой раствор на основе фосфатного буфера, который хранился после приготовления в течение одного месяца или больше, использовать нельзя.

5 Аппаратура

Если нет иных указаний, используют следующее оборудование и материалы:

5.1 Стерилизатор сухим жаром, обеспечивающий поддержание температуры от 160 °С до 180 °С в пределах ± 2 °С от установленного значения в условиях равновесия.

5.2 Автоклаве, обеспечивающий поддержание температуры (121 ± 2) °С и давления (103 ± 5) кПа.

5.3 Нагревательная плитка со смесителем, или **водяная баня**.

5.4 рН-метр, обеспечивающий измерение до $\pm 0,2$ единиц рН.

5.5 Весы, обеспечивающие взвешивание до $\pm 0,01$ г.

5.6 Устройство для пипетирования, стерильное, с наконечниками по 1 000 мкл.

5.7 Инкубатор (термостат), обеспечивающий поддержание температуры в пределах ± 1 °С от установленного значения в условиях равновесия.

5.8 Вихревой смеситель, если требуется (см. 7.6.1).

5.9 Ультразвуковой аппарат, если требуется (см. 7.6.1).

5.10 Бактериологические петли для посева, с диаметром кольца 4 мм, стерильные.

5.11 Закрывающая пленка, не влияющая на рост бактерий и не поглощающая влагу (изготовленная из полиэтилена, полипропилена или полиэфира [поли(этилен терефталат)]). Рекомендуется использовать пленку толщиной от 0,05 мм до 0,10 мм.

ПРИМЕЧАНИЕ Также подойдет пленка, отрезанная от пакетов для гомогенизатора Stomacher.

5.12 Пробирки с завинчивающейся крышкой.

5.13 Чашки Петри, стерильные, диаметром 90 мм - 100 мм.

5.14 Марля или гигроскопическая вата.

5.15 Мерная колба вместимостью 1 000 мл.

5.16 Колбы Эрленмейера с пробкой или **флаконы для среды**, необходимые для приготовления питательной среды.

6 Стерилизация оборудования и хранение исходных культур

6.1 Стерилизация сухим жаром

Помещают подлежащие стерилизации объекты в стерилизатор, используют минимальную продолжительность стерилизации для указанной температуры:

Температура	Минимальная продолжительность стерилизации
180 °C	30 минут
170 °C	60 минут
160 °C	120 минут

6.2 Стерилизация паром под давлением

Помещают подлежащие стерилизации объекты в автоклав и поддерживают температуру (121 ± 2) °C в течение не менее 15 мин.

6.3 Подготовка стеклянной посуды

Тщательно моют щелочным или нейтральным средством, затем тщательно споласкивают дистиллированной или деионизированной водой. Перед применением стерилизуют сухим жаром или в автоклаве.

6.4 Поддержание исходных культур

Исходные культуры необходимо хранить при температуре от 5 °C до 10 °C на подходящей питательной среде и ежемесячно пересевать. После пяти пересевов или по прошествии более одного месяца исходную культуру выбрасывают и заменяют на свежую, полученную из института или коллекции культур.

7 Проведение анализа

7.1 Предварительный посев бактерий

С помощью бактериологической стерильной петли для посева переносят бактерии из исходной культуры на скошенную агаризованную среду (4.2.3.5) и инкубируют при температуре (35 ± 1) °C в течение от 16 ч до 24 ч. Из этой культуры и помощью, бактериологической стерильной петли для посева переносят бактерии на свежую скошенную среду и инкубируют при температуре (35 ± 1) °C в течение от 16 ч до 20 ч.

7.2 Подготовка образцов для анализа

Необходимо проанализировать не менее трех образцов от каждого обработанного испытуемого материала. Требуется также не менее шести образцов необработанного материала. Половину образцов необработанного материала используют для подсчета жизнеспособных клеток немедленно после посева, а вторую половину для подсчета жизнеспособных клеток после инкубации в течение 24 ч.

ПРИМЕЧАНИЕ Применение более трех образцов обработанного испытуемого материала в параллельном анализе может сократить изменчивость результатов, особенно для материалов, которые демонстрируют меньшее противомикробное воздействие.

При испытании серии противобактериальных веществ для одного полимера, каждую противобактериальную обработку можно сравнивать с отдельным набором необработанных образцов, если все анализы выполняются одновременно, используя один и тот же посевной материал.

