

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.6—2010

化妆品微生物检验方法 第6部分：破伤风梭菌

Determination of microbiological in cosmetics—
Part 6: Clostridium tetani

2010-01-10 发布

2010-07-16 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》分为以下部分：

- 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。

本部分为 SN/T 2206 的第 6 部分。

本部分的附录 A 为规范性附录。

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。

本部分主要起草人：范放、朱海、唐少冰、赵芳、匡燕云。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

化妆品微生物检验方法

第6部分:破伤风梭菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中破伤风梭菌的检测方法。
本部分适用于各类化妆品中破伤风梭菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 2206 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 19489 实验室 生物安全通用要求
化妆品卫生规范(卫生部,2007)

3 方法提要

根据破伤风梭菌特有的形态、生物学特征及培养特性,采用厌氧培养法,应用血琼脂平板进行分离,并根据该菌在血平板上菌落周围产生 β 型溶血环,呈迁徙性生长,革兰阳性梭菌,过氧化氢酶阴性等特征以兹鉴别,以小白鼠毒力试验为最终结果判定,对化妆品中可能存在的破伤风梭菌进行定性检验。

4 设备和材料

- 4.1 培养箱:36℃ \pm 1℃。
- 4.2 显微镜。
- 4.3 厌氧培养装置。
- 4.4 天平:量程1kg,感量0.1g。
- 4.5 灭菌样品处理器具:取样勺、剪刀等。
- 4.6 样品稀释瓶、试管、吸管、平皿、接种环、载玻片等。
- 4.7 注射器:1mL。
- 4.8 小白鼠。

5 培养基和试剂

- 5.1 生理盐水(见附录A第A.1章)。
- 5.2 庖肉培养基(见附录A第A.2章)。
- 5.3 血琼脂平板(见附录A第A.3章)。
- 5.4 革兰氏染色液。
- 5.5 过氧化氢酶试验试剂。
- 5.6 破伤风抗毒素。

6 破伤风梭菌检测方法

6.1 检测程序

破伤风梭菌的检测程序见图1。

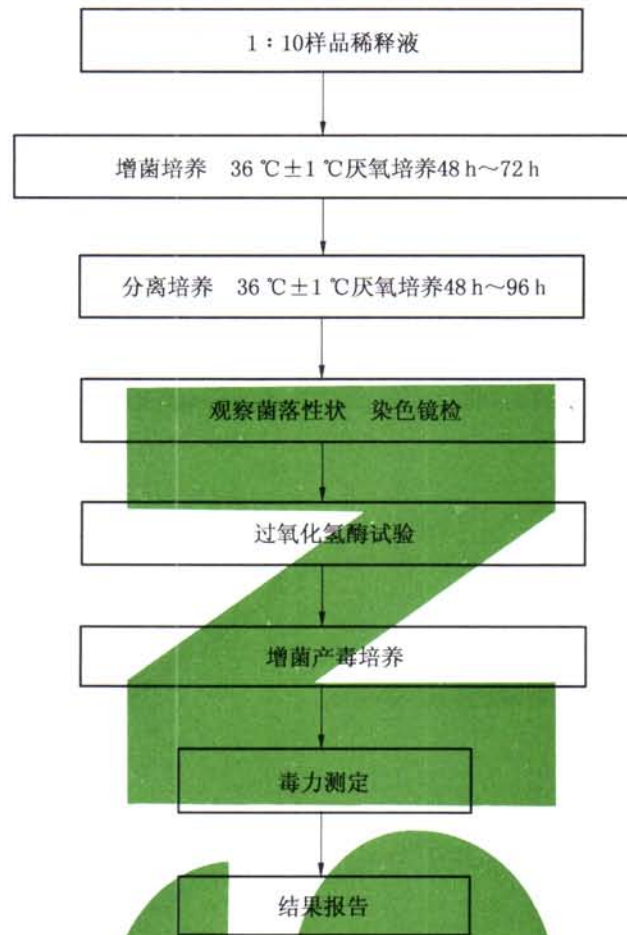


图 1 破伤风梭菌检测程序示意图

6.2 操作步骤

6.2.1 取样

不同类型化妆品的检样制备参照《化妆品卫生规范》。

6.2.2 增菌培养

取 1:10 样品稀释液 1 mL, 共 3 份, 分别加至 3 管庖肉培养基中, 其中一管加入新鲜培养的破伤风梭菌对照菌液 0.05 mL, 为阳性对照。另取一管为阴性对照。将以上各管移入厌氧装置或厌氧培养箱 36 °C ± 1 °C 培养 48 h ~ 72 h。阳性菌使肉汤混浊, 肉渣部分被消化, 微变黑, 有腐败臭味。

