

团体标准

T/NAHIEM 004—2017

抗菌防臭袜

Antibacterial deodorant hosiery

2017-11-7 发布

2017-11-7 实施

全国卫生产业企业管理协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会提出。

本标准由全国卫生产业企业管理协会归口。

本标准起草单位：全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会、浙江康洁丝新材料科技有限公司、泉州市隐形盾鞋服科技有限公司、泉州市爱优恩纺织品科技有限公司、上海兴诺康纶纤维科技股份有限公司、瑞安市碧莎丹针纺有限公司、广东省微生物分析检测中心、诸暨市沁悦针织股份有限公司、上海爱丽纺织技术检验有限公司、通标标准技术服务（上海）有限公司、上海洁宜康化工科技有限公司、晓星国际贸易（嘉兴）有限公司上海分公司、天津益康世纪抗菌新材料科技有限公司、浙江适康能新材料科技有限公司、苏州泰克银纤维科技有限公司、晋大纳米科技（厦门）有限公司、海宁市金百利袜业有限公司、广州工业微生物检测中心、妙抗保国际贸易(深圳)有限公司

本标准主要起草人：梁国斌、陈 健、刘荣飞、林国栋、计红日、赵丹青、王焕呈、谢小保、程小勇、 马正升、姚正元、刘燕平、龚澎湃、詹玉和、吴继贤、丁静波、胡海艳、赵世显、张迎增

抗菌防臭袜

1 范围

本标准规定了臭味、抗菌、防臭、抗菌防臭和抗菌防臭袜等术语。

本标准规定了抗菌防臭袜的安全性卫生要求和抗菌防臭性能。抗菌防臭袜的其他性能应当符合相应的国家和行业标准。

本标准适用于天然纤维、化学纤维及其混纺或交织制成，经抗菌防臭加工的袜子。

本标准不适用于 36 个月以下的婴幼儿袜。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准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 18401-2010 国家纺织产品基本安全技术规范

GB/T20944.1-2007 纺织品 抗菌性能的评价 第 1 部分:琼脂扩散法

GB/T 20944.2-2007 纺织品 抗菌性能的评价 第 2 部分:吸收法

GB/T 20944.3-2008 纺织品 抗菌性能的评价 第 3 部分:振荡法

GB/T 31713-2015 抗菌纺织品安全性卫生要求

GB 5296.4 消费品使用说明 第 4 部分 纺织品和服装使用说明

FZ/T 73001 袜子

FZ/T 73023-2006 抗菌针织品

FZ/T 73037 针织运动袜

消毒技术规范 卫生部

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本标准。

3.1 臭味 (unpleasant odour)

人类生存空间存在的令人不舒适的异味，如厕所臭、汗臭、老人臭、烟臭和粪臭等。

3.2 抗菌 (antibacterial)

采用化学或物理方法杀灭细菌或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

3.3 防臭 (deodorant)

通过物理、化学或生物方法抑制臭味产生或散发的过程。

3.4 抗菌防臭 (antibacterial deodorant)

通过抑制微生物生长繁殖，达到防止因微生物导致的臭味的过程。

3.5 抗菌防臭性能 (antibacterial deodorant activity)

通过抗菌加工具有杀灭细菌或妨碍细菌生长繁殖及其活性、达到防止因微生物导致的臭味的性能。

3.6 抗菌防臭袜 (antibacterial deodorant hosiery)

具有抗菌防臭性能的袜子。

3.7 安全性卫生要求 (safety requirement)

人们在穿着或使用的抗菌防臭产品，不应对人体健康产生损害作用。

4. 技术要求

技术要求分为安全性卫生性能和抗菌防臭性能要求。

4.1 安全性卫生要求

抗菌防臭袜的安全性卫生要求应符合表 1 要求。

表 1 安全性卫生要求

项目	要求
抗菌物质溶出性试验	抑菌环宽度 (D) $\leq 5\text{mm}$
一次完整皮肤刺激试验	等级为无刺激性
皮肤变态反应试验	阴性
遗传毒性试验	阴性

