

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX—20XX

牙科学 评估牙科修复材料、粘固材料、窝沟封闭剂和正畸粘接或粘固材料的抗菌活性

Dentistry-Evaluation of antibacterial activity of dental restorative materials, luting materials, fissure sealants and orthodontics bonding or luting materials

(ISO 3990: 2023, IDT)

(标准草案)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件等同采用ISO 3990 2023 《Dentistry—Evaluation of antibacterial activity of dental restorative materials, luting materials, fissure sealants and orthodontics bonding or luting materials》（牙科学 评估牙科修复材料、粘固材料、窝沟封闭剂和正畸粘接或粘固材料的抗菌活性）。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会（SAC/TC 99）归口。

本文件起草单位：北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心

本文件的主要起草人：

本文件为首次制定。

引言

鉴于抗菌活性体外检测方法的普适性，且被广泛应用于评估各种不同的牙科材料，本文件旨在定义一种检测方案而不是单个具体的检测，该方案需要通过一系列步骤来制定。这将会为要评估的相应牙科材料选择最合适的检测方法。

本文列出了两类检测方法：浸提液检测法和直接接触检测法。

选择这些类别中的一个或多个取决于要评估的材料的性质、潜在的使用部位以及相应材料的使用性质。浸提液检测法主要针对从材料中浸提出的物质，而直接接触检测法则同时考察浸提物质的影响以及表面效应。检测方法的选择进而决定了受试样品的制备细节、细菌培养物或生物膜的制备、以及细菌或生物膜暴露于样品或其浸提物的方式。

这两类检测都首先针对细菌的悬浮培养物进行，若结果呈阳性，则进一步针对细菌生物膜进行检测。

本文件建议将检测细菌增殖量的降低作为评估抗菌效果的主要方法。此外，可以通过评估细菌细胞膜损伤来进一步验证细菌细胞的死亡，还可研究细菌代谢活性的降低来作为细菌生存能力的另一项衡量标准。

每一类检测中都有好几种可以得出结果的检测方法。检测人员应了解检测类别以及特定检测技术适合哪个类别，以确保同类材料的检测结果在实验室内和实验室间层面的可比性。

本文件列举了定量检测方案以及结果解释的指导的相关示例：通过菌落形成单位(CFU)来评估细菌增殖量的降低，通过流式细胞仪评估细菌细胞膜损伤，以及通过 MTT 法评估细菌代谢活性的降低。

牙科学 评估牙科修复材料、粘固材料、窝沟封闭剂和正畸 粘接或粘固材料的抗菌活性

1. 范围

本文件规定了评估牙科修复材料、粘固材料、窝沟封闭剂和正畸粘接或粘固材料所宣称的“抗菌”功效的检测方法。

注意：本文件不涵盖盖髓材料（如氢氧化钙糊剂），根管充填材料、牙科种植体或种植系统，夜间防护材料或增材制造（如3D打印）材料。

本文件不涵盖灭菌或消毒有效性的测试。本文件不能用于证明牙科使用的医疗设备无微生物污染。

2. 引用标准

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（包括所有的修订单）适用于本文件。

ISO 1942 牙科学 名词术语 (Dentistry — Vocabulary)

注：GB/T 9937—2020 牙科学 名词术语 (ISO 1942:2009, MOD)

ISO 4049 牙科学 聚合物基修复材料 (Dentistry—Polymer-based restorative materials)

注：YY 1042-2023 牙科学 聚合物基修复材料 (ISO 4049:2019, MOD)

ISO 6344-3 涂附磨具用磨料 粒度分析 第3部分：微粉 P240~P5000 粒度组成的测定 (Coated abrasives — Grain size analysis — Part 1: Grain size distribution test)

注：GB/T 9258.3—2017 涂附磨具用磨料 粒度分析 第3部分：微粉 P240~P5000 粒度组成的测定 (ISO 6344-3:2013, MOD)

ISO 7405 牙科学 牙科用医疗器械的生物相容性评价 (Dentistry—Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry)

注：YY/T 0268-2008 牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第1单元：评价与试验 (ISO/FDIS 7405:2008, NEQ)

ISO 9917-1 牙科学 水基水门汀-第1部分：粉/液酸基水门汀 (Dentistry—Water-based cements—Part 1: Powder/liquid acid-base cements)

注：YY 0271.1-2016 牙科学 水基水门汀 第1部分：粉/液酸碱水门汀 (ISO 9917-1:2007, MOD)

ISO 9917-2 牙科学 水基水门汀-第2部分：树脂改性水门汀 (Dentistry—Water-based cements—Part 2: Resin-modified cements)

注：YY 0271.2-2009 牙科学 水基水门汀 第2部分：树脂改性水门汀 (ISO 9917-2:2010, IDT)

ISO 10993-1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验 (Biological evaluation of medical devices—Part 1: Evaluation and testing within a risk management process)

注：GB/T 16886.1-2022 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验 (ISO 10993-1:2018, IDT)

ISO 10993-5 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验 (Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity)

注：GB/T 16886.5-2017 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验 (ISO 10993-5:2009, IDT)

ISO 10993-12 医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照材料 (Biological evaluation of medical devices—Part 12:Sample preparation and reference materials)

注：GB/T 16886.12-2023 医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照材料 (ISO 10993-12:2021, IDT)

ISO 10993-18 医疗器械生物学评价 第 18 部分：风险管理过程中医疗器械材料的化学表征 (Biological evaluation of medical devices—Part 18:Chemical characterization of medical device materials within a risk management process)

注：GB/T 16886.18-2022 医疗器械生物学评价 第 18 部分：风险管理过程中医疗器械材料的化学表征 (ISO 10993-18:2020, IDT)

