

化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力验证分析

李婷婷*, 俞晓凌, 黄奕文

(上海市崇明区疾病预防控制中心, 上海 202150)

摘要: 目的 参加中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力验证, 优化本实验室对金黄色葡萄球菌的检验检测能力。**方法** 根据 ACAS-PT1637 (2023)化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力验证参试指导书和《化妆品安全技术规范》(2015年版)对样品进行检测。同时使用常规的生化检测方法、ATB 细菌鉴定和荧光定量 PCR 扩增进行检验。**结果** 样品 23-Q777 未检出金黄色葡萄球菌, 样品 23-A973 检出金黄色葡萄球菌。本次能力验证结果为满意。**结论** 通过参加此次能力验证, 不仅提升了实验室对该菌的检测能力, 且有效表明了本实验室具有运用多种方法检测化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 检测能力; 实验室

Verification analysis of detection ability of *Staphylococcus aureus* in cosmetics

LI Ping-Ting*, YU Xiao-Ling, HUANG Yi-Wen

(Chongming District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 202150, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the detection ability of *Staphylococcus aureus* in our laboratory by participating in the verification of the detection ability of *Staphylococcus aureus* in cosmetics organized by the Test and Evaluation Center of Chinese Academy of Inspection and Quarantine. **Methods** The samples were tested according to the test instructions of ACAS-PT1637 (2023) for the detection ability of *Staphylococcus aureus* in cosmetics and the Technical Specification for Cosmetic Safety (2015 edition). At the same time, the conventional biochemical detection methods, ATB bacteria identification and fluorescence quantitative PCR amplification were used to detect. **Results** *Staphylococcus aureus* was not detected in sample 23-Q777 and *Staphylococcus aureus* was detected in sample 23-A973. The result of this ability verification is satisfactory. **Conclusion** By participating in this capability verification, the laboratory not only improved the detection ability of the bacteria, but also effectively demonstrated that the laboratory has the ability to detect *Staphylococcus aureus* in cosmetics by using a variety of methods.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; detection capability; laboratory

0 引言

随着时代的进步, 经济的发展, 人们生活水平的提高, 对美的追求也越来越强烈。化妆品在人们日常生活中扮演着越来越重要的角色。由于常与皮肤紧密接触^[1], 因此化妆品的安全性备受关注, 人们对化妆品质量的要求也在不断提升。金黄色葡萄球菌是常见的细菌之一, 广泛分布于自然界, 如水、物品表面甚至与人和动物的皮肤和粘膜上, 而且在适

宜的温度和湿度下会迅速繁殖, 有较强的抵抗力。金黄色葡萄球菌可引起多种疾病, 致病力强, 它是造成人体化脓感染的常见致病菌, 情况严重时, 甚至还会进入血液, 进而造成肺炎、败血症等全身感染^[2-3]。在《化妆品安全技术规范》(2015年版)^[4]中规定不得检出金黄色葡萄球菌^[5-10], 并将其列为常规致病菌检测项目之一。所以为了保证化妆品的安全性, 必须保证化妆品中的金黄色葡萄球菌检测的正确性。

*通信作者: 李婷婷, 检验师, 主要从事微生物检验。E-mail: 332800957@qq.com

*Corresponding author: LI Ping-Ting, Docimaster, Chongming District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 202150, China. E-mail: 332800957@qq.com

纵观国内外, 现有对化妆品中微生物的研究情况如下:

1. 国内研究现状: 我国对化妆品中微生物的检测主要依据《化妆品卫生规范》(2007年版)和《化妆品安全技术规范》(2015年版)中的规定进行。其中,《化妆品卫生规范》(2007年版)规定了化妆品中常见的微生物指标和检测方法,包括菌落总数、霉菌和酵母菌数、金黄色葡萄球菌等。而《化妆品安全技术规范》(2015年版)则更加详细地规定了化妆品中微生物的限量要求和检测方法,对化妆品中微生物的检测能力提出了更高的要求。

2. 国外研究现状: 美国、欧盟等国家和地区也制定了相应的法规和标准,对化妆品中微生物的限量要求和检测方法进行了规定。其中,美国食品药品监督管理局(FDA)和欧盟化妆品指令(EC/1223/2009)对化妆品中微生物的检测要求非常严格,需要采用国际公认的检测方法和标准进行检测,以保证检测结果的准确性和可靠性。

综上,国内外对于化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力的研究已经取得了一定的进展,但仍然需要不断加强和完善,以提高检测的准确性和可靠性,保障消费者的健康安全。

