

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 13640:2023
ISO 22718:2015
WITH AMENDMENT 1:2022**

Xuất bản lần 1

**MỸ PHẨM – VI SINH VẬT –
PHÁT HIỆN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***
Cosmetics – Microbiology – Detection of Staphylococcus aureus

HÀ NỘI – 2023

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu.....	6
Lời giới thiệu.....	7
1 Phạm vi áp dụng.....	9
2 Tài liệu viện dẫn.....	9
3 Thuật ngữ và định nghĩa.....	10
3.1 Sản phẩm (product).....	10
3.2 Mẫu (sample).....	10
3.3 Hỗn dịch ban đầu (initial suspension).....	10
3.4 Mẫu pha loãng (dilution sample).....	10
3.5 Vi sinh vật chỉ định (specified microorganism).....	10
3.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
3.7 Môi trường tăng sinh lỏng (enrichment broth).....	11
4 Nguyên tắc.....	11
5 Dung dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy.....	11
5.1 Quy định chung.....	11
5.2 Dung dịch pha loãng hỗn dịch vi khuẩn (dung dịch tryptone natri chloride).....	11
5.3 Môi trường nuôi cấy.....	12
6 Dụng cụ và dụng cụ thủy tinh.....	15
7 Chuẩn vi sinh vật.....	15
8 Xử lý mẫu mỹ phẩm và mẫu thử phòng thí nghiệm.....	15
9 Quy trình.....	16
9.1 Khuyến cáo chung.....	16
9.2 Chuẩn bị hỗn dịch mẫu ban đầu trong môi trường tăng sinh lỏng.....	16
9.3 Ủ hỗn dịch ban đầu trong môi trường tăng sinh lỏng.....	16
9.4 Phát hiện và định danh <i>Staphylococcus aureus</i>	16
10 Biểu diễn kết quả (phát hiện <i>Staphylococcus aureus</i>).....	17
11 Trung hòa thuộc tính kháng vi sinh vật của sản phẩm.....	18
11.1 Quy định chung.....	18
11.2 Chuẩn bị chủng cấy.....	18

TCVN 13640:2023

11.3	Tính phù hợp của phương pháp phát hiện	18
12	Báo cáo thử nghiệm	19
Phụ lục A (Tham khảo)_Các môi trường khác.....		20
Phụ lục B (Tham khảo)_Các chất trung hòa hoạt tính kháng vi sinh vật của chất bảo quản và các dung dịch rửa/ lọc		23
Thư mục tài liệu tham khảo.....		24

TCVN 13640:2023

Lời nói đầu

TCVN 13640:2023 hoàn toàn tương đương với ISO 22718:2015 và sửa đổi 1:2022.

TCVN 13640:2023 do Viện Kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh cho sản phẩm mỹ phẩm được thực hiện tùy theo mức độ phân tích rủi ro vi sinh nhằm đảm bảo chất lượng và an toàn cho người tiêu dùng.

Phân tích rủi ro vi sinh phụ thuộc vào một số đặc điểm như:

- Độ ổn định của các sản phẩm mỹ phẩm;
- Khả năng gây bệnh của vi sinh vật;
- Vị trí sử dụng sản phẩm mỹ phẩm (tóc, da, mắt, niêm mạc);
- Độ tuổi người sử dụng (người lớn, trẻ em dưới 3 tuổi).

Đối với mỹ phẩm và các sản phẩm sử dụng tại chỗ khác, phát hiện các mầm bệnh trên da như *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Candida albicans* là cần thiết, vì những vi sinh vật này có thể gây bệnh nhiễm khuẩn da hoặc mắt. Ngoài ra, việc phát hiện các loại vi sinh vật khác cũng được quan tâm vì sự xuất hiện của những vi sinh vật này như *Escherichia coli* cho thấy sự không đảm bảo vệ sinh trong quá trình sản xuất.

Mỹ phẩm – Vi sinh vật – Phát hiện *Staphylococcus aureus*

Cosmetics – Microbiology – Detection of Staphylococcus aureus

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung để phát hiện và định danh vi sinh vật *Staphylococcus aureus* trong các sản phẩm mỹ phẩm. Các vi sinh vật được chỉ định trong tiêu chuẩn này có thể khác tùy theo thực tế và quy định riêng của mỗi quốc gia.

