团体标准

T/CAFFCI XXXX-XXXX

代替 T/CAFFCI 46-2021

|  |
| --- |
|  |

化妆品微生物检验方法（定性）

ATP生物荧光增幅法

 Qualitative Detection of microorganisms in cosmetics

Amplified ATP bioluminescence method

（征求意见稿）

|  |
| --- |
| 在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。 |
|  |

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

中国香料香精化妆品工业协会   发布

ICS 71.100.70

CCS Y42

前  言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替T/CAFFCI 46-2021《化妆品微生物检验方法（定性）ATP生物荧光增幅法》，与T/CAFFCI 46-2021相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——增加了“第二法 双培养体系法”（见第8章）；

——更改了原产品影响测试步骤为第一法“单培养体系法”产品影响测试步骤（见第7章，2021年版的附录A）；

——调整培养基和试剂具体成分及配制方法至附录B，并增加了TLE培养基（见附录B）。

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专利的责任。

本文件由中国香料香精化妆品工业协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2021年首次发布为T/CAFFCI 46-2021；

——本次为第一次修订。

化妆品微生物检验方法（定性）ATP生物荧光增幅法

1. 范围

本文件描述了化妆品中微生物（定性）ATP生物荧光增幅的检验方法。

本文件适用于化妆品中微生物的检验。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ADP 二磷酸腺苷（adenosine diphosphate）

AK 腺苷酸激酶（adenylate kinase）

ATP 三磷酸腺苷（adenosine triphosphate）

MTAT 改良胰酪胨卵磷脂吐温肉汤（modified trypticase azolectin tween）

TAT 胰酪胨卵磷脂吐温肉汤（trypticase azolectin tween）

TLE 吐温80-卵磷脂-正二十烷肉汤（tween 80-lecithin-eicosane）

1. 方法原理

样品稀释制成检液，经MTAT或TLE富集培养后，利用微生物体内的AK，催化外源添加的ADP底物生成ATP，实现ATP增幅；通过添加荧光素酶和荧光素，将ATP高能键在断裂过程中产生的能量转化为生物荧光信号；采用全自动荧光光度仪检测，根据生物荧光信号强度判断样品中是否含有微生物。

6 仪器设备

6.1 全自动荧光光度仪：需具备试剂添加、计时、读取荧光强度等功能1）。

6.2 摇床培养箱：25 ℃±2 ℃、30 ℃±2 ℃、32.5 ℃±2 ℃，圆周式震荡，200 r/min～250 r/min。

6.3 轨道式往复式摇床：振幅3.81 cm，280 r/min，或经验证具有同等破壁效果的摇床。

6.4 生物安全柜。

6.5 漩涡混合器: 0 r/min～2500 r/min。

6.6 高压灭菌器。

6.7 电子天平：量程0 g～200 g，精确至0.1 g。

6.8 移液器：50 μL、100 μL、1 mL、5 mL。

6.9 玻璃珠：直径0.5 mm，或等效的其他材料或大小的珠、砂，如氧化锆珠。

6.10 旋盖玻璃瓶：250 mL，或其他无菌/可灭菌容器。

6.11 量筒：1000 mL。

6.12 烧杯：2000 mL。

6.13 pH计。

7 培养基和试剂

除特别说明外，本文件需使用分析纯试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。

7.1 TAT基础培养基2）：见附录B中B.1。

7.2 MTAT培养基：见附录B中B.2。

7.3 TLE培养基：见附录B中B.3。

7.4 消泡剂：见附录B中B.4。

7.5 ATP 生物荧光增幅法试剂盒3）或其他等效产品：见附录B中B.5。

8 单培养体系法（第一法）

8.1 通用要求

产品第一次使用本方法或发生变化可能影响检验结果时，首先应通过产品影响测试，产品影响测试试验步骤按附录A。符合产品影响测试要求的样品可按照以下步骤进行检验。

8.2 操作步骤

8.2.1 检液制备

按照《化妆品安全技术规范》（2015版）第五章微生物检验方法规定的供试样品制备方法，制成1:10稀释的检液，制备中使用MTAT或其他经验证的适宜中和剂作为稀释液。

8.2.2 增菌

 取10 mL 1:10稀释的检液，加入90 mL MTAT或其他经过验证等效的培养基中，制备成产品试样，如产品抑菌性较强，可采用增加培养基用量、添加中和剂或薄膜过滤等方法，消除产品抑菌作用。将培养基置于摇床培养箱中于30 ℃±2 ℃，200 r/min～250 r/min振荡培养48h±2h。另取100 mL MTAT作为培养基空白按上述方法一同培养。