3. 术语及定义

ISO 1942、ISO 7405、ISO 10993-1 和 ISO 10993-5 中给出的下列术语和定义适用于本标准。

3.1 牙科修复材料

专门配制和制备的材料或材料组合，用于牙科和/或相关步骤来恢复缺损牙齿的完整性或替代缺失牙。

3.2 阳性对照材料

表征完善的材料和/或物质，当用特定的检测方法进行评估时，可在检测体系中产生可重现的、恰当的阳性或活性响应，以此证明该检测体系的适用性[来源：ISO 7405:2018, 3.3]

3.3 阴性对照材料

表征完善的材料和/或物质，当用特定的测试方法进行评估时，可在检测体系中产生可重现的、恰当的阴性或非活性响应，以此证明该检测体系的适用性。

注释 1：在实践中，阴性对照材料包括缺乏有抗菌功效的活性成分的材料或临床实践中使用的没有抗菌活性的材料。

[来源：ISO 7405:2018, 3.4, 修改-注释 1 已被替换。]

3.4 抗菌材料

与阴性对照材料相比有抗菌活性的材料。

4. 要求

4.1 总则

宣称具有抗菌性的材料应满足 4.2 和 4.3 的要求之一。

4.2 浸提液

对于浸提液检测法，在按 7.1 中所述方法进行检测时，与阴性对照材料相比，抗菌材料应使细菌增殖量下降的中位数在至少 99.9% (3 个对数级)。

注释：这一要求符合美国微生物学会[1][2][3]的定义。

4.3 直接接触

对于直接接触检测法，在按 7.2 中所述方法进行检测时，与阴性对照材料相比，抗菌材料应使细菌增殖量下降的中位数在至少 99% (2 个对数级)。

注释：这一要求符合 JIS Z 2801 中的定义[4]

5. 样品制备及对照材料的制备

5.1 总则

本文件中所述检测方法的实施对象应为

- a) 样品的浸提液和/或
- b) 样品本身。

应对按制造商的说明书所制备的材料进行抗菌性能评估。在根据本文件测试牙科材料的抗菌性能之前，应根据 ISO 10993-1 和 ISO 10993-18 评估材料（以及浸提液）的物理和化学性能。在检测聚合物型修复材料的抗菌性能之前，应根据 ISO 4049 对材料的物理性能进行表征。在测试水门汀的抗菌性能之前，应分别根据 ISO 9917-1 或 ISO 9917-2 对材料的物理性能进行表征。

每次检测都应包括阴性及阳性对照材料，条件允许时，应采用与样品相同的步骤制备对照材料（见 5.2 至 5.5）。在任何情况下，对照材料都应具备与受试材料相同的尺寸及其他参数（如粗糙度）。对于直接接触检测法，受试材料和对照材料应为圆形，直径为 10 毫米，厚度为 1 毫米，用于 48 孔板（见 7.3）。

对于浸提液检测法，应使用 0.2% 的二葡萄糖酸氯己定作为阳性对照[5]。此外，对于阴性对照材料的浸提液，应在相应的实验中用细菌液体培养基（示例见附录 A）作为进一步的阴性对照，以确保试验的有效性。

对于直接接触测试，应使用铜片（圆形；直径 10 毫米；纯度≥99%；无可见表面杂质）作为阳性对照[6]。这些铜片应用符合 ISO 6344-3 规定的 P2000 砂纸打磨，以确保其具有与受试样品相似的粗糙度。

阴性对照材料不得表现出任何抗菌活性。因此，应使用与受试样品具有相同大小和尺寸的 PTFE 样品。

所有受试样品或对照样品在按制造商的说明进行混合/固化/铣削后，应在检测前 24 小时储存在（37±1）℃ 的无菌水中。例如，这样可以使聚合物中的单体浸出。24 小时后，所有受试样品或对照样品应立即进行检测，并在连续 10 个洗脱循环周期后（见 5.7.4）进行检测，以评价长期抗菌活性[7]。如果在 10 个洗脱循环周期后仍然观察到抗菌活性，则应在 20 个洗脱循环周期后进行进一步测试来验证该样品抗菌活性的平台期。

应根据 ISO 10993-18 额外进行浸提液的化学分析。

5.2 样品制备的一般要求和建议

样品制备应符合 ISO 7405、ISO 10993-12、ISO 4049、ISO 9917-1 和 ISO 9917-2。在准备样品时，请查阅各自的产品标准和/或制造商的说明书，并尽可能严格遵循这些描述。并证明任何偏离制造商说明书操作的合理性。样品制备的详细说明应包含在测试报告中。样品制备应考虑以下因素：

- a) 温度
- b) 湿度
- c) 光照：光敏材料样品应在不被激活的环境光条件下制备
- d) 样品模具材料：确保样品模具的材料和最终使用的润滑剂不会干扰材料的凝固过程；
- e) 氧气暴露：对于在硬化过程中会产生氧气抑制层的材料，在硬化过程中，模具的两端应覆盖透明的氧气阻隔材料（例如聚酯/聚酯薄膜条）

- f) 样品应在无菌条件下制备，若无法实现，在必要且可能的情况下，样品可通过适合该材料的方式进行灭菌（见 5.7.3）。

5.3 光固化材料的具体要求和建议

根据 ISO 7405 的要求，考虑光固化材料的最终用途，应注意如下要点：
反射系数接近牙科硬组织的合适样品模具材料可以是半透明或白色塑料材料，如聚乙烯（PE）或聚四氟乙烯（PTFE）。

光照：应进行光固化，以尽可能模拟最接近临床使用的情形。这通常只需要对一面进行照射，但有时需要进行双面照射。固化方法有材料和/或工艺的特异性。对于单组分材料，在不放大的情况下观看时，不应存在空隙、裂缝或气泡。提供与临床使用等效的固化水平，请遵循材料制造商的使用说明，包括推荐的动力聚合激活剂，其中应包括激发波长区域、辐照度和暴露时间。此信息应记录在测试报告中，应注意确保光源和操作条件符合材料制造商的使用说明。