Để đảm bảo chất lượng sản phẩm và sự an toàn cho người tiêu dùng, cần thực hiện phân tích rủi ro vi sinh thích hợp để xác định loại sản phẩm mỹ phẩm áp dụng tiêu chuẩn này. Các sản phẩm được coi là có rủi ro vi sinh thấp, dựa trên đánh giá rủi ro được mô tả trong TCVN 13641:2023 (ISO 29621) như các sản phẩm có hoạt độ nước thấp, sản phẩm chứa cồn hoặc giá trị pH cực đoan, v.v.

Phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn này dựa trên việc phát hiện *Staphylococcus aureus* trong môi trường lỏng không chọn lọc (môi trường tăng sinh), tiếp đó là phân lập trên môi trường thạch chọn lọc. Các phương pháp khác có thể thích hợp phụ thuộc vào giới hạn phát hiện.

CHÚ THÍCH: Đối với việc phát hiện *Staphylococcus aureus*, có thể cấy truyền trên môi trường nuôi cấy không chọn lọc, sau đó thực hiện các bước định danh thích hợp (ví dụ sử dụng Kit định danh).

Do có rất nhiều dạng sản phẩm mỹ phẩm nên trong phạm vi áp dụng, phương pháp này có thể không phù hợp với một số sản phẩm cụ thể (ví dụ như các sản phẩm không thấm nước). Các tiêu chuẩn quốc tế khác (TCVN 13635 (ISO 18415)) có thể phù hợp. Các phương pháp khác (ví dụ như phương pháp tự động) có thể thay thế cho các thử nghiệm sinh hóa trình bày ở đây với điều kiện phương pháp đó được chứng minh là tương đương hoặc phù hợp.

2 Tài liệu viện dẫn

Toàn bộ hoặc một phần các tài liệu viện dẫn trong tài liệu này rất cần thiết. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 13640:2023

TCVN 13637, *Mỹ phẩm – Vi sinh – Hướng dẫn chung về kiểm tra vi sinh* (ISO 21148:2017, *Cosmetics – Microbiology – General instructions for microbiological examination*)

EN 12353, *Chemical disinfectants and antiseptics – Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity* (Thuốc khử khuẩn và chất khử khuẩn hoá học – Bảo quản các sinh vật thử nghiệm dùng để xác định hoạt tính diệt khuẩn (bao gồm Legionella), diệt khuẩn nấm, diệt bào tử khuẩn, diệt virus (bao gồm cả thực khuẩn thể))

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

3.1

Sản phẩm (product)

Phần sản phẩm mỹ phẩm xác định nhận được trong phòng thí nghiệm để thử nghiệm.

3.2

Mẫu (sample)

Một phần của sản phẩm (ít nhất 1 g hoặc 1 ml) được dùng để chuẩn bị hỗn dịch ban đầu, S.

3.3

Hỗn dịch ban đầu (initial suspension)

Hỗn dịch hay dung dịch của mẫu trong thể tích nhất định của môi trường tăng sinh lỏng phù hợp.

3.4

Mẫu pha loãng (dilution sample)

Mẫu được pha loãng từ hỗn dịch mẫu ban đầu.

3.5

Vi sinh vật chỉ định (specified microorganism)

Vi khuẩn ưa nhiệt hiếu khí hoặc nấm men không được có trong một sản phẩm mỹ phẩm và được công nhận là một loài gây bệnh trên da có thể gây hại cho sức khỏe con người hoặc là loài vi sinh chỉ thị cho việc không đảm bảo vệ sinh trong quá trình sản xuất.

3.6

Staphylococcus aureus

Cầu khuẩn Gram dương, phần lớn tập trung thành cụm giống chùm nho. Khuẩn lạc nhẵn, sắc tố màu vàng.

CHÚ THÍCH 1: Đặc điểm chính để định danh: phát triển trên môi trường chọn lọc, có phản ứng catalase dương tính, phản ứng coagulase dương tính.

