

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.8—2013

化妆品微生物检验方法 第 8 部分：白色念珠菌

Determination of microbiological in cosmetics—
Part 8: *Candida albicans*

2013-11-06 发布

2014-06-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

SN/T 2206《化妆品微生物检验方法》共分为 13 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。

本部分为 SN/T 2206 的第 8 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院。

本部分主要起草人：吕敬章、万志刚、张恒、汤慕瑾、黄李华、刘慧玲、赵芳、洪小柳、范放、丁晶。

化妆品微生物检验方法

第 8 部分:白色念珠菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中白色念珠菌的检测方法。

本部分适用于化妆品中白色念珠菌的检测。

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 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第 1 部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第 2 部分:培养基性能测试实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

白色念珠菌 *Candida albicans*

又称白假丝酵母菌,广泛存在于自然界的一种条件致病性真菌,也可存在于正常人口腔、上呼吸道、肠道及阴道,一般在正常机体中数量少,不引起疾病,当机体正常菌群失调或抵抗力降低时可致念珠菌病。按照本标准规定的方法进行检测时,白色念珠菌在选择培养基沙氏葡萄糖琼脂表面形成白色至浅褐色、光滑、凸起菌落;白色念珠菌的主要特征表现为可形成芽管、能产生假菌丝和厚膜孢子。

3.2

厚膜孢子 *clamydospore*

孢子在不良环境条件下进入休眠期,菌丝内胞浆浓缩、胞壁增厚而形成的一种特殊结构,显微镜下表现为菌丝的顶端或短侧枝上孢壁厚、折光性强的大型球形孢子。厚膜孢子仍具有繁殖能力。

3.3

芽管 *Germ tube*

白色念珠菌从酵母相向菌丝相转换中的假菌丝体的早期形态,是白色念珠菌的鉴定依据之一。芽管的形成与白色念珠菌毒力的增强密切相关。

4 仪器、器具及标准菌株

4.1 水浴箱:45℃±1℃。

4.2 温度计:1℃~55℃,分刻度 0.1℃。

4.3 培养箱:36℃±1℃、30℃±1℃。

4.4 接种环:直径 3 mm。

- 4.5 天平:感量 0.1 g。
- 4.6 锥形瓶:100 mL、250 mL、500 mL。
- 4.7 试管。
- 4.8 培养皿:直径 60 mm、90 mm。
- 4.9 过滤器:配 0.45 μm 的滤膜。
- 4.10 显微镜。
- 4.11 高压灭菌器。
- 4.12 标准菌株:白色念珠菌(ATCC 10231)、热带念珠菌(ATCC 750)或等效菌株。

5 培养基和试剂

5.1 一般要求

培养基的质量控制应符合 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 的要求,也可使用符合 SN/T 1538 要求的商品化培养基。如果待测样品有抗菌特性,增菌肉汤中应含有中和剂,还应对其中和作用进行验证。

5.2 主要培养基和试剂

- 5.2.1 大豆酪蛋白卵磷脂吐温 80 液体培养基,也称 SCDLP 液体培养基(SCDLP):见 A.1.1。
- 5.2.2 沙氏葡萄糖氯霉素琼脂:见 A.1.2。
- 5.2.3 念珠菌显色培养基:见 A.1.3。
- 5.2.4 1%吐温 80 的玉米粉琼脂培养基:见 A.1.4。
- 5.2.5 胎牛血清或者马血清。
- 5.2.6 革兰氏染液。

5.3 其他培养基

见 A.2。

6 样品处理

待测的样品应在室温下保存,在检测之前和检测完成以后,不要温育、冷藏和冷冻样品。水溶性样品可直接加入增菌液中,非水溶性样品先加入装有一定量助溶剂(如吐温 80)的适当容器中,乳化分散样品后,再加入适当体积的增菌液。对可过滤的样品,应使用孔径不大于 0.45 μm 的滤膜,将已准确称量的样品置于带滤膜的过滤器里,过滤后用一定体积的水或稀释液冲洗滤膜,将滤膜浸入盛有适当体积的增菌液、大小适当的锥形瓶中。样品处理过程详见 GB/T 7918.1。

7 检测步骤

7.1 概述

应使用无菌器具、设备并采用无菌操作。除有特别说明外,从样品制备到接种于增菌肉汤中的相隔时间不应超过 45 min。检测流程图见图 1。

7.2 增菌

准确取 10 g 或 10 mL(不应少于 1 g 或 1 mL)充分混匀的待测样品,按 1:9 的比例加入 90 mL 增

菌肉汤 SCDLP 液体培养基。置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,时间不少于 20 h,但不超过 72 h。