对于实验室而言,能力验证是质量保证的基石。其有助于实验室评价和证明其检测数据可靠性^[1]。能力验证的重要性在于它为实验室提供了一个发现潜在问题的机会。无论是设备、方法还是人员的问题,都可以通过能力验证及时发现并得到纠正,持续改进实验室管理体制,进而达到保持并提高整个实验室的内部管理水平^[2]。在本次的能力验证中,为确保实验室技术能力持续满足要求,提高检测准确性和可靠性,本实验室参加了由中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力验证,检测的依据为《化妆品安全技术规范》(2015年版)。

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂

青岛高科技工业园海博生物技术有限公司: SCDLP 液体培养基、金黄色葡萄球菌显色平板、冻干兔血浆; 上海科玛嘉微生物技术有限公司: 哥伦比亚血琼脂培养基、Baird Parker 平板; 北京卓诚惠生生物科技股份有限公司: 细菌 DNA 提取试剂盒、金黄色葡萄球菌核酸实时荧光 PCR 检测试剂盒; 杭州天和微生物试剂有限公司: 革兰氏染色液、甘露醇发酵培养基; 生物梅里埃法国股份有限公司: 2 mL API 0.85%NaCl 安瓿、葡萄球菌鉴定试剂盒(比色法)(ID32 STAPH)。以上试剂均在有效期内使用。

1.2 仪器

电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司)、显微镜(奥林帕斯)、电子天平(上海精密科学仪器有限公司)、超纯水仪(德国默克密理博公司)、可调移液器(芬兰百得/百得实验室仪器(苏州)有限公司)、ATB 细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)、生物安全柜(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司)、高速冷冻离心机(德国 hettich 公司)、荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗科技有限公司)。

1.3 样品和标准菌株

本次实验中的 2 份能力验证样品分别为 23-Q777 和 23-A973, 样品为白色冻干块状, 包装于真空西林瓶内, 提供方为中国检验检疫科学研究院测试评价中心。阳性对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 阴性对照菌株为表皮葡萄球菌 CICC10294。

1.4 检测方法

1.4.1 样品前处理

根据“ACAS-PT1637(2023)化妆品中金黄色葡萄球菌的检测能力验证参试指导书”进行样品前处理。

样品 23-Q777、23-A973 均按照无菌操作打开西林瓶后, 立即加入 21 mL 灭菌生理盐水, 充分溶解混匀, 此溶液即为待测样品原液, 等同于 21 mL 的化妆水样品。同时用阳性菌株、阴性菌株作对照。

1.4.2 增菌

23-Q777、23-A973 分别吸取 1:10 待测样稀释液 10 mL, 各接种到 90 mL 的 SCDLP 液体培养基中充分混匀后放置培养箱 36°C 培养 24 h。

1.4.3 分离

将增菌后的培养物, 分别用接种环沾取 1 环增菌液转种于血琼脂平板、金黄色葡萄球菌显色平板和 Baird Parker 平板上, 均 36°C 培养 48 h。

1.4.4 纯培养

在血琼脂平板、金黄色葡萄球菌显色平板和 Baird Parker 平板上分别挑取单个可疑菌落, 均划线接种于血琼脂平板上, 36°C 培养 24 h。

1.4.5 生化鉴定

染色镜检: 挑取分纯菌落, 涂片, 进行革兰氏染色, 镜检。

甘露醇发酵试验: 挑取分纯菌落接种到甘露醇发酵培养基中, 并在其表面加入灭菌液体石蜡, 36°C 培养 24 h。

血浆凝固酶试验: 在每支冻干兔血浆西林瓶中加入 0.8

mL 分纯菌落肉汤培养物,充分混匀后,置 36°C 培养。每 0.5 h 观察一次,观察 6 h,如呈现凝固(即倾斜或倒置时,呈现凝块),或凝固体积大于原体积的一半,可判定为阳性结果。同时使用金黄色葡萄球菌阳性对照菌株和表皮葡萄球菌阴性对照菌株肉汤培养物作为对照。

1.4.6 ATB 细菌鉴定检测

从分纯平板上挑取新鲜的菌落至 2 mL API 0.85% NaCl 安瓿,研磨后,制备浊度相当于 0.5 个麦氏单位的菌悬液。混匀已接种的 API 0.85% NaCl 菌悬液,用加样枪在鉴定试条上的每个试验杯中定量加入 55 μ L 菌悬液,并在脲酶(URE)、精氨酸双水解酶(ADH)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)试验杯中各滴 2 滴矿物油覆盖住,盖上试条的盖子,36°C 培养 24 h 后,在 NIT 试验杯中分别加入一滴 NIT1 试剂和 NIT2 试剂;VP 试验杯中分别加入一滴 VPA 试剂和 VPB 试剂; β GAL、ArgA、PAL 和 PyrA 试验杯中各加入一滴 FB 试剂。5 分钟后观察结果(不要超过 10 分钟)。并使用 ATB 细菌鉴定仪进行自动判读。