CHÚ THÍCH 2: *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn gây bệnh cơ hội ở người, chúng thường có trên da người

khỏe mạnh mà không gây bất kì ảnh hưởng gì. Đây là loài vi sinh vật không mong muốn trong sản phẩm mỹ phẩm vì có khả năng gây bệnh.

3.7

Môi trường tăng sinh lỏng (enrichment broth)

Môi trường lỏng không chọn lọc chứa các chất trung hòa và / hoặc các chất phân tán thích hợp và đã được chứng minh là phù hợp với sản phẩm được thử nghiệm.

4 Nguyên tắc

Bước đầu tiên của quy trình là làm tăng số lượng vi sinh vật trong môi trường lỏng không chọn lọc và đảm bảo vi sinh vật này không bị ức chế bởi các tác nhân chọn lọc có trong môi trường chọn lọc / phân biệt.

Bước thứ hai của thử nghiệm (phân lập) được thực hiện trên môi trường chọn lọc và sau đó là các thử nghiệm định danh.

Phải trung hòa khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật của mẫu thử để cho phép phát hiện các vi sinh vật còn sống. Trong mọi trường hợp và bất kể phương pháp nào, phải kiểm tra và chứng minh sự trung hòa các đặc tính kháng khuẩn của sản phẩm (Điều 11).

5 Dung dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy

5.1 Quy định chung

Quy định chung được đề cập trong TCVN 13637 (ISO 21148). Nước đề cập trong tiêu chuẩn này là nước cất hoặc nước tinh khiết được đề cập trong TCVN 13637 (ISO 21148).

Môi trường tăng sinh lỏng được sử dụng để phân tán mẫu thử và tăng số lượng vi sinh vật ban đầu. Môi trường có chứa chất trung hòa nếu mẫu được kiểm tra có chứa chất kháng khuẩn. Hiệu lực của chất trung hòa cần được chứng minh (Điều 11). Thông tin về chất trung hòa phù hợp được đưa ra trong Phụ lục B.

Theo tiêu chuẩn này, môi trường tăng sinh lỏng (5.3.3.1) hay bất kì môi trường nào được liệt kê trong Phụ lục A đều phù hợp để kiểm tra sự có mặt của *Candida albicans*. Những môi trường này đã được chứng minh là phù hợp (Điều 11).

Những dung dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy khác cũng có thể được sử dụng nếu được chứng minh là phù hợp.

5.2 Dung dịch pha loãng hỗn dịch vi khuẩn (dung dịch tryptone natri chloride)

5.2.1 Quy định chung

Dung dịch pha loãng được sử dụng để chuẩn bị hỗn dịch vi khuẩn cũng được dùng cho kiểm tra tính phù hợp của quy trình thử nghiệm (Điều 11).

5.2.2 Thành phần

TCVN 13640:2023

Trypton, Casein thủy phân bởi pancreatin	1,0 g
Natri clorid	8,5 g
Nước	1 000 ml

5.2.3 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối dung dịch vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt khoảng $7,0 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

5.3 Môi trường nuôi cấy

5.3.1 Quy định chung

Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị theo mô tả dưới đây hoặc từ môi trường khô theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cần tuân thủ các hướng dẫn từ nhà sản xuất môi trường.

CHÚ THÍCH: Môi trường pha sẵn có thể được sử dụng khi thành phần và / hoặc khả năng dinh dưỡng của chúng tương đương với các công thức được đưa ra trong tài liệu này.

5.3.2 Môi trường thạch để kiểm tra tính phù hợp của phương pháp (Điều 11) [môi trường thạch casein đậu tương (SCDA) hoặc môi trường thạch đậu tương tryptic (TSA)]

5.3.2.1 Thành phần

Casein thủy phân bởi pancreatin	15,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	5,0 g
Natri clorid	5,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh trong nước bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở 121°C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt khoảng $7,3 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

5.3.3 Môi trường tăng sinh lòng

5.3.3.1 Eugon LT 100

5.3.3.1.1 Quy định chung

Đây là môi trường có chứa các thành phần để trung hòa chất ức chế vi sinh vật có mặt trong mẫu thử: lecithin, polysorbat 80 và tác nhân phân tán octoxynol 9. Môi trường Eugon LT100 lỏng cải tiến có thể được chọn sử dụng thay thế.