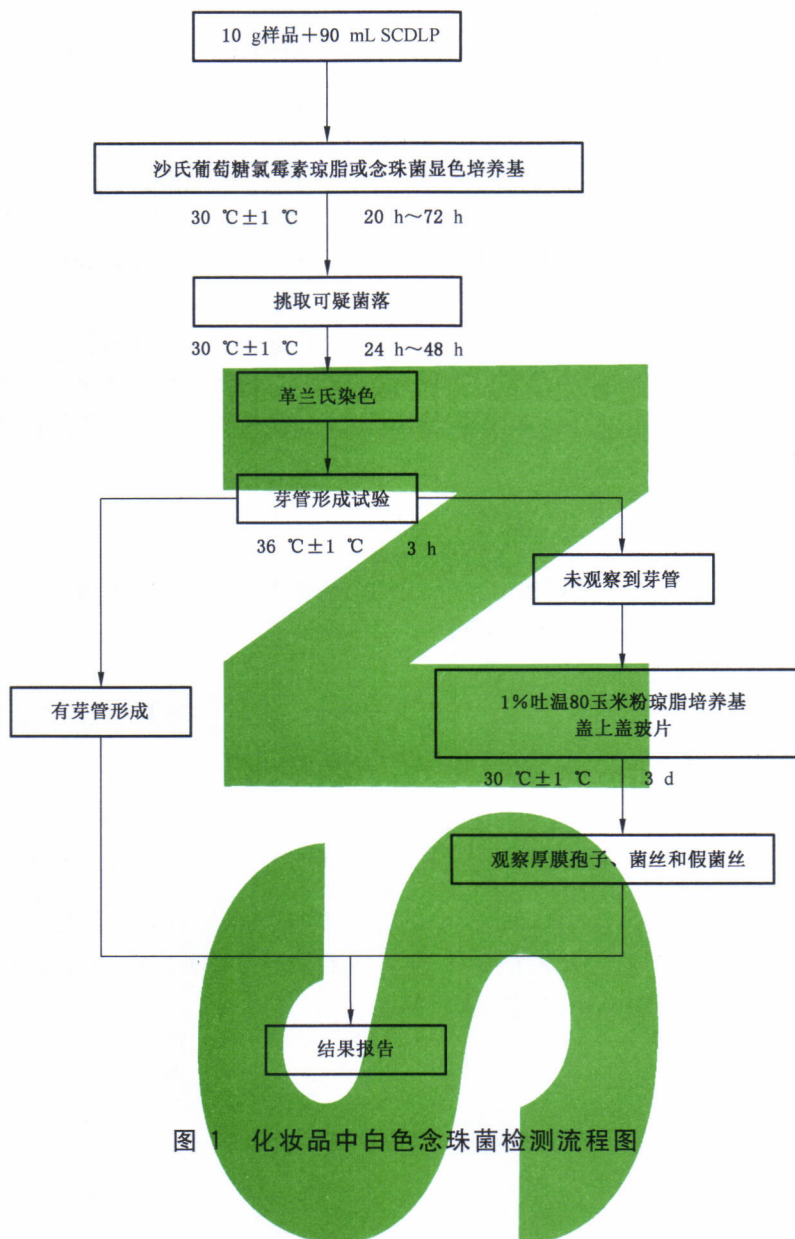


图 1 化妆品中白色念珠菌检测流程图

7.3 分离

用无菌接种环挑一环已增菌的肉汤,划线接种到沙氏葡萄糖氯霉素琼脂或念珠菌显色培养基表面,翻转平皿,置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h。白色念珠菌在沙氏葡萄糖氯霉素琼脂上呈现白色到浅褐色、光滑、凸起的菌落。白色念珠菌在念珠菌显色培养基上的菌落形态判断见念珠菌显色培养基的说明书。

7.4 鉴定

7.4.1 概述

白色念珠菌呈现双相型,它可产生假菌丝、一些菌丝和圆形芽生孢子簇以及大型厚膜孢子。低温情况下,可呈现假菌丝体(菌丝相);然而在较高温度下,它又可转变为单细胞体(酵母相)。据此可对分离琼脂上的可疑菌落进行鉴定。