注：

a 抗菌物质溶出性试验中应分别对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌 3 种标准菌株的抑菌圈宽度 (D) 进行测试。

b 遗传毒性试验至少应包括 1 项基因突变试验和 1 项染色体畸变试验。

c 遗传毒性试验检测报告可以由抗菌材料供应商提供。

4.2 抗菌防臭性能要求

抗菌防臭袜的抗菌防臭性能应满足表 2 要求。

表 2 抗菌防臭性能要求

菌种	洗涤 20 次抑菌率, \geq	洗涤 50 次抑菌率, \geq
金黄色葡萄球菌	90%	80%
大肠杆菌	90%	80%
白色念珠菌	80%	70%

5 试验方法

5.1 抗菌物质溶出性试验按照附录 A 执行。

5.2 毒理学指标检测按照卫生部《消毒技术规范》执行。样品需要在进行毒理学指标检测前先进行一次标准洗涤, 标准洗涤方法按照附录 B 执行。

5.3 抗菌防臭性能的测定按照附录 C 规定的方法执行。

6 检验规则

6.1 抗菌防臭袜在抗菌防臭加工剂或抗菌防臭加工工艺变更后, 应重新对安全性卫生要求和抗菌防臭性能进行评价。

6.2 产品抗菌防臭性能应同时满足 4.1 和 4.2 要求, 方可称为抗菌防臭袜。

7 标识

7.1 抗菌防臭袜的标识必须符合 GB 5296.4 的规定。

7.2 抗菌防臭性能的标识至少应注明如下信息:

- a) 抗菌防臭加工的部位
 - b) 执行的产品标准;
 - c) 产品性能指标。
-

附录 A

(规范性附录)

抗菌物质溶出性测试方法

A.1 设备和材料

A.1.1 试样准备

A.1.1.1 试样均应按照附录 A 要求进行一次洗涤后测试。

A.1.1.2 分别取已洗涤一次的标准空白试样、抗菌防臭袜试样的不同部位 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 的试样各 3 块, 在 103kPa $121\text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 15min , 备用。

A.1.1.3 试验菌株 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538); 大肠杆菌 (8099 或 ATCC 25922); 白色念珠菌 (ATCC 10231)。

A.1.2 菌液制备

A.1.2.1 细菌菌液: 无菌操作条件下, 用接种环从 3~10 代的菌种试管斜面上取菌, 营养琼脂培养基上划线, $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 $20\text{h} \sim 24\text{h}$ 。用接种环挑取典型菌落, 接种到 10mL 营养肉汤管中, $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, 130r/min 、培养震荡 $18\text{h} \sim 20\text{h}$, 制成菌悬液。测定活菌数应达到 $1 \times 10^9\text{ CFU/mL} \sim 5 \times 10^9\text{ CFU/mL}$ 。菌液应即时制备, 不宜在冰箱内保存。

A.1.2.2 真菌菌液: 无菌操作条件下, 用接种环从 3~10 代的菌种保存管中取菌, 转种另一只沙氏琼脂培养基试管斜面, $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 $18\text{h} \sim 24\text{h}$ 。向新鲜培养物加 5mL 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液, 洗下菌苔, 用吸管将菌液移至另一只无菌试管中, 振摇 80 次, 使其均匀, 测定活菌数应达 $1 \times 10^8\text{ CFU/mL} \sim 5 \times 10^8\text{ CFU/mL}$ 。

A.1.2.3 将 A.1.3.1 制备的细菌菌液 (或 A.1.3.2 真菌菌液), 用 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液 10 倍梯度稀释至 $10^5\text{ CFU/mL} \sim 5 \times 10^6\text{ CFU/mL}$ 备用。

A.1.3 培养基制备

A.1.3.1 营养琼脂

A.1.3.1.1 成分

- a) 蛋白胨: 10.0g ;
- b) 氯化钠: 5.0g ;
- c) 牛肉浸出粉: 3.0g ;
- d) 酵母膏粉: 3.0g ;

e) 琼脂: 15.0g;

f) 蒸馏水: 1000mL。

A.1.3.1.2 制法: 将 A.1.3.1.1 中 a)~e) 各成分溶于 1000mL 蒸馏水中, 调整 pH 为 7.2 ± 0.2 , 121°C 灭菌 15min。

A.1.3.1.3 制皿: 冷却至约 50°C 营养琼脂培养基, 灭菌平皿中倾入 15 mL~18 mL, 凝固翻转, 培养箱无菌试验检测后备用。

A.1.3.2 沙氏琼脂

A.1.3.2.1 成分

a) 蛋白胨: 10.0g;

b) 葡萄糖: 40.0g;

c) 琼脂: 20.0g;

d) 蒸馏水: 1000mL。

A.1.3.2.2 制法: 将 A.1.3.2.1 中 a)~c) 各成分溶于 1000mL 蒸馏水中, 调整 pH 5.6 ± 0.2 , 116°C 灭菌 20min。