氧气暴露：对于在光固化过程中产生氧抑制层的材料，在光固化过程中，模具的两端应覆盖透明氧屏障材料（例如聚酯/聚酯条）。

样品表面处理：如果制造商推荐对固化后的材料进行表面处理，样品表面应按推荐的临床操作步骤进行打磨和抛光。如果没有此类说明且需要检测，样品应在贴附透明氧气屏障材料后对两端使用符合 ISO 6344-3 的 P2000 砂纸进行打磨。

5.4 化学固化材料的具体要求和建议

根据 ISO 7405、ISO 9917-1 和 ISO 9917-2 的要求，考虑化学固化材料的最终用途，应注意以下要点：

- a) **混合：**混合足够的材料，以确保每个样品的制备都来源于同一批次。每个样品都使用新鲜混合物制备。混合应根据各自的产品标准（如果适用）进行。
- b) **氧气暴露：**对于在化学固化过程中产生氧气抑制层的材料，模具的两端应覆盖透明氧屏障材料（例如聚酯/聚酯条）。
- c) **样品表面处理：**如果制造商推荐对固化后的材料进行表面处理，样品表面应按推荐的临床操作步骤进行打磨和抛光。如果没有此类说明且需要检测，样品应在贴附透明氧气屏障材料后对两端使用符合 ISO 6344-3 的 P2000 砂纸进行打磨。

5.5 对 CAD/CAM 切削或减材制造材料的具体要求和建议

考虑到 CAD/CAM 切削或减材制造材料的最终用途，应注意以下要点：
样品表面处理：如果制造商建议材料在 CAD/CAM 切削或减材制造后进行表面处理，样品表面应按推荐的临床操作步骤进行打磨和抛光。如果没有此类说明且需要检测，应对样品两端使用符合 ISO 6344-3 的 P2000 砂纸进行打磨。

5.6 样品的灭菌

应考虑样品的灭菌。

以无菌形式提供的牙科材料样品应在整个检测过程中遵循无菌操作。

以非无菌形式提供但在使用前需进行灭菌的牙科材料样品应使用制造商推荐的方法进行灭菌，并在整个检测过程中遵循无菌操作。在进行检测之前，需明确灭菌方法或制剂对样品制备的影响。

不需要以无菌形式使用的牙科材料样品应按所提供的形式使用，并在整个检测

过程中遵循无菌操作。为了避免细菌培养过程中的交叉污染，对受试材料进行去污是合理的；但是，去污过程不应改变受试材料的特性。建议在 70% 的乙醇中浸泡 1 分钟-除非另有说明-以减少交叉污染，然后在无菌水中浸泡 1 分钟。如果其有效性已得到证明，并且已验证它们不会改变材料特性，则可以使用其他去污方法。如果使用非无菌样品，应检查细菌交叉污染，因为污染会导致对抗菌特性的错误评估。

5.7 材料浸提液的制备

5.7.1 浸提原则

浸提液的制备应在按制造商说明书进行混合/固化后，在 (37 ± 1) °C 的无菌水中储存 24 小时后进行，并在连续 10 个洗脱循环周期后（见 5.7.4）进行，以评价长期抗菌活性[7]。

如果在 10 个洗脱循环周期后仍然观察到抗菌活性，则应在 20 个洗脱循环周期后进行进一步测试来验证该样品抗菌活性的平台期(即持久效应)。

根据 ISO 10993-18，应在第 10 和第 20 个循环周期后额外进行浸提液的化学分析。浸提条件应尽量模拟或夸大临床使用条件，以确保在明确潜在抗菌活性的同时不会引起样品的重大变化，如融合、熔化或化学结构的任何改变，除非是在临床应用中的预期变化。由于某些材料（例如可生物降解材料）的性质，在提取过程中可能会发生化学结构的改变。

注：与受试细菌接触的浸提液中的内源性或外源性物质的浓度，取决于接触面积、浸提体积、pH 值、化学溶解度、扩散速率、渗透浓度、搅拌、温度、时间和其他因素。

5.7.2 浸提介质

浸提介质的选择应考虑样品的化学特性，并说明其合理性且形成文件。可以使用以下一种或多种浸提介质：

- a) 相应试验体系中细菌培养用的液体培养基（见附录 A 示例）
- b) 磷酸盐缓冲盐液（PBS）；
- c) 血清（用于脂质类浸提）。

浸提液的选择应该反映浸提的目的。由于液体培养基既能提取极性物质，也能提取非极性物质，因此是首选浸提介质。

注：需注意的是，已知富含蛋白质或含血清的液体培养基中的蛋白质会在一定程度上结合可浸提物。

5.7.3 浸提条件

浸提步骤应遵循 ISO 10993-5。

浸提应遵循无菌操作，按照 ISO 10993-12 的要求基于接触表面积来设定浸提介质体积，并在无菌的、化学惰性且密闭的容器中进行，

除以下情况外，提取应在以下条件之一下进行，并应符合材料特性和具体使用条件：

- a) (37 ± 1) °C 条件下 24 小时
- b) (37 ± 1) °C 条件下 72 小时

可以使用其他模拟临床使用过程或能充分评估材料抗菌特性的浸提条件，但应说明合理性并形成文件。

在与细菌接触之前，不对浸提液进行额外操作，例如调整 pH 值、过滤、离心或其他加工方法，因为会影响结果。如果仍然需要进行此类操作，这些细节应记录在最终报告中，并附上额外步骤的说明。

