



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.14—2017

化妆品微生物检验方法 第 14 部分：腐生葡萄球菌

Determination of microbiologies in cosmetics—
Part 14: *Staphylococcus saprophyticus*

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 2206《化妆品微生物检验方法》分为 14 个部分：

- 第 1 部分：沙门氏菌；
- 第 2 部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌；
- 第 3 部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第 4 部分：链球菌；
- 第 5 部分：肠球菌；
- 第 6 部分：破伤风梭菌；
- 第 7 部分：蛋白免疫印迹法检测疯牛病病原；
- 第 8 部分：白色念珠菌；
- 第 9 部分：胆汁酸耐受革兰氏阴性杆菌；
- 第 10 部分：金黄色葡萄球菌 PCR 法；
- 第 11 部分：金黄色葡萄球菌 多重实时荧光 PCR 法；
- 第 12 部分：绿脓杆菌 PCR 法；
- 第 13 部分：嗜麦芽窄食单胞菌；
- 第 14 部分：腐生葡萄球菌。

本部分为 SN/T 2206 的第 14 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：石建华、王毅谦、李晓虹、鞠慧萍、祝长青、邵景东、蒋原。

化妆品微生物检验方法

第 14 部分：腐生葡萄球菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中腐生葡萄球菌的定性检测方法。
本部分适用于化妆品中腐生葡萄球菌的定性检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

腐生葡萄球菌 *Staph.saprophytics*

葡萄球菌属的一种,革兰氏阳性,血琼脂上呈橙色或灰白色,无溶血,血浆凝固酶阴性,尿素酶阳性,发酵葡萄糖、麦芽糖、蕈糖、松二糖,不发酵乳糖和甘露糖。

4 试剂和材料

4.1 试剂

除另有规定的外,试剂为分析纯或生化试剂,水为灭菌双蒸水,符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.1.1 0.85%生理盐水。

4.1.2 SCDLP 液体培养基(见附录 A 的 A.1)。

4.1.3 血琼脂平板(见 A.2)。

4.1.4 腐生葡萄球菌定位显色培养基(见 A.3)

4.1.5 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)(见 A.4)。

4.1.6 生化反应试剂。

4.1.7 VITEK 全自动微生物鉴定系统 GP 测试卡。

注: VITEK、GP 测试卡是由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的唯一认可。如果其他等效产品具有相同的效果,也可使用等效产品。

4.1.8 Taq DNA 聚合酶。

4.1.9 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

4.1.10 DNA 提取试剂:称取 0.1 g chelex 100 粉末,加入 100 mL 灭菌蒸馏水中,摇匀即可。

4.1.11 10× PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),200 mmol/L 氯化钾(KCl),15 mmol/L 氯化镁(MgCl₂)。

4.1.12 引物和探针:

上游引物:5'-TGAAGCTGTTTTTGGTAGCGA-3'

下游引物:5'-AGTTCCTGGTTTAGCACCTTCA-3'

TaqMan 探针:5'-TCGCAAAGATGTTGCTTGTCACACA-3'

探针 5'端由 FAM 标记,3'端由 TAMRA 标记。

4.2 材料

4.2.1 刻度吸管:2.0 mL 和 10.0 mL,分刻度 0.1 mL。

4.2.2 三角瓶:150 mL,250 mL。

4.2.3 培养皿:90 mm。

4.2.4 普通光学显微镜(1 000 ×)及载玻片。

4.2.5 1.5 mL 离心管。

5 仪器和设备

5.1 天平:感量 0.1 g。

5.2 均质器:转速 1 000 r/min 以上。

5.3 恒温培养箱:36 °C±1 °C。

5.4 恒温水浴锅。

5.5 VITEK 全自动微生物鉴定系统或类似设备¹⁾。

5.6 实时荧光 PCR 仪。

5.7 离心机:最大转速 13 000 r/min 以上。

5.8 微量移液器:10 μL,100 μL,200 μL,1 000 μL。

5.9 低温冰箱:−20 °C~4 °C。

6 检验程序

化妆品中腐生葡萄球菌检验方法是通过增菌、分离纯化、生化鉴定或增菌后进行实时荧光 PCR 检测,对化妆品中可能存在的腐生葡萄球菌进行定性检验。

具体检验程序见图 1。

1) VITEK 是由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的唯一认可。如果其他等效产品具有相同的效果,也可使用等效产品。