A.1.3.2.3 制皿: 冷却至约 50°C 沙氏琼脂培养基, 灭菌平皿中倾入 15 mL~18 mL, 凝固翻转, 培养箱无菌试验检测后备用。

A.2 操作步骤

A.2.1 接种菌液

取 0.1mL 待接种菌液, 均匀平铺在平皿培养基表面, 置室温 5min。

A.2.2 贴试样

取备用试样平贴在含菌液的培养基上, 用无菌镊子轻压样片, 使其紧贴于培养基表面。每个平皿贴 1 块标准空白试样及 1 块抗菌织物试样。各样片边缘相聚 1.5cm 以上, 居平皿边缘 1cm, 每次试验应作 3 个平行样。

A.2.3 培养

倒置平皿, 放入培养箱中, 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$, 白色念珠菌 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{h} \pm 2\text{h}$ 。

A.3 报告

A.3.1 结果有效性判定

阴性对照的标准空白试样，抑菌圈宽度 $D=0$ ，判定试验有效，否则判定试验无效，需重作试验。

A.3.2 测量

用游标卡尺测量抑菌圈外沿总宽度，取其平均值报告抑菌圈宽度。

A.3.3 报告

抑菌圈宽度 D ： $D \leq 1\text{mm}$ 为非溶出性， $1\text{mm} < D \leq 5\text{mm}$ 为微溶出性， $5\text{mm} < D \leq 10\text{mm}$ 为中度溶出性， $D > 10\text{mm}$ 为溶出性。

附录 B

(规范性附录)

抗菌防臭袜洗涤试验方法

B.1 设备和材料

B.1.1 洗衣机：小型家用双桶（即洗衣桶、脱水桶）洗衣机，其波轮直径约 34cm，转速约 290 r/min。市售各种型号家用双桶洗衣机的波轮尺寸及转速基本相同。选洗衣桶容积在 40L~80L 范围内的一种型号即可。

B.1.2 洗涤剂：参照 GB/T 8629-2001 附录 A 所规定的 AATCC1993 标准洗涤剂 WOB 无磷配方制定。

B.1.3 陪洗织物：由若干块两层 100% 的涤纶针织物或涤棉混纺机织物组成，其单位面积质量约为试验织物单位面积质量的 $\pm 25\%$ ，每块尺寸为 $(30\text{cm} \pm 3\text{cm})$ ，两层织物的边缘应缝合在一起。

B.2 标准化的洗涤条件及程序

B.2.1 洗涤程序参照 GB/T 8629-2001 搅拌型洗衣机-B 型洗衣机的洗涤程序中 7B 程序，将洗涤时间改为 5min。

B.2.2 在家用双桶洗衣机中加入 B.1.2 规定的洗涤剂 2g/L 及自来水，浴比 1:30，水温 $40^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，投入试样，洗涤 5min。然后，于常温下用自来水清洗。

B.2.3 第一遍清洗 2min，取出织物，脱水 30s，然后，于常温下用自来水进行第二遍清洗。

B.2.4 第二遍清洗 2min，取出织物，脱水 30s。

B.2.5 上述 B.2.2，B.2.3，B.2.4 三步为一个循环，记为洗涤 1 次。重复这三个步骤，直到预定的洗涤次数。为防止残留的洗涤剂干扰抗菌测试，注意最后一次洗涤采用大量的自来水将其彻底清除，然后将织物脱水后烘干，即可用于抗菌防臭性能测试。

B.3 简化的洗涤条件或程序

B.3.1 下述试验过程相当于 5 次洗涤（以 10g 布样为例。实际试验应根据试样按比例增加水量及洗涤剂）：

B.3.1.1 准备试样（10g）和陪洗织物（10g）。

B.3.1.2 加 3L 自来水（ $40^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）和 6g 洗涤剂于洗衣机中。

B.3.1.3 加入上述织物试样和陪洗织物。

B.3.1.4 洗涤 25min，排水。

B.3.1.5 以 3L 自来水注洗 2min，然后取出织物，离心脱水 1min，取出。

B.3.1.6 再以 3L 自来水注洗 2min，然后取出织物，离心脱水 1min，取出。

B.3.1.7 上述 B.3.1.2，B.3.1.3，B.3.1.4，B.3.1.5，B.3.1.6 这几个步骤为一循环，记为洗涤 5 次。重复这几个步骤，直到预定的洗涤次数。为防止残留的洗涤剂感染抗菌测试，注意最后一个循环采用大量的自来水将其彻底清除，然后将织物脱水后烘干，即可用于抗菌防臭性能测试。