5.3.3.1.2 Thành phần

Casein thủy phân bởi pancreatin	15,0 g
---------------------------------	--------

Bột đậu tương thủy phân bởi papain	5,0 g
L-cystine	0,7 g
Natri clorid	4,0 g
Natri sulfit	0,2 g
Glucose	5,5 g
Lecithin từ trứng	1,0 g
Polysorbat 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.3.1.3 Chuẩn bị

Hòa tan hoàn toàn các thành phần polysorbate 80, octoxynol 9 và lecithin từ trứng trong nước sôi để tan hoàn toàn. Thêm các thành phần còn lại vào bằng vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt khoảng $7,0 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

5.3.3.2 Môi trường Eugon LT lỏng cải tiến

5.3.3.2.1 Thành phần

Casein thủy phân bởi prapcreatin	15,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	5,0 g
L-cystine	0,7 g
Natri clorid	4,0 g
Natri sulfit	0,2 g
Glucose	5,5 g
Lecithin từ trứng	1,0 g
Polysorbat 80	5,0 g
Natri lauryl eter sulphate	1,56 g
Nước	1 000 ml

5.3.3.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan lần lượt từng thành phần polysorbate 80 và lecithin từ trứng trong nước sôi để tan hoàn toàn. Thêm các thành phần còn lại vào bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt khoảng $7,0 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

TCVN 13640:2023

5.3.3.3 Các môi trường tăng sinh lòng khác

Có thể sử dụng các môi trường tăng sinh lòng khác nếu phù hợp (xem Phụ lục A)

5.3.4 Môi trường thạch chọn lọc để phân lập *Staphylococcus aureus*

5.3.4.1 Môi trường thạch Baird Parker

5.3.4.1.1 Môi trường cơ bản

5.3.4.1.1.1 Thành phần

Casein thủy phân bởi pancreatin	10,0 g
Cao nấm men	1,0 g
Cao thịt	5,0 g
Natri pyruvate	10,0 g
L-glycin	12,0 g
Lithi clorid	5,0 g
Thạch	12 g đến 22 g
Nước	vừa đủ đến 950 ml

5.3.4.1.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan tất cả các thành phần hoặc môi trường khô trong nước bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn môi trường ở 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt khoảng $7,2 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

5.3.4.1.2 Dung dịch kali tellurit

5.3.4.1.2.1 Thành phần

K ₂ TeO ₃ (kali tellurit)	1,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.4.1.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan hoàn toàn kali tellurit vào nước bằng cách gia nhiệt ở nhiệt độ thấp nhất.

Tiệt khuẩn bằng cách lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,22 µm. Dung dịch này được bảo quản tối đa 1 tháng ở 3 °C ± 2 °C. Loại bỏ dung dịch nếu có kết tủa màu trắng.

5.3.4.1.3 Nhũ tương lòng đỏ trứng (nồng độ khoảng 20 % hoặc theo hướng dẫn của nhà sản xuất)

Nếu không có sẵn dạng thương mại thì chuẩn bị môi trường theo hướng dẫn sau đây:

Sử dụng trứng gà tươi còn nguyên vỏ. Làm sạch quả trứng với bàn chải bằng cách sử dụng dung dịch tẩy rửa. Rửa quả trứng dưới vòi nước đang chảy, sau đó sát khuẩn vỏ bên ngoài bằng cách nhúng chìm vào trong cồn 70 % (tt / tt) trong 30 s và để khô trong không khí hoặc xịt cồn lên quả trứng và sau đó tiệt khuẩn bằng ngọn lửa. Trong điều kiện vô khuẩn, tách riêng lòng đỏ với lòng trắng bằng cách

chuyển qua lại lòng đỏ giữa 2 nửa vỏ quả trứng. Cho lòng đỏ vào bình đã tiệt khuẩn và thêm 4 lần thể tích nước vô khuẩn. Trộn đều. Đun nóng 47 °C trong 2 h và để trong 18 h đến 24 h ở 3 °C ± 2 °C để kết tủa. Lấy phần nước phía trên cho vào bình vô khuẩn.