5.7.4 连续洗脱循环

为明确长期抗菌活性，可通过使用上述浸提介质（见 5.7.2）和浸提条件（见 5.7.3）进行连续的洗脱循环。

整个洗脱程序应通过连续执行至少 10 次单一的洗脱步骤来进行。对于每一次洗脱，样品应在 (37 ± 1) °C 下避光储存 (24 ± 2) 小时或 (72 ± 2) 小时。此后，应更换新的浸提介质，再进行下一次浸提。这一过程需重复 10 次。鉴于此，样品需浸提一周到两周时间。每周按 24 小时间隔期更换 4 次浸提介质，按 72 小时的间隔期更换一次浸提介质，共更换 10 次。用于检测的浸提液需为 24 小时的浸提液而不是 72 小时的浸提液。

如果在第 10 次洗脱循环后还能观察到浸提液有抗菌活性，要再进行 10 次洗脱循环，并在 20 次洗脱循环后对浸提液进行检测以证明抗菌活性的平台期（即持续效果）。鉴于此，样本要进行四周的浸提，每周按 24 小时间隔期更换 4 次浸提介质，按 72 小时的间隔期更换一次浸提介质。共更换 20 次。用于检测的浸提液需为 24 小时的浸提液而不是 72 小时的浸提液。

根据 ISO 10993-12 的规定，在可行的情况下，浸提液应在制备后立即使用以防止其吸附在浸提容器上或引起其他成分变化。如果浸提液在 2~8 °C 下冷藏储存超过 24 小时，应验证储存条件下浸提液的稳定性和均匀性。

5.8 用于直接接触测试的材料的制备

5.8.1 材料的样式

固体材料的首选样品应为直径 10 毫米、厚度为 1 毫米的圆形，可用于 48 孔板。应该至少有一个平坦的表面。如果没有，应进行调整以获得平坦的表面。对于具有另一种物理状态的固体材料（凝胶等），它们可以以自身的各种形状或尺寸进行检测，而无需在抗菌检测中进行改变。所有样品应具备相似的形状。在这些情况下，需要相应调整用于细菌培养的液体培养基的量。

5.8.2 直接接触测试的原则

直接接触的测试应在根据制造商说明书进行混合/固化后，在 (37 ± 1) °C 的无菌水中存放 24 小时后进行，并在连续 10 个洗脱循环（见 5.7.4）后进行，以评价长期抗菌活性[7]。

如果在 10 个洗脱循环周期后仍然观察到抗菌活性，则应在 20 个洗脱循环周期后进行进一步测试来验证该样品抗菌活性的平台期（即持续效应）[7]。应确保在浸提中样品的所有表面都是暴露的。样品粘在一起可能会导致表面未被浸提和出现假阳性结果。使用适当的支架（见图 1）放置样品进行提取。应使用大量的浸提介质来浸提样品，即至少 $10\text{ml}/\text{cm}^2$ 的样品表面。

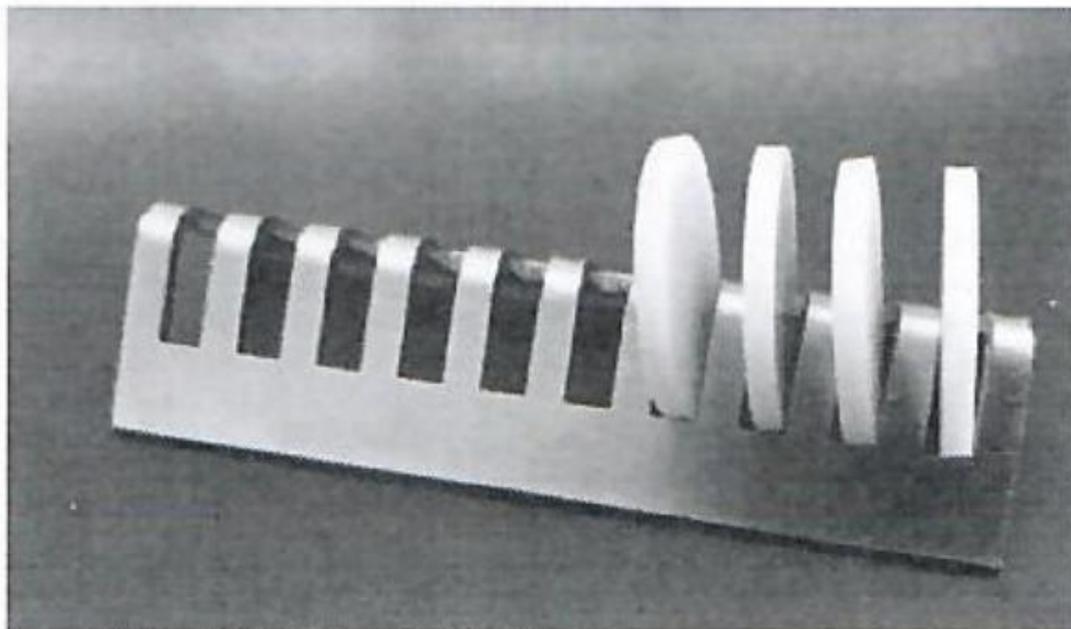


图 1 样品放置支架示例

使用下列浸提介质之一：

- a) 相应试验体系中细菌培养用的液体培养基（见附录 A 示例）；
- b) PBS。

对于非中性 pH 的材料，例如水门汀、含有碱性玻璃或可能受到腐蚀的产品，应使用 PBS。在这种情况下，还应考虑再充能力（例如玻璃离子基材料）。

6. 细菌菌株，液体培养基及细菌培养物的制备

首选已明确来源的细菌模式株或参考菌株，如果使用，应从公认的保藏中心获得¹⁾。细菌菌株的选择应基于这些微生物与相应材料应用领域的相关性（例如链球菌用于修复或正畸相关的材料）。由于可获取性有限，且对结果的可比性有潜在影响，因此不应使用临床分离菌株。