7.4.2 革兰氏染色

进行革兰氏染色后,白色念珠菌在显微镜下呈紫色、短椭圆形或细长菌体,有时可见芽生孢子。

7.4.3 芽管形成试验

7.4.3.1 取 0.5 mL~1 mL 的血清(胎牛血清或者马血清)加入小试管内。

7.4.3.2 从一个待测菌菌落上挑取少许菌苔,在血清中研成乳状液。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中培养 1.5 h~2 h,或在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 3 h。应使用白色念珠菌和热带念珠菌标准菌株分别作为阳性和阴性对照。

7.4.3.3 滴一滴培养后的血清于载玻片上,盖上盖玻片,在显微镜下观察芽管的产生。芽管在显微镜下呈现为源自芽生孢子的圆柱形细丝,在起源点无任何缢缩,沿着细丝的长度方向也没有明显的膨胀。芽管宽为芽生孢子的一半,长约为芽生孢子的 3~4 倍。如果未见芽管形成,待测菌落还需进行厚膜孢子试验,并观察菌丝和假菌丝。

7.4.4 厚膜孢子试验

7.4.4.1 在一个待测菌菌落上用接种针挑取少许,在 1%吐温 80 的玉米粉琼脂培养基表面穿过平板中心划线接种,在划线接种的位置盖上无菌的盖玻片。

7.4.4.2 置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d。

7.4.4.3 培养 24 h 后,揭开培养皿,在 $100\times\sim 400\times$ 显微镜下透过盖玻片观察生长情况。在白色念珠菌菌丝的顶端或短侧枝上可见巨大、高折光性的厚膜孢子。

8 结果报告

8.1 如果菌落鉴定为白色念珠菌,则结果报告为 10 g 或 10 mL 样品中检出白色念珠菌。

8.2 如果增菌以后分离琼脂上未见菌落生长,或有菌落生长但经过鉴定不是白色念珠菌,则结果报告为 10 g 或 10 mL 样品中未检出白色念珠菌。

附 录 A
(规范性附录)
培 养 基

A.1 主要培养基**A.1.1 SCDLP 液体培养基(SCDLP broth)****A.1.1.1 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
水	1 000 mL

A.1.1.2 制法

将各成分或脱水培养基加于水中,加热搅拌使其溶解。分装到适合的容器中后,于 121 °C 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.2 ± 0.2 。

A.1.2 沙氏葡萄糖氯霉素琼脂**A.1.2.1 成分**

葡萄糖	40.0 g
动物组织胃酶消化物	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
氯霉素	0.050 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.1.2.2 制法

将各成分(包括氯霉素)或脱水培养基加于水中,加热搅拌使其溶解。分装到适合的容器中后,于 121 °C 高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基室温下的 pH 值为 5.6 ± 0.2 。

A.1.3 念珠菌显色培养基**A.1.3.1 成分**

显色蛋白胨	10.2 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	15.0 g

氯霉素	0.5 g
显色原混合物	2.0 g
水	1 000 mL

A.1.3.2 制法

在适合的容器中将培养基所有的成分混合,煮沸 1 min。冷却培养基,在室温下其 pH 值为 5.9 ± 0.2 。

A.1.4 1%吐温 80 的玉米粉琼脂培养基

A.1.4.1 成分

玉米粉浸膏	50.0 g
琼脂	15.0 g
吐温 80	10.0 g
水	1 000 mL

A.1.4.2 制法

将各成分或脱水培养基加于水中,加热搅拌使其溶解。分装到适合的容器中后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基室温下的 pH 值为 6.0 ± 0.2 。

A.1.5 沙氏葡萄糖氯霉素琼脂

A.1.5.1 成分

葡萄糖	40.0 g
动物组织胃酶消化物	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
氯霉素	0.050 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.1.5.2 制法

将各成分(包括氯霉素)或脱水培养基加于水中,加热搅拌使其溶解。分装到适合的容器中后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基室温下的 pH 值为 5.6 ± 0.2 。

A.2 其他培养基

A.2.1 氯化钠胰蛋白胨肉汤

A.2.1.1 成分

蛋白胨,酪蛋白胰酶消化物	1.0 g
氯化钠	8.5 g
水	1 000 mL

A.2.1.2 制法

将各成分加于水中,加热搅拌使其溶解。分装到适合的容器中后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。灭