Nhũ tương này có thể được bảo quản ở 3 °C ± 2 °C trong tối đa 72 h.

5.3.4.1.4 Môi trường hoàn chỉnh

5.3.4.1.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.3.4.1.1)	100 ml
Dung dịch kali tellurite (5.3.4.1.2)	1,0 ml
Nhũ tương lòng đỏ trứng (5.3.4.1.3)	5,0 ml

5.3.4.1.4.2 Chuẩn bị

Làm tan chảy môi trường cơ bản (5.3.4.1.1), sau đó làm nguội đến khoảng 47 °C. Trong điều kiện vô khuẩn, thêm 2 dung dịch còn lại (5.3.4.1.2 và 5.3.4.1.3), trước khi thêm nên làm ấm đến 47 °C, trộn đều sau khi thêm mỗi thành phần.

5.3.4.2 Môi trường chọn lọc khác

Có thể sử dụng môi trường chọn lọc khác nếu phù hợp (xem Phụ lục A).

6 Dụng cụ và dụng cụ thủy tinh

Sử dụng thiết bị phòng thí nghiệm và dụng cụ theo mô tả trong TCVN 13637 (ISO 21148).

7 Chuồng vi sinh vật

Để xác nhận tính phù hợp của điều kiện thử nghiệm, chủng vi khuẩn sau đây được sử dụng:

Staphylococcus aureus ATCC¹⁾ 6538 (tương đương với chủng CIP²⁾ 4.83 hoặc NCIMB³⁾ 9518)

Các chủng trên cần được hoàn nguyên theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Các chủng có thể được lưu giữ trong phòng thí nghiệm theo EN 12353.

8 Xử lý mẫu mỹ phẩm và mẫu thử phòng thí nghiệm

Giữ sản phẩm thử nghiệm ở nhiệt độ phòng, nếu cần. Không được ủ, làm lạnh hoặc cấp đông sản phẩm và mẫu thử nghiệm trước hoặc sau khi phân tích.

Quá trình lấy mẫu thử nghiệm từ các sản phẩm mỹ phẩm để phân tích cần được tiến hành như mô tả trong TCVN 13637 (ISO 21148). Phân tích mẫu như mô tả trong TCVN 13637 (ISO 21148) và theo quy trình đưa ra trong Điều 9.

¹⁾ ATCC = American Type Culture Collection = Bộ sưu tập chủng chuẩn Mỹ.

²⁾ CIP = Bộ sưu tập Viện Pasteur, Pháp

³⁾ NCIMB = National Collection of Industrial and Marine Bacteria

9 Quy trình

9.1 Khuyến cáo chung

Sử dụng vật liệu vô khuẩn, thiết bị và kỹ thuật vô khuẩn để chuẩn bị mẫu thử nghiệm, pha hỗn dịch mẫu ban đầu và mẫu pha loãng. Khi chuẩn bị hỗn dịch mẫu ban đầu, sử dụng dung dịch pha loãng hợp lý, khoảng thời gian từ lúc hoàn tất việc chuẩn bị đến lúc hỗn dịch mẫu ban đầu và / hoặc mẫu pha loãng bắt đầu tiếp xúc với môi trường tăng sinh không nên quá 45 min, trừ khi có yêu cầu đặc biệt khác trong quy trình hoặc tài liệu đã thiết lập.

9.2 Chuẩn bị hỗn dịch mẫu ban đầu trong môi trường tăng sinh lòng

9.2.1 Quy định chung

Mẫu thử được tăng sinh từ mẫu (3.2) ít nhất 1 g hoặc 1 ml sản phẩm (đã được trộn đều) được phân tán trong ít nhất 9 ml môi trường tăng sinh lòng.

CHÚ THÍCH: S, khối lượng hay thể tích chính xác của mẫu thử nghiệm.