附录 A 总结了推荐用于本文所述试验的细菌种类或参考菌株及其相应的液体培养基和固体培养基。

所有试验的实施均应符合适当的微生物操作规程。

如果对细菌菌株进行保藏，则应在含有冷冻保护剂（如甘油）的相应的液体培养基中储存在-80℃或以下。液体培养基应符合所选细菌模式株的生长要求。只可使用没有任何交叉污染的细菌菌株。在使用前，应检测保藏培养物是否无交叉污染（例如通过 MALDI-TOF 分析）。只使用纯化的细菌培养物。试验所用细菌培养物应是无菌的，并且没有任何交叉污染。

使用所选的细菌模式株或参考菌株和液体培养基，准备足够的悬浮细菌培养物来完成检测。避免在琼脂培养基或液体培养基中进行五次以上的传代培养，因为传代会改变所选细菌模式株的特性。

1) 例如，来自美国模式培养保藏中心（ATCC）、Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) 或国家模式培养物保藏中心 (NCTC)。

2) 例如, 世卫组织制药微生物实验室良好做法 (世卫组织技术报告系列, 第 961, 2011 年, 附件 2) [8]。

7. 检测步骤

7.1 总则

抗菌性能评估应在最终成品上进行。

至少对受试样品、阴性对照材料和阳性对照材料进行三次独立试验, 且每次试验至少设三个重复。

7.2 浸提液检测法

7.2.1 浸提液对悬浮细菌的作用检测

7.2.1.1 原理

该检测可通过考察悬浮培养物中的细菌增殖能力的降低、细菌细胞膜损伤, 以及细菌代谢活性的降低来评估抗菌性能。

7.2.1.2 仪器、材料及试剂

7.2.1.2.1 仪器

7.2.1.2.1.1 细胞培养实验室设备, 如移液器, 孵箱。

7.2.1.2.1.2 96 孔板。

7.2.1.2.2 材料和试剂

7.2.1.2.2.1 受试样品及对照样品的浸提液 (见 5.6)。

7.2.1.2.2.2 液体培养基 (见附录 A)。

7.2.1.2.2.3 阳性对照材料: 0.2% 的二葡萄糖酸氯己定。

7.2.1.2.2.4 阴性对照材料, 液体培养基 (见附录 A)

7.2.1.3 试验步骤

根据所选菌株适宜的培养条件, 在有氧或厌氧条件下, $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 过夜培养受试菌株 (见附录 A)。用相同的液体培养基将菌液浓度调节至 2.5×10^5 CFU/mL~ 10×10^5 CFU/mL 之间, 使用与上述细菌浓度相对应的光密度值 (在 600 nm 波长下测量) 作为调节指示。

注: 尽管不同菌株间有轻微差异, 但通常光密度值为 0.1 (600 nm 波长下测量) 时相当于大约 10^7 CFU/ml 的起始接种量。

吸取已调节好的过夜培养的测试菌液加入到 96 孔板的所需数量的孔中, 每孔 100 μl , 用于浸提液检测。

分别往各孔菌液中加入 100 μl 如下物质:

a) 原始浸提液, 和/或

b) 原始浸提液和用浸提介质作为稀释溶剂的浸提液系列稀释液

或者, 当已知或怀疑材料溶解度有限时, 应通过改变样品与浸提介质的原始提取比来实现稀释。

为阴性对照材料和阳性对照材料准备复孔。

根据所选菌株适宜的培养条件 (见附录 A), 在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 有氧或厌氧条件下, 培养至与所选具体检测方案相对应的适当时长。

如果过夜培养物与浸提液在共培养期间形成了生物膜, 将生物膜完全重悬至上清液中 (通过用移液器不断上下吹打的方式, 并用肉眼判断生物膜是否完全清除)。

7.2.2 浸提液对细菌生物膜作用的检测

7.2.2.1 原理

该检测通过考察生物膜中的细菌增殖能力的降低、细菌细胞膜损伤，以及细菌代谢活性的降低来评估抗菌性能。

7.2.2.2 仪器、材料及试剂

7.2.2.2.1 仪器

7.2.2.2.1.1 细胞培养实验室设备，如移液器，孵箱。

7.2.2.2.1.2 96 孔板。

7.2.2.2.2 材料和试剂

7.2.2.2.2.1 受试样品及对照样品的浸提液（见 5.6）。

7.2.2.2.2.2 液体培养基（见附录 A）。

7.2.2.2.2.3 磷酸盐缓冲液

7.2.2.2.2.4 阳性对照材料：0.2%的二葡萄糖酸氯己定。

7.2.2.2.2.5 阴性对照材料，液体培养基（见附录 A）

7.2.2.3 试验步骤

根据所选菌株适宜的培养条件，在有氧或厌氧条件下， $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 过夜培养受试菌株（见附录 A）。用相同的液体培养基将菌液浓度调节至 2.5×10^5 CFU/mL~ 10×10^5 CFU/mL 之间，使用与上述细菌浓度相对应的光密度值（在 600 nm 波长下测量）作为调节指示。

注：尽管不同菌株间有轻微差异，但通常光密度值为 0.1（600 nm 波长下测量）时相当于大约 10^7 CFU/ml 的起始接种量。

吸取已调节好的过夜培养的测试菌液加入到平底 96 孔板的各个孔中，每孔 200 μl ，用于生物膜的形成。

根据所选菌株适宜的培养条件（见附录 A），在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 有氧或厌氧条件下培养，总体生物膜培养期至少达到 48 小时。每 24 小时轻轻弃去旧的液体培养基，注意不要影响到孔板底部已附着的细菌，然后加入新鲜的液体培养基。

在经过总体至少 48 小时的生物膜培养期后，小心地弃去液体培养基，并使用移液管向每孔中的细菌生物膜加入 100 μl 以下物质：

a) 原始浸提液，和/或

b) 原始浸提液和用浸提介质作为稀释溶剂的浸提液系列稀释液

或者，当已知或怀疑材料溶解度有限时，应通过改变样品与浸提介质的原始提取比来实现稀释。

为阴性对照材料和阳性对照材料准备复孔。

根据所选菌株适宜的培养条件（见附录 A），在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 有氧或厌氧条件下，培养至与所选具体检测方案相对应的适当时长。