1.4.7 荧光定量 PCR 扩增检测

(1) 样品制备:挑取纯培养的单个菌落,加入 200 μ L 已灭菌的 ddH₂O 中充分混匀,13000 rpm 离心 3 min 后吸弃上清。加入 50 μ L 充分震荡混匀的核酸提取液,震荡使菌体沉淀与核酸提取液充分混匀后瞬时离心,将挂壁的液滴甩至 EP 管底部。将含有菌液的 EP 管沸水浴 10 min 后,迅速置于冰上冷却 2-3 min,然后 13000 rpm 离心 10 min。吸取上清液作为后续 PCR 反应的模板。

(2) 反应体系配置:依照金黄色葡萄球菌核酸实时荧光 PCR 检测试剂盒的说明书进行反应体系配置并进行分装及加样。

(3) 荧光 PCR 循环条件设置为第一阶段:95°C 30 s,1 个循环;第二阶段:95°C 5 s;60°C 30 s,40 个循环。

2 结果与分析

2.1 前增菌结果

样品 23-Q777 在 SCDLP 液体培养基中 36°C 培养 24 h 后液体清透、不浑浊;样品 23-A973 和阳性对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923 在 SCDLP 液体培养基中 36°C 培养 24 h 后液体均浑浊,表面有一层菌膜且底部有絮状物沉淀。

2.2 平板分离结果

2 份样品在 Baird Parker 平板、金黄色葡萄球菌显色平板和血平板上,36°C 培养 48 h 后。样品 23-Q777 在 Baird Parker 平板、金黄色葡萄球菌显色平板和血平板上均无菌生长,弃之;样品 23-A973 在 Baird Parker 平板上可见圆形,光滑,凸起,湿润的灰黑色菌落,周围有混浊带,外层有透

明圈为可疑菌落;在金黄色葡萄球菌显色平板上可见圆形凸起表面光滑的紫红色菌落为可疑菌落;在血平板上可见金黄色,圆形,不透明,表面光滑,周围有溶血圈的菌落为可疑菌落,并挑取可疑菌株进行分离纯化。

2.3 生化鉴定结果

样品 23-A973 经染色镜检、甘露醇发酵试验(厌氧)、血浆凝固酶试验确定鉴定后,该样本的生化反应结果(详见表 1)与金黄色葡萄球菌的生化反应相符合。可报告样品 23-A973 检出金黄色葡萄球菌。

表 1 生化实验结果

Table 1 Results of biochemical experiments

样品编号	革兰氏染色	甘露醇发酵试验(厌氧)	血浆凝固酶试验
23-A973	革兰氏阳性球菌,呈葡萄状排列,无芽孢,无荚膜	+	+(每 0.5 h 观察一次,1.5 h 呈现凝固)
阳性对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923	革兰氏阳性球菌,呈葡萄状排列,无芽孢,无荚膜	+	+(每 0.5 h 观察一次,1.5 h 呈现凝固)
阴性对照菌株表皮葡萄球菌 CICC10294	革兰氏阳性球菌,呈葡萄串状,无芽孢,无荚膜	-	-(每 0.5 h 观察一次,6 h 未呈现凝固)

注: +表示阳性; -表示阴性。

2.4 ATB 细菌检测结果

经 ATB 细菌鉴定仪鉴定后,样品 23-A973 结果为金黄色葡萄球菌,为极好的鉴定,%ID: 99.9、T 值: 0.76。

2.5 荧光定量 PCR 鉴定结果

在荧光定量 PCR 扩增检测中,样品 23-A973、阳性对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923、试剂盒阳性对照均有 S 型扩增曲线且 CT 值均 ≤ 35 (具体 CT 值见表 2),阴性对照菌株表皮葡萄球菌 CICC10294、空白对照以及阴性对照均无扩增(见图 1),即说明为金黄色葡萄球菌阳性。

表 2 荧光定量 PCR CT 值

Table 2 CT values of fluorescence quantitative PCR

样品编号	CT 值	结果判断
23-A973	24.22	金黄色葡萄球菌阳性
阳性对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923	20.62	金黄色葡萄球菌阳性
试剂盒阳性对照	21.16	金黄色葡萄球菌阳性
阴性对照菌株表皮葡萄球菌 CICC10294	/	金黄色葡萄球菌阴性
试剂盒阴性对照	/	金黄色葡萄球菌阴性
空白对照	/	金黄色葡萄球菌阴性

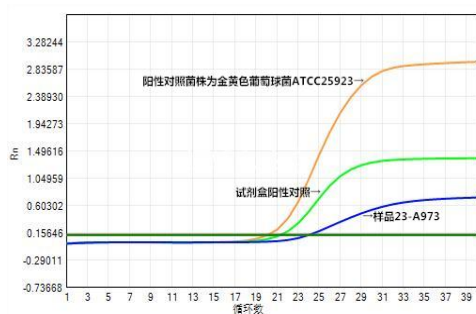


图1 样品 23-A973 和阳性对照菌株 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.1 Fluorescence quantitative PCR amplification curves of sample 23-A973 and positive control strains