8.2.3 上机检测

在100 mL产品试样中加入15 g玻璃珠和0.1 mL消泡剂（可选），置往复式摇床上280 r/min振荡处理30min。

取破壁处理后的产品试样50 μL上机检测，按照仪器和试剂使用说明书进行操作，完成ATP生物荧光增幅法检测。同时取培养基空白50 μL两平行以同样方法上机检测。

上机检测方法如下：

向50 μL产品试样中加入细胞裂解剂和ADP底物试剂各100 μL，以裂解微生物细胞并开始ATP增幅反应；

向产品试样中加入荧光素酶试剂100 μL开始荧光反应，由全自动荧光光度计读取相对荧光强度值（RLU）。

8.2.4 结果判读

 检测完成后使用软件进行数据处理和结果判读。

8.3 结果判读标准

以未加产品试样的MTAT检测所得荧光信号均值（RLU）为培养基空白荧光值，通常情况下按下列公式计算阳性阈值：

阳性阈值 = 3 × 培养基空白荧光值

产品试样RLU值 ≥ 阳性阈值，判定为阳性；

产品试样RLU值 < 阳性阈值，判定为阴性。

8.4 结果报告

结果为阴性者，表明在该检验条件下被检样品未检出微生物。

结果为阳性者，按《化妆品安全技术规范》（2015版）第五章微生物检验方法进行确证。

9 双培养体系法（第二法）

9.1 通用要求

同7.1。

9.2 操作步骤

9.2.1 检液制备

同8.2.1。

9.2.2 增菌

各取10 mL 1:10稀释的检液，分别加入90 mL MTAT培养基和90 mL TLE培养基，或其它经过验证等效的培养基中，制备成产品试样，如产品抑菌性较强，可采用增加培养基用量、添加中和剂或薄膜过滤等方法，消除产品抑菌作用。将MTAT培养基产品试样置于摇床培养箱中于32.5 ℃±2 ℃、TLE培养基产品试样置于摇床培养箱中于25 ℃±2 ℃，200 r/min～250 r/min振荡培养24h±2h。另取100 mL MTAT和100 mL TLE作为培养基空白按上述方法一同培养。

9.2.3 上机检测

在MTAT和TLE两种富集体系培养液中分别加入15 g玻璃珠和0.1 mL消泡剂（可选），置于往复式摇床280 r/min振荡30min。

吸取破壁后的MTAT培养产品试样和TLE培养产品试样各25 μL，混合，上机检测。按照仪器和试剂使用说明书进行操作，完成 ATP 生物荧光增幅法检测。同时取培养基空白各25 μL，混合均匀，以同样方法上机检测。

上机检测方法同8.2.3。

8.2.4 结果判读

同8.2.4。

附录A

 （规范性）

产品影响测试

A.1 产品影响测试步骤

A.1.1单培养体系法

A.1.1.1 将10～100 CFU 洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）CICC 21926或铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）CICC 10419等其他经验证适用菌种接入10 mL MTAT中，制成菌悬液。

A.1.1.2 按检液制备要求（见8.2.1）制备1:10稀释的检液。取10 mL 1:10稀释的检液加入90 mL MTAT中，制备成产品试样，同时取100 mL MTAT作为培养基空白。

A.1.1.3 将以上制备的菌悬液、产品试样和培养基空白置摇床培养箱中于30 ℃±2 ℃，200 r/min～250 r/min振荡培养48h±2h。

A.1.1.4 对培养后的产品试样和培养基空白按上机检测要求（见8.2.3）进行ATP生物荧光增幅法检测。若产品试样检测结果为阴性，可继续进行以下试验；若结果为阳性，则需将产品试样划线或涂布至卵磷脂吐温80-营养琼脂培养基和虎红培养基以确认产品中是否含有微生物污染或非微生物来源ATP干扰。

A.1.1.5 将菌悬液用MTAT稀释100倍待用。

A.1.1.6 900 µL MTAT中加入100 µL ATP阳性对照标品，混合均匀，为ATP培养基对照。

A.1.1.7 900 µL MTAT中加入100 µL 100倍稀释的菌悬液，混合均匀，为微生物对照。

A.1.1.8 900 µL产品试样中加入100 µL ATP阳性对照标品，混合均匀，为ATP试样。

A.1.1.9 900 µL产品试样中加入100 µL 100倍稀释的菌悬液，混合均匀，为微生物试样。

A.1.1.10 将上述制备的ATP培养基对照、微生物对照、ATP试样和微生物试样按上机检测要求（见8.2.3）进行ATP生物荧光增幅法检测。

A.1.2双培养体系法

A.1.2.1 将 10～100 CFU 洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）CICC 21926 或铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）CICC 10419 等其他适用菌种接入 10 mL MTAT 中，制成菌悬液。

A.1.2.2 按检液制备要求制备 1:10 稀释的检液。分别取10 mL 1:10稀释的检液加入90 mL MTAT和TLE中，制备成产品试样，同时取100 mL MTAT和TLE作为培养基空白。

A.1.2.3 将以上MTAT制备的菌悬液、产品试样和MTAT培养基空白置于摇床培养箱中于32.5 ℃±2 ℃，200 r/min～250 r/min 振荡培养 24h±2h；TLE制备的产品试样和TLE培养基空白置于摇床培养箱中于 25 ℃±2 ℃，200 r/min～250 r/min 振荡培养24h±2h。