小心地弃去液体培养基，将生物膜在 PBS 中重悬（加入 200 μl PBS，并不断上下吹打，然后通过肉眼观察以确认生物膜完全去除），转移到新容器中并进行超声处理（超声水浴槽；35kHz，5 分钟）以分散聚集的细菌细胞。

按照 7.4 中所述确定抗菌效果。

7.3 直接接触检测法

7.3.1 直接接触对悬浮细菌的作用检测

7.3.1.1 原理

该检测可通过考察悬浮培养物中的细菌增殖能力的降低、细菌细胞膜损伤，以

及细菌代谢活性的降低来评估抗菌性能。

7.3.1.2 仪器、材料及试剂

7.3.1.2.1 仪器

7.3.1.2.1.1 细胞培养实验室设备，如移液器，孵箱。

7.3.1.2.1.2 48孔板。

7.3.1.2.2 材料和试剂

7.3.1.2.2.1 受试样品及对照样品（见 5.7）。

7.3.1.2.2.2 液体培养基（见附录 A）

7.3.1.3 试验步骤

根据所选菌株适宜的培养条件，在有氧或厌氧条件下， $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 过夜培养受试菌株（见附录 A）。用相同的液体培养基将菌液浓度调节至 2.5×10^5 CFU/mL~ 10×10^5 CFU/mL 之间，使用与上述细菌浓度相对应的光密度值（在 600 nm 波长下测量）作为调节指示。

注：尽管不同菌株间有轻微差异，但通常光密度值为 0.1（600 nm 波长下测量）时相当于大约 10^7 CFU/ml 的起始接种量。

将样本放置到 48 孔板的足够数量的孔中，可使用用于牙印模的 A 硅酮材料将样品固定在孔底部，且在 A 硅酮材料和样品之间的结合处不能有任何不规则或缝隙。小心地用移液管将调节后的所选细菌菌株过夜培养物等份移液到置有样品的各个孔中，直至液面刚好与样品表面齐平但不覆盖样品表面。接着向每孔中加入 180 μl 过夜培养的菌液，使得所有样品被菌液覆盖同等厚度。这就导致样品被 2 mm 厚的过夜菌液覆盖。

确保样品上方空间均覆盖液体培养基。

为阴性对照材料和阳性对照材料准备复孔。

根据所选菌株适宜的培养条件（见附录 A），在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 有氧或厌氧条件下，培养至与所选具体检测方案相对应的适当时长。

按照 7.4 中所述确定抗菌效果。

7.3.2 直接接触对细菌生物膜作用的检测

7.3.2.1 原理

该检测通过考察生物膜中的细菌增殖能力的降低、细菌细胞膜损伤，以及细菌代谢活性的降低来评估抗菌性能。

7.3.2.2 仪器、材料及试剂

7.3.2.2.1 仪器

7.3.2.2.1.1 细胞培养实验室设备，如移液器，孵箱。

7.3.2.2.1.2 48孔板。

7.3.2.2.2 材料和试剂

7.3.2.2.2.1 受试样品及对照样品（见 5.7）。

7.3.2.2.2.2 液体培养基（见附录 A）。

7.3.2.2.2.3 磷酸盐缓冲液

7.3.2.3 试验步骤

根据所选菌株适宜的培养条件，在有氧或厌氧条件下， $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 过夜培养受试菌株（见附录 A）。用相同的液体培养基将菌液浓度调节至 2.5×10^5 CFU/mL~ 10×10^5 CFU/mL 之间，使用与上述细菌浓度相对应的光密度值（在 600 nm 波长下测量）作为调节指示。

注：尽管不同菌株间有轻微差异，但通常光密度值为 0.1（600 nm 波长下测量）时相当于大约 10^7 CFU/ml 的起始接种量。

将样本放置到 48 孔板的足够数量的孔中，可使用用于牙印模的 A 硅酮材料将样品固定在孔底部，且在 A 硅酮材料和样品之间的结合处不能有任何不规则或缝隙。小心地用移液管将调节后的所选细菌菌株过夜培养物等份移液到置有样品的各个孔中，直至液面刚好与样品表面齐平但不覆盖样品表面。接着向每孔中加入 180 μ l 过夜培养的菌液，使得所有样品被菌液覆盖同等厚度。最终使得样品被 2 mm 厚的过夜培养菌液覆盖。

确保样品上方空间均覆盖液体培养基。

为阴性对照材料和阳性对照材料准备复孔。

根据所选菌株适宜的培养条件（见附录 A），在 (37 ± 1) $^{\circ}$ C 有氧或厌氧条件下培养，总体培养期至少达到 48 小时。每 24 小时轻轻弃去旧的液体培养基，注意不要影响到孔板底部已附着的细菌，然后小心地加入新鲜的液体培养基直至液面刚好与样品表面齐平但不覆盖样品表面。接着向每孔中加入 180 μ l 过夜培养的菌液，使得所有样品被菌液覆盖同等厚度。最终使得样品被 2 mm 厚的过夜培养菌液覆盖。小心地弃去液体培养基，将生物膜移出并放置在含有 PBS 的新容器中，震荡 10s 后超声（超声水浴槽：35kHz，5 分钟）。重复该步骤三次以分散聚集的细菌细胞（通过肉眼观察以确认样品上的生物膜完全去除）