附录 C

(规范性附录)

抗菌防臭袜测试方法

本试验所采用的细菌都是能使人感染并致病的细菌，因此必须采用一切必要的预防措施，以免除对实验室人员和周围环境及有关人员的危害。试验应由在微生物检测技术方面训练有素且有经验的人员从事。并且，试验者应高度注意消毒及无菌操作，防止试样被杂菌污染。

C.1 仪器和试剂

C.1.1 仪器

C.1.1.1 恒温振荡器（摇床），温控精度为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

C.1.1.2 生化培养箱，温控精度为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

C.1.1.3 高压蒸汽消毒器（简称灭菌锅）。

C.1.1.4 天平，感量为 $\pm 0.01\text{g}$ 。

C.1.1.5 生物安全柜或 100 级层流超净工作台。

C.1.1.6 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 玻璃门冷藏箱。

C.1.1.7 保存菌种用冰箱。

C.1.1.8 40~100 倍体式显微镜。

C.1.1.9 涡流振荡器。

C.1.2 器皿

C.1.2.1 三角烧瓶，容量为 100mL，250mL，500 mL，1000 mL。

C.1.2.2 生化培养皿（简称平皿），皿底直径为 9cm。

C.1.2.3 定量刻度吸管，容量为 0.2 mL，0.5 mL，1 mL，10 mL。

C.1.2.4 试管，15mm × 100mm，20mm × 100mm。

C.1.2.5 带密封盖的管形瓶，直径 26mm~30mm，容量为 30mL~50 mL。

C.1.2.6 酒精灯

C.1.2.7 4mm 铂接种环。

C.1.2.8 游标卡尺。

C.1.3 试剂

C.1.3.1 蛋白胨，生化试剂。

C.1.3.2 牛肉浸膏，生化试剂。

C.1.3.3 琼脂，试剂级。

C.1.3.4 葡萄糖，试剂级。

C.1.3.5 氯化钠，分析纯。

C.1.3.6 氢氧化钠，分析纯。

C.1.3.7 磷酸氢二钠，分析纯。

C.1.3.8 磷酸二氢钾，分析纯。

C.1.3.9 吐温-80，分析纯。

C.1.3.10 氯化三苯基四氮唑，分析纯。

C.2 试验培养基溶液的制备

C.2.1 营养肉汤：精确称取 3g 牛肉膏和 5g 蛋白胨，加 1000mL 蒸馏水放到一只烧瓶中混合，彻底地溶解，再用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液将 PH 调至 6.8 ± 0.2 (25°C)。如有需要，取其中一部分放到一支试管中，盖上棉塞，在 103kPa、 121°C 灭菌 15min。若不立刻使用，把它放在 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存。保存期不能超过一个月。

C.2.2 营养琼脂培养基：精确称取 3g 牛肉膏、5g 蛋白胨和 15g 琼脂粉，加 1000mL 蒸馏水，放到一只烧瓶中混合，将烧瓶放于沸水浴中加热，充分地溶解，再用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液将 Ph 调至 6.8 ± 0.2 ，盖上棉塞，在 103kPa、 121°C 灭菌 15min。当稀释菌液时，把培养基的温度调整为 $45^{\circ}\text{C}\sim 46^{\circ}\text{C}$ 。若不立刻使用，把它放在 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存。保存期不能超过一个月。

C.2.3 沙氏琼脂培养基：精确称取 40g 葡萄糖、10g 蛋白胨和 20g 琼脂粉，加 1000mL 蒸馏水，放到一只烧瓶中混合，将烧瓶放于沸水浴中加热，充分地溶解，再用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液将 pH 调至 5.6 ± 0.2 ，盖上棉塞，在 103kPa、 121°C 灭菌 15min。当使用时，把培养基的温度调整为 $45^{\circ}\text{C}\sim 46^{\circ}\text{C}$ 。若不立刻使用，把它放在 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存。保存期不能超过一个月。

C.2.4 斜面培养基：向一支试管里面注入约 10mL 营养琼脂培养基(或沙氏琼脂培养基)，盖上棉塞，在 103kPa、 121°C 灭菌 15min。灭菌以后与水平面约 15° 的夹角放到无菌室中，使其凝固。当不立刻使用时，把它放在 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存。当没有出现冷凝