注: 如实验室具备厌氧工作站等较好的厌氧培养条件, 增菌培养基表层可不加液体石蜡。

6.2.3 分离培养

取增菌培养液划线接种血琼脂平板, 36 °C ± 1 °C 厌氧培养 48 h。在此平板上破伤风梭菌呈白色或乳白色, 中心紧密、周边疏松, 直径 1 mm 以上, 菌落周围产生透明 β 型溶血环, 呈迁徙性生长的特征菌落。

6.2.4 革兰氏染色镜检

取可疑菌落涂片、染色、镜检。破伤风梭菌为革兰氏阳性, 营养期细菌呈细丝状, 芽孢期细菌产生的芽孢圆形, 位于菌体末端, 直径比菌体宽大, 似鼓槌状, 其繁殖体为革兰氏阳性, 带上芽孢的菌体有时转为革兰氏阴性。观察芽孢 37 °C 培养 96 h 比较适宜, 时间过短芽孢太小或是还没有完全形成, 时间过长芽孢大部分会脱落。

6.2.5 过氧化氢酶试验

挑取固体培养基上可疑菌落于洁净载玻片上, 滴加一滴 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 溶液, 于 30 s 内产生

气泡者为阳性,不产生气泡者为阴性。破伤风梭菌呈阴性反应。

6.2.6 增菌产毒培养

根据菌落形态、染色镜检和生化特征挑取可疑菌落,接种庖肉培养基做增菌产毒培养,36℃±1℃厌氧培养48h后进行毒力测定。

6.2.7 毒力测定

取上述增菌产毒培养液做毒力测定。

6.2.7.1 实验动物选用昆明品系封闭群的清洁级(CL)或无特定病原菌级(SPF)小白鼠(或其他品系的CL、SPF级小白鼠),小白鼠饲养在通风、透光、清洁的室内环境,实验期间正常供给标准啮齿动物食物和饮水。

6.2.7.2 选健康小白鼠12只(体重19g~21g、雌雄各半),随机分成2群,1群注射供试品,一群为阳性对照。每群分为两组,分别做毒力试验(试验组)和破伤风抗毒素保护试验(保护组)。

6.2.7.3 试验组中,小白鼠肌肉或皮下注射增菌培养液0.3mL~0.5mL,4h后观察小鼠症状。破伤风外毒素引起的中毒症状为强直性痉挛,抽搐,呈现角弓反张,最后死亡。

6.2.7.4 保护组中,为判断前述症状是否为破伤风外毒素所致,要进行破伤风抗毒素保护实验。在注射增菌培养液前先注射120U/mL破伤风抗毒素0.3mL~0.5mL,0.5h后注射增菌培养液0.3mL~0.5mL,4h后观察小鼠症状。

6.2.8 结果判断

6.2.8.1 阳性结果判断:如试验组小白鼠全部或部分出现破伤风外毒素引起的中毒症状而保护组小白鼠无上述症状时,毒力试验为阳性,可判定有破伤风梭菌存在。

6.2.8.2 阴性结果判断:试验组小白鼠在注射120h后全部没有出现破伤风外毒素引起的中毒症状,毒力试验为阴性,可判定没有破伤风梭菌存在。

7 结果报告

结果判定以小白鼠毒力实验为准,毒力试验阳性者,不论镜检是否检测到破伤风梭菌,均按检出破伤风梭菌报告;若毒力试验阴性,则报告未检出。

8 生物安全措施

为保护实验室人员安全,所有培养物和废弃物应小心处置,按照GB 19489要求执行。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 生理盐水**A.1.1 成分**

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

溶解后分装到锥形瓶中,每瓶 90 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 庖肉培养基**A.2.1 成分**

牛肉浸液	1 000 mL
蛋白胨	30.0 g
酵母膏	5.0 g
磷酸二氢钠	5.0 g
葡萄糖	3.0 g
可溶性淀粉	2.0 g
碎肉渣	适量
	pH 7.8

A.2.2 制法

称取新鲜除脂肪和筋膜的碎牛肉 500 g,加蒸馏水 1 000 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠溶液 25 mL,搅拌煮沸 15 min,充分冷却,除去表层脂肪,澄清,过滤,加水补足至 1 000 mL。加入除碎肉渣外的各种成分,校正 pH。碎肉渣经水洗后晾至半干分装 150 mm×150 mm 试管约 2 cm~3 cm 高,每管加入还原铁粉 0.1 g~0.2 g 或铁屑少许。将上述液体培养基分装至每管内超过肉渣表面约 1 cm,上面覆盖融化的凡士林或液体石蜡 0.3 cm~0.4 cm。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 血琼脂**A.3.1 成分**

pH 7.4~7.6 豆粉琼脂	100 mL
脱纤维羊血(或兔血)	5 mL~10 mL

A.3.2 制法

加热溶化琼脂,冷至 50 °C,以灭菌手续加入脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。亦可用其他营养丰富的基础培养基配制血琼脂。