按照 7.4 中所述确定抗菌效果。

7.4 抗菌效果的测定：

7.4.1 总则

通过菌落计数法测定细菌增殖能力的降低来确定抗菌效果（见 7.4.2）

此外，可通过流式细胞仪测定细菌细胞膜的损伤（见 7.4.3）或通过 MTT 法测定细菌代谢活性的降低。

7.4.2 对细菌增殖能力降低的评估

7.4.2.1 仪器、材料及试剂

7.4.2.1.1 细胞培养实验室设备，如移液器，孵箱。

7.4.2.2 材料和试剂

7.4.2.2.1 磷酸盐缓冲液

7.4.2.2.2 固体培养基（见附录 A）。

7.4.2.3 试验步骤

通过菌落计数法测定细菌增殖能力的降低。

将来自浸提液检测法或直接接触检测法的细菌悬液用 PBS 进行 10 倍的系列稀释（ 10^{-2} ~ 10^{-7} ）

从每个稀释度的液体中取一定量接种到固体培养基上（如琼脂板，见附录 A）。对于每个稀释度，可以在单个平板上涂布 100 μ l~200 μ l，或者将平板分成 6 个区域，从每个稀释度的液体中取三滴 20 μ l 的液滴接种到平板上的一个区域，根据所选菌株适宜的培养条件，在 (37 ± 1) $^{\circ}$ C 有氧或厌氧条件下培养至少 24 小时。然后计算菌落数。将每一稀释度中所数的菌落数乘以相应的稀释因子，然后计算中位数及相邻四分位数（25/75% 百分位数）。

对于浸提液测试，与阴性对照材料相比，要使用“抗菌材料”这一术语需要菌落中位数下降至少 99.9%（3 个对数级）（如 4.2 所述）。

注 1：这一要求于美国微生物学会的定义一致[1][2][3]。

对于直接接触测试，与阴性对照材料相比，要使用“抗菌材料”这一术语需要菌落中位数下降至少 99%（2 个对数级）（如 4.3 所述）。

注 2：这一要求于 JIS Z 2801 中所述定义一致。

7.4.2.4 试验报告

应撰写试验报告。报告中应至少包括以下细节：

- a) 样品（批号）；
- b) 样品检验机构的名称和地址；
- c) 检验地点；
- d) 检验日期；
- e) 依据的标准（如 ISO 3990:2023）；
- f) 检测方法；
- g) 结果（包括解释计算结果的参考条款）；
- h) 任何偏离程序的情况；
- i) 观察到的任何异常特征；
- j) 报告人身份信息，包括签名和日期。

7.4.3 对细菌细胞膜损伤的评估

7.4.3.1 仪器、材料及试剂

7.4.3.1.1 仪器

7.4.3.1.1.1 细胞培养实验室设备，如移液器。

7.4.3.1.1.2 流式细胞仪。用于检测碘化丙啶和 SYBR green 的荧光。

7.4.3.1.2 材料和试剂

7.4.3.1.2.1 碘化丙啶

7.4.3.1.2.2 SYBR green

7.4.3.1.2.3 磷酸盐缓冲液

7.4.3.2 试验步骤

通过流式细胞术，在使用碘化丙啶（PI）和 SYBR green 染料染色后评估细菌膜损伤。这两种染料能嵌入 DNA，与核酸结合后荧光显著增强。SYBR green 能染所有细菌，PI 只能染细胞膜受损的细菌。

注 1：可用 SYTO-9 代替 SYBR green。

将从提取物测试或直接接触测试中的细菌悬浮液离心，弃上清，将沉淀重悬于 1 ml 的 PBS 中。对于革兰氏阳性菌，将 10 μ l 样品与 984 μ l PBS 和 1 μ l SYBR green 染料（100 \times ）混合，在室温避光孵育 15 分钟，随后加入 5 μ l PI（1 μ g/ml），再孵育 5 分钟。

染色后立即用流式细胞仪处理样品。SYBR green 发出的绿色荧光通过 FL1 检测，PI 发出的红色荧光通过 FL3 检测。在 FSC/SSC 点图上选细菌细胞，由此得出 FL1/FL3 点图。至少评估 10000 个菌细胞。根据 PI 染色或 PI 和 SYBR 绿双重染色的细菌细胞的相对数量评估细菌膜损伤。计算中位数和相邻四分位数（25/75% 百分位数）。与阴性对照材料相比，PI 染色或 PI 和 SYBR 绿双重染色的细菌细胞增加，表明相应测试材料具有膜损伤作用。

注 2：用作用于细菌的标准抗菌剂如 0.2% 的二葡萄糖酸氯己定或 0.1% 的氯化十六烷基吡啶处理培养了 72 小时的变异链球菌生物膜 10 分钟，可导致至少 70% 的菌细胞被 PI 染色或 PI/SYBR green 双染色。

7.4.3.3 试验报告

应撰写试验报告。报告中应至少包括以下细节：

- a) 样品（批号）；
- b) 样品检验机构的名称和地址；
- c) 检验地点；
- d) 检验日期；
- e) 依据的标准（如 ISO 3990:2023）；
- f) 检测方法（包括在 FSC/SSC 点图上分选细菌细胞）；
- g) 结果（包括解释计算结果的参考条款）；
- h) 任何偏离程序的情况；
- i) 观察到的任何异常特征；
- j) 报告人身份信息，包括签名和日期。

7.4.4 对细菌代谢活性降低的评估

7.4.4.1 仪器、材料及试剂

7.4.4.1.1 仪器

7.4.4.1.1.1 细胞培养实验室设备，如移液器。

7.4.4.1.1.2 酶标仪，用于 96 孔板，波长 540 nm。

7.4.4.1.2 材料和试剂

7.4.4.1.2.1 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐

7.4.4.1.2.2 二甲基亚砷

7.4.4.1.2.3 磷酸盐缓冲液

7.4.4.1.2.4 液体培养基（见附录 A）

7.4.4.2 试验步骤

通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐（MTT）法评估细胞代谢活性的降低。

将从提取物测试或直接接触测试中的细菌悬浮液离心（1800 g），弃上清，将沉淀重悬于 200 μ l 的液体培养基或 PBS 中。向菌悬液中加入 22 μ l 的 5 mg/ml MTT 溶液（溶解在液体培养基或 PBS 中），使 MTT 的终浓度达到 0.5 mg/ml，然后在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时，直到出现紫色沉淀。孵育后再次离心（1800 g），弃上清。加入 200 μ l 二甲基亚砷（DMSO），室温震荡 20 分钟，直至甲瓚结晶完全溶解。从所得溶液和 DMSO（空白对照）中分别吸取 180 μ l 到 96 孔板的孔中，使用分光光度计在 540 nm 处测量吸光度（光密度，OD）计算样品和空白对照的中位数和相邻四分位数（25/75% 百分位数），并减去空白的中位数值。与阴性对照材料相比，细菌代谢活性的降低表明相应测试材料具有降低代谢活性的作用。