水时，可加热融化它再一次凝固后使用。保存期不能超过一个月。

C.2.5 0.03mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液：取磷酸氢二钠 2.84g，磷酸二氢钠 1.36g，蒸馏水 1000mL，配成 pH 7.2 ~7.4 的缓冲液，用 250mL 烧瓶分装后，在 103kPa、121⁰C 灭菌 15min，备用。若不立刻使用，把它放在 5⁰C~10⁰C 的条件下保存。保存期不能超过一个月。

C.2.6 稀释用生理盐水：精确称取 8.5g 氯化钠，加 1000ml 蒸馏水，放到一只烧瓶中充分溶解。如有需要，取其中一部分放到试管中，在 103kPa、121⁰C 灭菌 15min，备用。若不立刻使用，把它放在 5⁰C~10⁰C 的条件下保存。保存期不能超过一个月。

C.2.7 洗脱试样活菌用生理盐水：精确称取 8.5g 氯化钠，加 1000ml 蒸馏水，放到一只烧瓶中充分溶解，并加 2g 非离子表面活性剂吐温-80。如有需要，取其中一部分放到试管或三角形瓶中，在 103kPa、121⁰C 灭菌 15min，备用。若不立刻使用，把它放在 5⁰C~10⁰C 的条件下保存。保存期不能超过一个月。

C.3 试验菌种及菌种保存

C.3.1 试验标准菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC10231）。

C.3.2 标准菌株的替代：可用大肠杆菌（ATCC 29522）或肺炎杆菌（ATCC 4352）代替大肠杆菌（8099）。

C.3.3 菌种转种及保存：储存的菌种没一个月应转种一次，转种次数不应超过 10 代。而且转种保存一个月或者更长时间，不能用来下一次转种。菌种转种后放于 5⁰C~10⁰C 条件下保存。

C.4 接种菌液的制备

C.4.1 二步预培养程序制备细菌接种菌悬液：从 3~10 代的菌种试管斜面中取已接种环细菌，在平皿的培养琼脂培养基上划线，在 37⁰C ± 1⁰C，培养 20h~24h，取营养肉汤 20ml 放入 100ml 三角形瓶中，用接种环从已培养 20h~24h 的平皿中挑一个典型的菌落，接种到营养肉汤中，在 37⁰C ± 1⁰C，130r/min 震荡培养 18h~20h，即制成了接种菌悬液。此菌液用比浊法或稀释法测定，活菌数应达到 1 × 10⁹cfu/mL~5 × 10⁹cfu/mL。此新鲜菌液不可放在冰箱中保存，应在尽可能短的时间内进行后续的稀释接种操作，以保证接种菌的活性。

C.4.2 预培养程序制备白色念珠菌等真菌接种菌悬液：从3~10代的菌种中取一接种环，在另一只装有沙氏琼脂培养基试管斜面上划线，培养18h~24h，得新鲜培养物，再加5ml 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液，反复吹吸，洗下新鲜菌液，然后用5ml吸管将洗液移至另一只无菌试管中，在手上振摇80次，使其均匀，即制成了接种菌悬液。此菌液用比浊法或稀释法测定，活菌数应达到 1×10^9 cfu/mL~ 5×10^8 cfu/mL。此新鲜菌液不可放在冰箱中保存，应在尽可能短的时间内进行后续的稀释接种操作，以保证接种菌的活性。

C.5 抗菌防臭袜测试方法：吸收法

C.5.1 实验准备

C.5.1.1 试样准备：精确称取 $0.4\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 、边长约18mm的正方形叠起来作为一个试样。准备2个标准空白试样，1个抗菌防臭袜试样。另取一个未经抗菌处理的织物试样，作阳性对照。做样时应小心，避免污染。

注1：2个标准空白试样，其中一个用于“0”时接触时间测试接种菌数量，另1个用于18h培养后测试生长菌数量。

C.5.1.2 试样灭菌：将试样分别放入管形瓶中，把管形瓶放入到一个网状金属篮子里，在篮子上面盖一层铝箔，并且各个管形瓶口用铝箔扎起来，把篮子放到灭菌锅里保持103kPa、 121°C 灭菌15min，让它自然冷却到 100°C ，立即从灭菌锅里取出来，拿走篮子上的铝箔，放到超净台上晾干1h，注意扎紧管形瓶口的铝箔，不使其松散。

注2：如果试样容易卷曲，取 $0.4\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 试样，叠成约18mm的正方形，用一段玻璃棒压在试样的上面，把它放入管形瓶里灭菌。或者做成 $0.4\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 约18mm的正方形，在其一端或两端用细线把它固定好，灭菌。

注3：如果是棉花或毛状物，放 $0.4\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 到管形瓶里，压上一段玻璃棒，灭菌。