Готовят плоские образцы размером (50 ± 2) мм × (50 ± 2) мм обработанного и необработанного посевного материала. Толщина образцов должна быть не более 10 мм. Если затруднительно или невозможно разрезать испытуемый материал на квадраты указанного размера, то можно использовать образцы другой формы и размера, но так чтобы их можно было накрыть пленкой площадью поверхности от 400 мм² до 1 600 мм². Предпочтительно готовить образцы для испытания из самого конечного продукта. Однако, если форма изделия этого не позволяет, то образцы можно приготовить в формате, удобном для анализа, используя те же самые исходные материалы и методы обработки, которые обычно используют для производства испытываемого изделия. Если образец отличается от квадрата размером 50 мм × 50 мм, то в протоколе испытания необходимо указать фактические использованные размеры.

При подготовке образцов необходимо следить, чтобы избежать загрязнения их микроорганизмами или органическими веществами извне. Аналогично нельзя допускать соприкосновения образцов между собой. Если используется металлическое оборудование, то чтобы избежать перекрестного

загрязнения, необходимо убедиться, что металл не обладает противобактериальным воздействием. Если требуется, образцы для испытания можно очистить/дезинфицировать/стерилизовать перед испытанием (например, протерев 70 %-ным раствором этанола в воде).

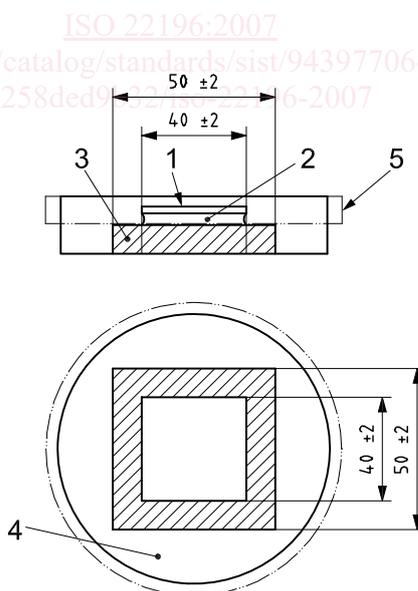
Очистка испытуемых образцов может привести к размягчению, растворению поверхностного покрытия или элюирования компонентов, поэтому очистки рекомендуется избегать. Если очистка требуется в результате сильного загрязнения, метод очистки должен быть указан в протоколе испытания.

7.3 Подготовка посевного материала для анализа

С помощью бактериологической стерильной петли для посева переносят одну петлю бактерий, предварительно инкубированных в соответствии с 7.1 в небольшое количество бульона 1/500 NB, приготовленного в соответствии с 4.2.3.2. Необходимо убедиться, что бактерии для анализа распределены равномерно, и оценить количество бактерий, используя непосредственное наблюдение под микроскопом и счетную камеру или другой подходящий метод (например, спектрофотометрический). Разбавляют суспензию бульоном 1/500 NB, насколько необходимо для оценки концентрации бактерий, чтобы получить значение концентрации от $2,5 \times 10^5$ клеток/мл до 10×10^5 клеток/мл, при целевой концентрации 6×10^5 клеток/мл. Используют этот раствор как посевной материал. Если посевной материал не используется немедленно, его необходимо охладить на льду (0 °C) и использовать в течение 2 ч с момента приготовления.

7.4 Посев на испытуемые образцы

Исследуемой поверхностью является открытая наружная поверхность изделия. Не требуется анализировать поперечные сечения изделия. Помещают каждый испытуемый образец, подготовленный в соответствии с 7.2, в отдельную стерильную чашку Петри анализируемой поверхностью вверх. Пипеткой наносят 0,4 мл посевного материала для анализа, приготовленного в 7.3, на испытуемую поверхность. Накрывают посевной материал кусочком пленки (5.11) размерами 40 мм × 40 мм и осторожно прижимают пленку, так чтобы анализируемый посевной материал распределился к краям поверхности образца. Необходимо убедиться, что анализируемый посевной материал не вытек за края пленки. После посева на образец и помещения сверху пленки закрывают чашку Петри крышкой (см. Рисунок 1).



Обозначение

- 1 накрывающая пленка
- 2 анализируемый посевной материал (0,4 мл)
- 3 испытуемый образец
- 4 чашка Петри
- 5 крышка чашки Петри

Рисунок 1 — Посев на испытуемый образец и накрывание посевного материала пленкой