阴性对照材料在 540nm 处的吸光度应至少为 0.6，以便能够正确评估代谢活性的降低。

注：与不含 0.2% 的二葡萄糖酸氯己定的对照相比，在含 0.2% 的二葡萄糖酸氯己定的液体培养基中培养变异链球菌生物膜 24 小时，可至生物膜代谢活性下降 90%。

7.4.4.3 试验报告

应撰写试验报告。报告中应至少包括以下细节：

- a) 样品（批号）；
- b) 样品检验机构的名称和地址；

- c) 检验地点；
- d) 检验日期；
- e) 依据的标准（如 ISO 3990:2023）；
- f) 检测方法；
- g) 结果（包括解释计算结果的参考条款）；
- h) 任何偏离程序的情况；
- i) 观察到的任何异常特征；
- j) 报告人身份信息，包括签名和日期。

8. 结果评定

结果的总体评估应由能够根据测试数据做出明智判断的人员进行。

如果某种牙科材料根据文中所述的检测方法能表现出抗菌效果，可为该材料的抗菌性能提供基本信息，但并不能预测其在临床使用中的效果。然而，若在这些试验中未显示出抗菌性能，在体内也不太可能有抗菌性能。

对结果的解释应基于材料的临床应用领域和适应症，以及在相应临床情况下预期的抗菌效果持续时间。例如，对于牙科粘合剂，在其固化期间有限的几小时抗菌效果可能具有临床价值，但对于预期在临床中作为直接修复材料使用多年的树脂基复合材料来说，这种短时间的抗菌效果就没有显著的临床影响。

在对牙科材料进行抗菌活性评估时应同时结合其他方面的生物相容性评价。因此，对牙科材料进行抗菌活性评估时均应同时按照 ISO 7405 和 ISO 10993-5 对该材料进行细胞毒性测试，并按照 ISO 10993-18 进行化学分析。

9. 最终检测报告

在检测结束时，应编制最终检测报告，体现本文中列出的检测方法。最终检测报告至少包括以下信息：

- a) 产品名称；
- b) 生产商名称；
- c) 生产地点（如适用）；
- d) 检测的批次号；
- e) 产品的使用期限（如适用）；
- f) ISO 标准及其发布日期（如 ISO 3990:2023）；
- g) 产品检测的机构名称和检测地点；
- h) 检测日期；
- i) 细菌菌株、选择的理由和来源；
- j) 使用的液体培养基的品牌和生产批次；
- k) 测定方法和原理；
- l) 洗脱循环步骤；
- m) 浸提步骤（如适用），以及可能的情况下，浸出物质的性质和浓度；
- n) 阴性、阳性和其他对照材料；
- o) 观察到（或未观察到）的抗菌活性和其他观察结果，包括统计学分析；
- p) 任何与结果评估相关的数据；
- q) 报告人的信息，包括签名和日期。

附录 A

(资料性)

细菌菌株及相应的液体培养基

A. 1 选择

细菌菌株的选择应基于这些微生物与相应材料应用领域的相关性。表 A.1 以几种菌为例，列举了这些菌种的模式株及参考标准株，以及相应推荐用于悬液试验及生物膜试验的液体培养基。同时也列举了推荐的固体培养基。

表 A.1 细菌菌株及相应的液体培养基

应用领域	细菌菌种	模式株/参考株	用于悬液试验的液体培养基	用于生物膜试验的液体培养基	固体培养基
牙科修复及正畸材料	变异链球菌	UA 159, ATCC 700610	脑心浸液	---脑心浸液 ^c ---全唾液培养基(CS) ^{ac}	---脑心浸液琼脂 ---Schaedler琼脂
	变异链球菌	ATCC 25175, DSM 20523, NCTC 10449			
	口腔链球菌	ATCC 35037, DSM 20627, NCTC 11427			
	内氏放线菌	ATCC 12104, DSM 43013, NCTC 10301	脑心浸液	---脑心浸液 ^c ---CS培养基 ^{ac}	---脑心浸液琼脂 ---Schaedler琼脂
	粪肠球菌	ATCC 29212, DSM 20482, NCTC 12967	脑心浸液	---脑心浸液 ^c ---CS培养基 ^{ac}	--脑心浸液琼脂
牙周病	具核梭杆菌多形亚种	ATCC 10953, DSM 20482, NCTC 10562	改良液体通用培养基 (mFUM) ^b	(mFUM) ^b	Schaedler琼脂
	中间普雷沃菌	ATCC 25611, DSM 20706, NCTC 13070	---Schaedler液体 ^d ---(mFUM) ^{bd}	--Schaedler液体 ^d ---(mFUM) ^{bd}	Schaedler琼脂
	牙龈卟啉单胞菌	ATCC 33277, DSM 20709, NCTC 11834	--Schaedler液体 ^d ---(mFUM) ^{bd}	--Schaedler液体 ^d ---(mFUM) ^{bd}	Schaedler琼脂
<p>a 见参考文献[18].</p> <p>b 见参考文献[19].</p> <p>c 培养基需添加 0.1%葡萄糖。</p> <p>d 培养基需添加 0.005 g/l 氯化血红素和 0.01 g/l 维生素 K1</p>					