2.6 三种检验方法的结果比较

为了提高结果的准确性,对可疑菌落进行分离纯培养后采取了国标生化检测法、ATB 细菌鉴定和荧光定量 PCR 三种方法进行了检验。各方法具体结果见表 3。

从表 3 的检验结果可以看出样品 23-Q777 未检出金黄色葡萄球菌,样品 23-A973 检出金黄色葡萄球菌,三种检验方法得出的结果均一致。

表 3 三种检验方法所得结果比较

Table 3 Comparison of results obtained by the three test methods

样品编号	国标生化检测法	ATB 细菌鉴定	荧光定量 PCR
23-Q777	未检出	未检出	未检出
23-A973	检出	检出	检出
阳性对照菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC25923	检出	检出	检出
阴性对照菌株 表皮葡萄球菌 CICC10294	未检出	未检出	未检出

3 结论与讨论

本次的能力验证对于保证本实验室的对于化妆品中的金黄色葡萄球菌检测质量具有重要意义,它起到了有效的辅助作用。通过参加能力验证活动,实验室可以发现自身存在的问题^[12],结合实验室的内部质控,持续不断的改进与完善自身的质量管理体系^[13]。在这次考核过程中,采用了常规的生化检测方法,ATB 细菌鉴定和荧光定量 PCR 多种方法进行检验,结合《化妆品安全技术规范》(2015 年版)的判断标准,报告样品 23-Q777 未检出金黄色葡萄球菌,样品 23-A973 检出金黄色葡萄球菌,结果满意。

目前对于化妆品中的金黄色葡萄球菌的检测,普遍采用《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中的生化检测方法,

使用此方法检测时间长且如果遇到杂菌较多难以识别目标菌落,容易出现漏检而导致结果出现假阴性^[14]。而荧光定量 PCR 操作简便、速度快,灵敏度高且结果更加准确可靠。因此,在之后的日常金黄色葡萄球菌的检验过程中,实验室可以根据自身需要采用多种鉴定方法相结合来提高准确度和工作效率。

参考文献

- [1] 时慧, 宁晓文, 闫爱莉. 化妆品中金黄色葡萄球菌检测能力的验证方法与结果研究[J]. 质量安全与检验检测, 2021, 31(01): 93-95.
- [2] 向春艳. 化妆品中金黄色葡萄球菌检测能力验证方法与结果分析[J]. 检验检疫学刊, 2020, 30(02): 17-20.
- [3] 丁新玲, 李曼. 金黄色葡萄球菌标本分布及耐药情况分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(12): 1442-1445.
- [4] 国家食品药品监管总局. 《化妆品安全技术规范》2015 年版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [5] 毋堃杰, 杨瑞昕, 夏天, 等. 化妆品中金黄色葡萄球菌检测能力验证结果分析[J]. 质量安全与检验检测, 2020, 30 (06): 28-31,43.
- [6] 朱旭. 化妆品中金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检测能力验证实施研究[J]. 质量安全与检验检测, 2020, 30(06): 94-95,101.
- [7] 卜红宇, 葛丽萍, 王昆鹏, 等. 化妆品中金黄色葡萄球菌检验能力验证研究[J]. 质量安全与检验检测, 2024, 34(01): 69-72,76.
- [8] 王家芳, 付霞, 李杰, 等. 化妆品中金黄色葡萄球菌检验能力验证方法及分析[J]. 工业微生物, 2023, 53(04): 72-75.
- [9] 江志杰, 高春. 化妆品中金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检出能力验证结果与分析[J]. 香料香精化妆品, 2015, (06): 29-32,36.
- [10] 孙廷丽, 李彩玲, 刘静霞, 等. 化妆品中耐热大肠菌群和金黄色葡萄球菌检测能力验证分析[J]. 工业微生物, 2021, 51(02): 17-21.
- [11] 殷锐凤. 质量控制方式之能力验证浅析[J]. 公关世界, 2021, (12): 184-185.
- [12] 刘颖. 实验室参加能力验证的重要意义[J]. 冶金管理, 2020, (11): 255-256.
- [13] 张明君, 杨玲玲, 李小燕, 等. 化妆品微生物检验能力验证分析与探讨[J]. 检验检疫学刊, 2020, 30(03): 45-47,58.
- [14] 陶明, 王媛, 郭琦, 等. 5 种检测化妆品中金黄色葡萄球菌方法的比较[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(05): 679-683.

作者简介

李娉婷, 检验师, 主要从事微生物检验。