注4：如果是纱线，把它们卷成 $0.4\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 一束做成一个包状，压上一段玻璃棒，灭菌。

C.5.1.3 接种菌液的准备

a) 用吸管从制备的细菌悬液中吸0.3mL~1mL。（参考数值。由此步骤调整接种活菌数目，大肠杆菌取下限，金黄色葡萄球菌取上限），加入到装有9mL营养肉汤的试管中，充分混合均匀后吸取1mL，加入到装有9mL营养肉汤的试管中，充分混合均匀后吸取1mL，加入到装有9mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的试管中，充分混合均匀。由此固定的四步稀释操作程序，可将活菌数调整为 0.7×10^5 cfu/mL~ 1.5×10^5 cfu/mL

（大肠杆菌取下限，金黄色葡萄球菌取上限）。用来对试样接种。此接种菌液中约含有1%的营养肉汤，用以提供试验菌的营养，此接种菌液不可放在冰箱里保存，应尽快使用，以保持接种菌的活性。

b) 用 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液作为稀释液，把制备的白色念珠菌悬液稀释成含活菌数 $1.0 \times 10^5 \text{cfu/mL} \sim 1.3 \times 10^5 \text{cfu/mL}$ ，用来对试样接种。此接种菌液不可放在冰箱里保存，应尽快使用，以保持接种菌的活性。

C.5.2 试验操作

C.5.2.1 试样接种：用一支吸管精确地吸取已经准备好的接种菌液 0.2mL，接种到已准备好的试样上面，在试样上均匀地以几个点滴上接种菌液，并把管形瓶盖子扎紧。

注 6：当试样拒水，难以浸渍接种液时，可在接种液中另加入 0.05% 非离子表面活性剂。如果加入了表面活性剂，应记载在试验报告里。

C.5.2.2 试样培养：培养管形瓶里已接种的试样（3 个标准空白试样、3 个抗菌防臭袜试样及 3 个未经抗菌处理的织物试样），在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{h} \pm 1\text{h}$ 。

C.5.2.3 洗脱试样上的活菌：

a) 标准空白试样接种后“0”时接触时间洗脱。用于“0”时接触时间测试接种菌数量的标准空白试样，接种后，立即向管形瓶中加入洗脱试样活菌用冰冷生理盐水 20mL，扎紧管形瓶盖子，用手击打（30 次，幅度 30cm）或振荡器震荡（5s、5 次），把试样上的活菌洗脱下来。

b) 接种培养 18h 后的试样活菌洗脱。分别向接种了试验菌，并培养 $18\text{h} \pm 1\text{h}$ 后的三个试样中加入洗脱试样活菌用冰冷生理盐水 20mL，扎紧管形瓶盖子，用手击打（30 次，幅度 30cm）或振荡器震荡（5s、5 次），把试样上的活菌洗脱下来。

C.5.2.4 洗脱液稀释：用 1mL 吸管精确的从管形瓶里吸取 $1\text{mL} \pm 0.1 \text{mL}$ 洗脱液，放入装有稀释用冷生理盐水 $9\text{mL} \pm 0.1 \text{mL}$ 的试管，摇匀，然后用另一只 1mL 吸管吸取 1mL，放入另一只装有稀释用冷生理盐水的 $9\text{mL} \pm 0.1 \text{mL}$ 试管，摇匀，重复这些步骤，用 10 倍稀释法准备一个稀释系列。

C.5.2.5 浇皿培养：从各个稀释度的试管中每次吸取 $1\text{mL} \pm 0.1 \text{mL}$ ，分别放到 2 个平皿中作平行样，每次换一只吸管。在平皿中加入营养琼脂培养基（或沙氏琼脂培养基）约 15mL，室温凝固。倒置平皿，放入生化培养箱培养，在温度 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，时间 24h ~ 48h（白色念珠菌 48h ~ 72h）。选择菌落数在 30~300 之间的合适稀释度的平皿计数。

注 7：标准空白试样接种“0”时接触时间洗脱浇皿培养后，在 10^{-1} 稀释度平皿中，平均菌落数

应控制在 70 ~ 150 的范围，其中大肠杆菌宜控制在 70 左右，金黄色葡萄球菌宜控制在 150 左右，白色念珠菌宜控制在 110 左右，否则影响试验精度。

C.5.2.6 计算活菌数目：按照下式计算活菌数目（保留两位有效数字）：

$$M = E \times N \times 20 \quad \dots\dots\dots (D.2)$$

式中：

- M — 试样的活菌数（cfu/片）
- E — 菌落数（两个平皿的平均值）
- N — 稀释指数， $N = 10^0, 10^1, 10^2, \dots\dots$
- 20 — 生理盐水的体积