菌后冷却培养基,室温下其 pH 值应为 7.0 ± 0.2 。

该培养基可作为白色念珠菌悬液的稀释剂。

A.2.2 Eugon LT 100 肉汤

A.2.2.1 成分

酪蛋白胰酶消化物	15.0 g
大豆粉木瓜酶消化物	5.0 g
L-胱氨酸	0.7 g
氯化钠	4.0 g
亚硫酸钠	0.2 g
葡萄糖	5.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	5.0 g
辛苯聚醇 9	1.0 g
水	1 000 mL

A.2.2.2 制法

将吐温 80、辛苯聚醇 9 和卵磷脂依次加入沸水中至完全溶解后,加入其他成分加热混匀。分装到适合的容器中后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.0 ± 0.2 。

该培养基可用于白色念珠菌的增菌。

A.2.3 液体大豆酪蛋白消化物培养基

A.2.3.1 成分

酪蛋白胰酶消化物	17.0 g
大豆粉木瓜酶消化物	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
水	1 000 mL

A.2.3.2 制法

将各成分或脱水培养基加入水中溶解,必要时可加热。分装到适合的容器中后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.3 ± 0.2 。

该培养基可用于白色念珠菌的增菌。

A.2.4 改良 Iethen 肉汤

A.2.4.1 成分

肉类胃酶消化物	20.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
酵母浸膏	2.0 g

卵磷脂	0.7 g
吐温 80	5.0 g
氯化钠	5.0 g
亚硫酸氢钠	0.1 g
水	1 000 mL

A.2.4.2 制法

将吐温 80 和卵磷脂依次加入沸水中使其完全溶解,再加入其他成分加热混匀,轻柔搅拌避免产生泡沫,将培养基分装到适合的容器中后,于 121 °C 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.2±0.2。

该培养基可用于白色念珠菌的增菌。

A.2.5 添加卵磷脂-吐温 80 的葡萄糖和蛋白胨培养基(GPLP 80 broth)

A.2.5.1 成分

葡萄糖	20.0 g
酵母浸膏	2.0 g
硫酸镁	0.5 g
蛋白胨	5.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	7.0 g
水	1 000 mL

A.2.5.2 制法

将各成分或脱水培养基依次加入到沸水中使其完全溶解,将培养基分装到适合的容器后,于 121 °C 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 5.7±0.2。

该培养基可用于白色念珠菌的增菌。

A.2.6 D/E 中和肉汤

A.2.6.1 成分

葡萄糖	10.0 g
大豆卵磷脂	7.0 g
五水硫代硫酸钠	6.0 g
吐温 80	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
亚硫酸氢钠	2.5 g
酵母提取物	2.5 g
巯基乙醇酸钠	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
水	1 000 mL

A.2.6.2 制法

将各成分或脱水培养基依次加入到沸水中使其完全溶解,将培养基分装到适合的容器后,于 121 ℃ 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.6 ± 0.2 。

该培养基可用于白色念珠菌的增菌。

A.2.7 含抗生素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基**A.2.7.1 成分**

马铃薯浸膏	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	15.0 g
氯霉素	0.05 g
水	1 000 mL

A.2.7.2 制法

在适合的容器中将培养基所有的成分混合,于 121 ℃ 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.3 ± 0.2 。可以用 0.10 g 的青霉素钾或 0.10 g 四环素以替换每升培养基中的氯霉素,但需溶解在无菌溶液中,临用时才加进去。

该培养基可用于白色念珠菌的分离。

A.2.8 沙氏葡萄糖琼脂(SDA)**A.2.8.1 成分**

葡萄糖	40.0 g
动物组织胃酶消化物	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.2.8.2 制法

将各成分或脱水培养基加于水中,加热搅拌使其溶解。分装到适合的容器中后,于 121 ℃ 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 5.6 ± 0.2 。

该琼脂为非选择性培养基。

A.2.9 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)**A.2.9.1 成分**

马铃薯浸膏	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.2.9.2 制法

将各成分或脱水培养基加入水中溶解,加热混匀,将培养基分装到适合的容器中后,于 121 ℃ 高压

灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 5.6 ± 0.2 。

该琼脂为非选择性培养基。

A.2.10 大豆消化酪素琼脂培养基(SCDA)或胰酶蛋白大豆琼脂(TSA)

A.2.10.1 成分

酪蛋白胰酶消化物	15.0 g
大豆粉木瓜酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.2.10.2 制法

将各成分或脱水培养基加入水中溶解,加热混匀,将培养基分装到适合的容器中后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却培养基,室温下其 pH 值为 7.3 ± 0.2 。

该琼脂为非选择性培养基。