A.1.2.4 对培养后的产品试样和培养基空白按上机检测要求（见8.2.3）进行ATP生物荧光增幅法检测。若产品试样检测结果为阴性，可继续进行以下试验；若结果为阳性，则需将产品试样划线或涂布至卵磷脂吐温80-营养琼脂培养基和虎红培养基以确认产品中是否含有微生物污染或非微生物来源ATP干扰。

A.1.2.5 将菌悬液用 MTAT 稀释 100 倍待用。

A.1.2.6 各取450 μL MTAT与 450 μL TLE，加入 100 μL ATP 阳性对照标品，混合均匀，为ATP 培养基对照。

A.1.2.7 各取450 μL MTAT与 450 μL TLE，加入 100 μL 100 倍稀释的菌悬液，混合均匀，为微生物对照。

A.1.2.8 各取450 μL MTAT与 450 μL TLE制备的产品试样，加入 100 μL ATP 阳性对照标品，混合均匀，为 ATP试样。

A.1.2.9 各取450 μL MTAT与 450 μL TLE制备的产品试样，加入 100 μL 100倍稀释的菌悬液，混合均匀，为微生物试样。

A.1.2.10 将上述制备的ATP培养基对照、微生物对照、ATP试样和微生物试样按上机检测要求（见7.2.3）进行ATP生物荧光增幅法检测。

A.2 结果判定

按表A.1综合判定样品是否符合产品影响测试标准要求。

表A.1 产品影响测试符合标准

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 编号 | 项目 | 符合标准 |
| A | 培养基空白 | 参照仪器和试剂使用说明 |
| B | ATP培养基对照 | > 3 倍培养基空白RLU |
| C | 微生物对照 | > 3 倍培养基空白RLU |
| D | 产品试样 |  < 3 倍培养基空白RLU a |
| E | ATP试样 | > 3 倍培养基空白RLU |
| F | 微生物试样 | > 3 倍培养基空白RLU |
| G | 产品ATP回收率: $\frac{（E−D）}{(B−A)}×$100% | > 25% b |
| a 若产品试样RLU结果大于3倍培养基空白RLU且平板中有菌落生长（见表A.1 D），该样品不符合产品影响测试标准，需按《化妆品安全技术规范》（2015版）第五章微生物检验方法进行确证，同时可更换不同批次产品重新进行确认。若产品试样RLU结果大于3倍培养基空白RLU且平板中没有菌落生长（见表A.1 D），应消除样品本底荧光信号的影响，可采用富集后稀释等方法重新进行确认。b 25 %为推荐值，经验表明当样品ATP回收率> 25 %时，样品成分通常对检测结果影响较小。 |

附录B

（资料性）

培养基和试剂

B.1 TAT基础培养基

成分

|  |  |
| --- | --- |
| 胰蛋白胨 | 20.0 g |
| 大豆卵磷脂 | 5.0 g |

B.2 MTAT培养基

B.2.1成分

|  |  |
| --- | --- |
| TAT 基础培养基（见 B.1） | 22.5 g |
| 硫代硫酸钠 | 0.5 g |
| 组氨酸 | 0.1 g |
| 蛋白胨  | 7.5 g |
| 葡萄糖  | 15.0 g |
| 氯化钠  | 0.85 g |
| 卵磷脂  | 1.43 g |
| 吐温 80  | 39.0 g |
| 水  | 964 mL |

B.2.2 制法

先将卵磷脂和吐温80加入水中，加热溶解，再加入其他成分，溶解并混匀。使用6 mol/L NaOH 或HCl溶液调pH值至7.0 ± 0.2，121 ℃高压灭菌15min。

B.3 TLE培养基

B.3.1 成分

|  |  |
| --- | --- |
| TAT 基础培养基（见 B.1）  | 22.5 g |
| 硫代硫酸钠 | 0.5 g |
| 组氨酸 | 0.1 g |
| 蛋白胨 | 7.5 g |
| 葡萄糖  | 15.0 g |
| 氯化钠 | 0.85 g |
| 正二十烷 | 5.0 g |
| 蔗糖 | 30.0 g |
| 磷酸氢二钾 | 1.0 g |
| 硫酸镁 | 0.5 g |
| 硫酸亚铁 | 0.01 g |
| 氯化钾 | 0.5 g |
| 硝酸钠 | 3.0 g |
| 卵磷脂 | 1.43 g |
| 吐温 80  | 39.0 g |
| 水  | 914 mL |

B.3.2 制法

先将卵磷脂和吐温80加入水中，加热溶解，再加入其他成分，溶解并混匀。使用6 mol/L NaOH或HCl溶液调pH值至5.6 ± 0.2，121 ℃高压灭菌15min。

B.4 消泡剂

聚二甲基硅氧烷大颗粒乳液或其他等效产品。

B.5 ATP 生物荧光增幅法试剂盒或其他等效产品

含细胞裂解剂、ADP 底物试剂、荧光素酶试剂、ATP 阳性对照标品。

参考文献

[1]《化妆品安全技术规范》（2015年版）（国家食品药品监督管理总局公告 2015 年第 268 号）