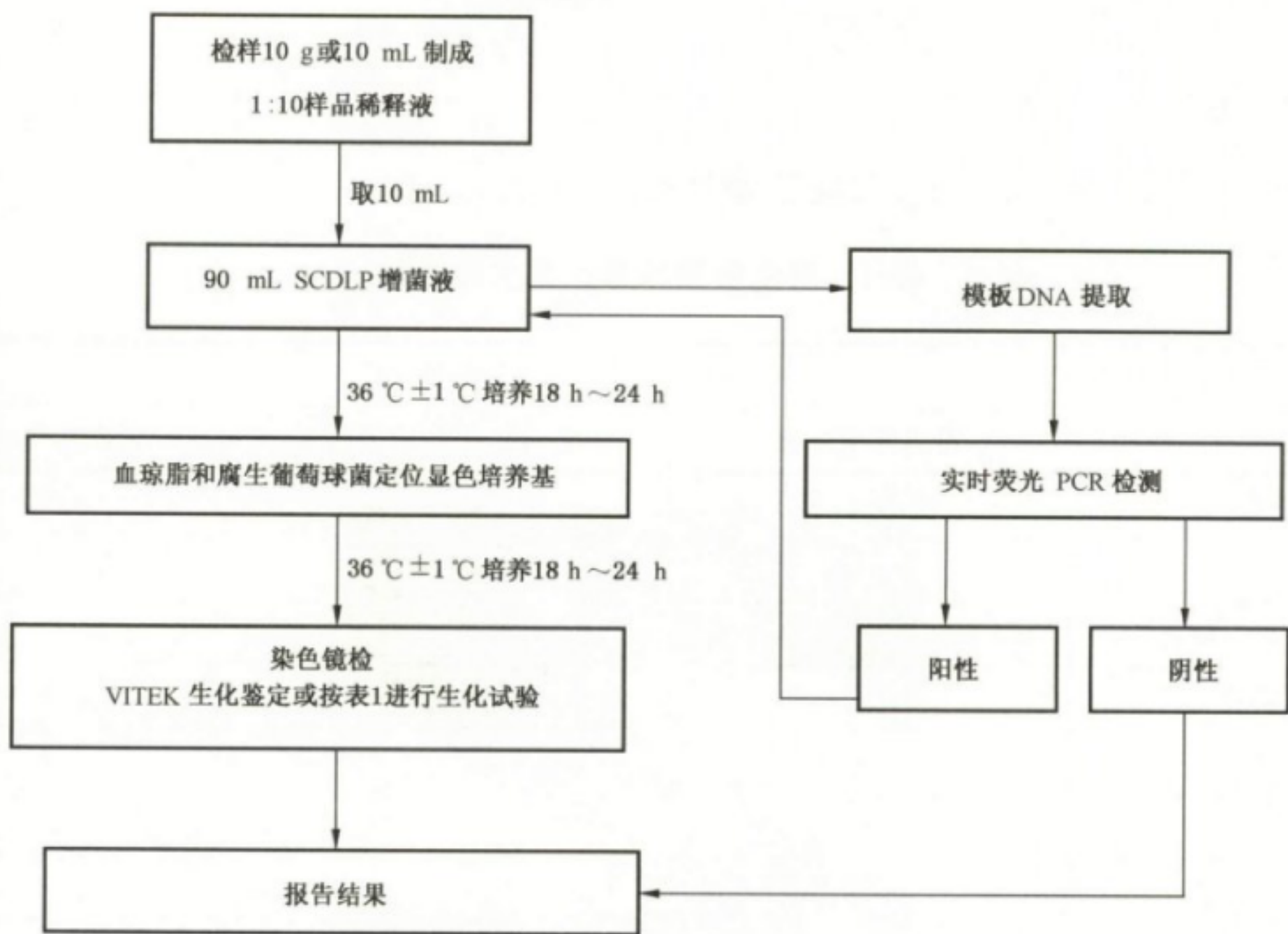


图 1 化妆品中腐生葡萄球菌检验程序

7 样品制备

化妆品中不同类型的检样制备,参照 GB/T 7918.1 进行制样。

8 操作步骤

8.1 平板培养法

8.1.1 增菌

取 1 : 10 样品稀释液 10 mL 接种到 90 mL SCDLP 液体培养基中,置 36℃±1℃ 培养 18 h~24 h。

8.1.2 分离培养

取上述培养液,划线接种于血琼脂平板和腐生葡萄球菌定位显色培养基上,置 36℃±1℃ 培养 18 h~24 h。在血琼脂平板上腐生葡萄球菌菌落大多呈橙色,少数白色,光滑湿润。在腐生葡萄球菌定位显色培养基上腐生葡萄球菌菌落特征按照显色培养基的说明书进行判定。

8.1.3 纯化

从血琼脂平板或腐生葡萄球菌定位显色培养基挑取至少 5 个或以上典型或可疑菌落,如果可疑菌落少于 5 个,则全部挑取,把挑取的可疑菌落纯化接种到胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基,36℃±1℃ 培养 18 h~24 h。