C.5.2.7 为降低误差，对同一试样至少应做三次平行测试，取其平均值报告抑菌率。

C.5.3 试样抗菌效果计算

$$Y = \frac{M_b - M_c}{M_b} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (D.3)$$

式中：

- Y — 抑菌率
- M_b — 18h 培养后标准空白试样的活菌数
- M_c — 18h 培养后抗菌防臭袜试样或未经抗菌处理的织物试样的活菌数

C.5.4 试验有效性的判断

按下式计算生长值 F，对于金黄色葡萄球菌及大肠杆菌，当 $F \geq 1.5$ ，对于白色念珠菌，当 $F \geq 1.0$ 时，说明试验菌活性较强，试验可判定有效，否则判定为无效，要重新进行试验。

$$F = \lg M_b - \lg M_a \quad \dots\dots\dots (D.4)$$

式中：

- F — 生长值
- M_b — 18h 培养后标准空白试样的活菌数
- M_a — “0” 接触时间标准空白试样的活菌数

C.6 抗菌防臭袜测试方法：震荡法

C.6.1 试验准备

C.6.1.1 试样的准备

C.6.1.1.1 取样：将抗菌防臭袜试样、未经抗菌处理织物试样及标准空白试样，在样品中部取样。

C.6.1.1.2 剪样：将所有试样分别剪成 0.5cm 大小的碎片。

C.6.1.1.3 称样：用小称量杯称取抗菌防臭袜试样、未经抗菌处理织物试样及标准空白试样 $0.75\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 多份。将试样用小纸片包好，在 103kPa、121⁰C 灭菌 15min，备用。

C.6.1.2 接种菌液的准备

a) 用吸管从制备的细菌悬液中吸取 2mL ~ 3mL。（参考数值。由此步骤调整接种活菌数目，大肠杆菌取下限，金黄色葡萄球菌取上限），加入到装有 9mL 营养肉汤的试管中，充分混合均匀后吸取 1mL，加入到装有 9mL 营养肉汤的试管中，充分混合均匀后吸取 1mL，加入到装有 9mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的试管中，充分混合均匀后吸取 5mL，加入到装有 45mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的三角形瓶中。充分混合均匀，稀释至含活菌数目 $3 \times 10^5\text{cfu/mL} \sim 4 \times 10^5\text{cfu/mL}$ （由此固定的 4 次稀释程序，此接种菌液中含有微量的营养肉汤）。用来对试样接种。此接种菌液不可放在冰箱里保存，应尽快使用，以保持接种菌的活性。

注 8：由于不同的实验室所用的牛肉膏、蛋白胨的品味不同，上述的 4 次稀释程序准备的接种菌液的营养可能会稍多了一点（对于大肠杆菌尤其明显），其表现为震荡 18h 后标准空白样长菌量与抗菌整理试样长菌量相差太小，拉不开距离。此时，宜采用另一种固定的 4 次稀释程序：用吸管从制备的细菌悬液中吸取 2mL ~ 3mL。（参考数值。由此步骤调整接种活菌数目，大肠杆菌取下限，金黄色葡萄球菌取上限），加入到装有 9mL 营养肉汤的试管中，充分混合均匀后吸取 1mL，加入到装有 9mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的试管中，充分混合均匀后吸取 1mL，加入到装有 45mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的三角形瓶中。充分混合均匀，稀释至含活菌数目 $3 \times 10^5\text{cfu/mL} \sim 4 \times 10^5\text{cfu/mL}$ （此接种菌液中含有更微量的营养肉汤）。用来对试样接种。（可事先作一下预实验，选取抑菌率测试效果好的一种固定的 4 次稀释程序制备试样接种的细菌液。）

b) 用吸管从制备的白色念珠菌悬液中吸取 2mL ~ 3mL，加入到 9mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液中，进行 10 倍系列稀释操作，充分混合均匀后吸取 5mL，加入到装有 45mL 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液中，充分混合均匀稀释至含活菌数 $2.5 \times 10^5\text{cfu/mL} \sim 3 \times 10^5\text{cfu/mL}$ ，用来对试样接种。此接种菌液不可放在冰箱里保存，应尽快使用，以保持接种菌的活性。