8.1.4 染色镜检

用 TSA 培养基上的纯培养物做革兰氏染色镜检。腐生葡萄球菌应为革兰氏染色阳性,葡萄样球

菌,无芽孢,无荚膜,直径大小约为 1.0 μm~1.5 μm。

8.1.5 生化鉴定

用 VITEK 生化鉴定系统进行生化鉴定,或按表 1 进行生化试验。

表 1 腐生葡萄球菌主要生化特性

项目	菌种		
	腐生葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌
色素	橙色/白色	金黄色	白色
溶血性	—	+	—
血浆凝固酶	—	+	—
甘露醇	(+)	+	—
乳糖	—	+	+
葡萄糖	+	+	+
麦芽糖	+	+	+
尿素酶	+	—	+
甘露糖	—	+	—
蕈糖	+	+	—
松二糖	+	—	+
注：“+”≥90%阳性，“—”≥90%阴性，“(+)”迟缓阳性。			

8.1.6 结果报告

综合平板菌落形态和生化鉴定结果,报告每 10 g 或 10 mL 样品中检出或未检出腐生葡萄球菌。

8.2 实时荧光 PCR 法

8.2.1 检样的增菌和分离

参照平板培养法进行。

8.2.2 模板 DNA 的制备

取 8.1.1 中培养的增菌液 1 mL,加到 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清;加入 50 μL DNA 提取液(使用前室温解冻并充分混匀,快速吸取),沸水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液以待检验(如不能及时检验,可将上清液于-20 ℃保存)。

8.2.3 实时荧光 PCR 检测

8.2.3.1 PCR 反应体系为 25 μL:10×PCR 缓冲液 2.5 μL、引物对(10 μmol/L)各 1 μL、探针(10 μmol/L) 0.5 μL、dNTP(10 μmol/L)1 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL、水 16.5 μL、模板 DNA 2 μL。

8.2.3.2 反应条件:37 ℃ 5 min,95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火及延伸 45 s,同时收集 FAM 荧光信号,共进行 40 个循环。

注:PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

8.2.3.3 检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为扩增片段的阳性克隆分子 DNA 或阳性菌株 DNA, 阴性对照为非阳性菌株 DNA, 空白对照为无菌水。

8.2.4 结果及判定

8.2.4.1 质控标准

- 空白对照: 无扩增曲线, $C_t \geq 40$;
- 阴性对照: 无扩增曲线, $C_t \geq 40$;
- 阳性对照: 出现典型的扩增曲线, $C_t \leq 30$, 否则, 试验视为无效。

8.2.4.2 结果判定和报告

- $C_t \geq 40$, 判定样品结果为阴性; 报告未检出腐生葡萄球菌;
- $C_t \leq 35.0$, 判定样品结果为阳性可疑结果;
- $35.0 < C_t \text{ 值} < 40$, 试验样本重做。重做结果 $C_t \geq 40$ 判定为阴性, 否则判定为阳性可疑结果。
对于阳性或阳性可疑结果, 应采用第一法做进一步的分离鉴定和报告。

8.3 防止污染和废弃物处理的措施

检验过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 SCDLP 液体培养基

A.1.1 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.1.2 制法

将卵磷脂在 400 mL 蒸馏水中加热至完全溶解,再将其他成分混合加入 600 mL 蒸馏水中,加热完全溶解。将上述两种溶液混合后,充分搅拌均匀。调 pH 为 7.2~7.3 分装,121 ℃ 20 min 高压灭菌。注意振荡,使沉淀于底层的吐温—80 充分混合,待冷却至室温使用。

A.2 血琼脂培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
脱纤维羊血	5 mL~10 mL

A.2.2 制法

将各成分(琼脂和羊血除外)溶解于蒸馏水内,用氢氧化钠调节 pH 为 7.2~7.4,加入琼脂,加热溶解,121 ℃ 20 min 高压灭菌后,冷却备用。临用前加热熔化琼脂,冷却至 50 ℃,以无菌操作加入脱纤维羊血,充分摇匀,倾注平板。

A.3 腐生葡萄球菌定位显色培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

牛肉膏	3.0 g
酵母膏	4.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
色素(特异成分)	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

按使用说明书水化及稀释,加热至 100 ℃并搅拌至琼脂充分溶解,pH 为 6.8~7.2,冷却至 45 ℃~50 ℃,倾注 90 mm 无菌培养皿,室温保存 1 d 或 2 ℃~8 ℃冰箱避光储存不超过 4 d。

A.4 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)

A.4.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

制法:除琼脂外,将其余成分溶解于蒸馏水中,pH 为 7.2~7.4,加入琼脂,加热溶解,分装试管,121 ℃ 20 min 高压灭菌后,冷却至 45 ℃~50 ℃,以无菌操作倾注平板备用。