C.6.2 试验操作

C.6.2.1 准备 4 个 250mL 三角烧瓶，在其中一个烧瓶中加入标准空白试样 $0.75\text{g} \pm 0.05\text{g}$ ，一个烧瓶中加入抗菌防臭袜试样 $0.75\text{g} \pm 0.05\text{g}$ ，一个烧瓶中加入未经抗菌处理的织物试样 $0.75\text{g} \pm 0.05\text{g}$ ，另一个烧瓶不加试样用于阳性对照，然后在每个烧瓶中加入 $70\text{mL} \pm 0.1\text{mL}$ 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液。

C.6.2.2 “0”接触时间制样：用吸管往标准空白试样烧瓶及阳性对照样烧瓶中各加入 5mL 已准备好的接种菌液。盖上少平改，放在往复式振荡器上，在 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，以 $250\sim 300\text{ r/min}$ ，震荡 $1\text{min} \pm 5\text{s}$ ，然后作下一步“0”接触时间取样。

C.6.2.3 “0”接触时间取样：用吸管在“0”接触时间制样的两个烧瓶中分别吸取 $1\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 溶液，移入装有 $9\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的试管中，摇匀。吸取 $1\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 溶液，移入另一只装有 $9\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的试管中，摇匀。再从试管中吸取 $1\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 加入灭菌的平皿中，接着往每一平皿中倒入营养琼脂培养基（或沙氏琼脂培养基）约 15mL，室温凝固；倒置平皿， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h} \pm 48\text{h}$ （白色念珠菌 $48\text{h} \pm 72\text{h}$ ）。各个试样浇注在两个平皿作平行样。选择菌落数在 30~300 之间的合适稀释度的平皿计数。

注 9：标准空白试样接种“0”时接触时间取样并浇皿培养后，在 10^{-2} 稀释度平皿中，金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的平均菌落数宜控制在 200 ~ 250 的范围，白色念珠菌的平均菌落数宜控制在 150 ~ 200 的范围，否则影响试验精度。

C.6.2.4 定时震荡接触：用吸管往抗菌防臭袜试样及未经处理的织物试样的烧瓶中各加入 5mL 已准备好的接种菌液，盖好瓶盖。已完成“0”接触时间取样且盖好瓶盖的另两个烧瓶不需再加接种菌液。再将此 4 个试样的烧瓶置于往复式振荡器上，在 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，以 150 r/min ，震荡 18h。

C.6.2.5 稀释培养计数：到规定时间后，从每个烧瓶中用吸管吸取 $1\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 试液，放入有 $9\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液的试管，摇匀。重复这些步骤，用 10 倍稀释法进行系列稀释。用新吸管从每个稀释度的试管中分别取 $1\text{mL} \pm 0.1\text{ mL}$ ，放入两个平皿作平行样，再向每个平皿中倒入营养琼脂培养基（或沙氏琼脂培养基）约 15mL，室温凝固，倒置平皿， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h} \sim 48\text{h}$ （白色念珠菌 $48\text{h} \sim 72\text{h}$ ）。选择菌落数在 30~300 之间的合适稀释度的平皿计数。

C.6.2.6 记录结果，求出平均菌落数，即可按下式计算试样烧瓶内的活菌浓度（保留两位有效数字）：

$$K = Z \times N \dots\dots\dots (D.5)$$

式中：

K — 试样烧瓶内的活菌浓度（cfu/mL）

Z — 菌落数（两个平皿的平均值）

N — 稀释指数， $N = 10^0, 10^1, 10^2, \dots$

C.6.2.7 为降低误差，对同一试样至少应做三次平行测试，取其平均值报告抑菌率。

C.6.3 试样的抗菌效果计算

$$Y = \frac{W_b - W_c}{W_b} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (D.6)$$

式中：

Y — 抑菌率

W_b — 标准空白样震荡接触 18h 后烧瓶内的活菌浓度

W_c — 抗菌防臭袜试样或未经抗菌处理的织物试样真当接触 18h 后烧瓶内的活菌浓度

C.6.4 试验有效性的判断

若对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌等细菌： $1gW_b - 1gW_a \geq 1.0$ ，对于白色念珠菌等真菌： $1gW_b - 1gW_a \geq 0.5$ ，且阳性对照样与空白试样烧瓶中的活菌浓度接近，说明试验菌活性较强，试验可判定有效，否则判定为无效，要重新进行试验。

式中：

F — 生长值

W_b — 标准空白样震荡接触 18h 后烧瓶内的活菌浓度

W_a — 空白试样“0”接触时间烧瓶内的活菌浓度