Phương pháp thử nghiệm nên được kiểm tra để chắc rằng các thành phần (chất trung hòa được thêm vào) và thể tích của môi trường tăng sinh lòng là phù hợp cho thử nghiệm (11.3).

CHÚ THÍCH: Trong một số trường hợp, khi có thể, lọc sản phẩm mỹ phẩm qua một màng lọc và sau đó, màng lọc này được cấy vào môi trường tăng sinh lòng nhằm tạo điều kiện thuận lợi trong việc trung hòa các chất kháng khuẩn của sản phẩm (11.3).

9.2.2 Các sản phẩm trộn lẫn được trong nước

Chuyển lượng mẫu, S, của sản phẩm vào trong một bình chứa một lượng thích hợp môi trường tăng sinh lòng.

9.2.3 Các sản phẩm không trộn lẫn được trong nước

Chuyển lượng mẫu, S, của sản phẩm vào trong một bình chứa một lượng thích hợp tác nhân phân tán (ví dụ polysorbat 80).

Phân tán mẫu thử trong tác nhân phân tán và thêm một lượng thích hợp môi trường tăng sinh lòng.

9.2.4 Các sản phẩm có thể lọc được

Sử dụng màng lọc có kích thước lỗ lọc không quá 0,45 µm.

Chuyển lượng mẫu, S, lên màng lọc của bộ lọc (TCVN 13637 (ISO 21148)). Lọc nhanh và rửa màng lọc bằng một lượng nước và/ hoặc dung dịch pha loãng xác định. Chuyển màng lọc và nhúng ngập màng lọc vào ống hoặc bình có chứa một lượng thích hợp môi trường tăng sinh lòng.

9.3 Ủ hỗn dịch ban đầu trong môi trường tăng sinh lòng

Ủ hỗn dịch ban đầu được chuẩn bị trong môi trường lỏng (9.2) ở $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong vòng ít nhất 20 h (tối đa 72 h).

9.4 Phát hiện và định danh *Staphylococcus aureus*

9.4.1 Phân lập

Sử dụng que cấy vòng vô khuẩn, cấy rìa một vòng que cấy từ môi trường tăng sinh lòng lên bề mặt

môi trường thạch Baird Parker để thu được các khuẩn lạc riêng lẻ.

Lật ngược đĩa petri, sau đó ủ ở $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ trong ít nhất 24 h (tối đa 48 h).

Kiểm tra các đặc điểm khuẩn lạc (xem Bảng 1).

Bảng 1 – Đặc điểm hình thái khuẩn lạc *Staphylococcus aureus* trên môi trường chọn lọc

Môi trường chọn lọc	Đặc điểm khuẩn lạc <i>Staphylococcus aureus</i>
Môi trường thạch Baird Parker	Khuẩn lạc màu đen, sáng bóng, xung quanh có vùng trong (2 mm đến 5 mm)

9.4.2 Định danh *Staphylococcus aureus*

9.4.2.1 Quy định chung

Tiến hành các thử nghiệm sau đây trên các khuẩn lạc nghi ngờ đã được phân lập trên môi trường thạch Baird Parker. Sự hiện diện của *Staphylococcus aureus* có thể được khẳng định bằng các môi trường và các phản ứng sinh hóa thích hợp khác.

9.4.2.2 Nhuộm Gram

Phép thử được mô tả trong TCVN 13637 (ISO 21148).

Quan sát dưới kính hiển vi sau khi nhuộm gram phải là cầu khuẩn gram dương kết thành chùm.

9.4.2.3 Phản ứng catalase

Phép thử được mô tả trong TCVN 13637 (ISO 21148).

Kiểm tra xem có phải phản ứng catalase dương tính không.

9.4.2.4 Phản ứng Coagulase

Chuyển một vòng que cấy của khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch Baird Parker vào từng ống vô khuẩn riêng lẻ, mỗi ống chứa 0,5 ml huyết tương động vật có vú, tốt nhất là thỏ hoặc ngựa, có hoặc không có chứa chất phụ gia thích hợp.

Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Nếu không có chỉ dẫn nào khác của nhà sản xuất, kiểm tra ống sau 3 h, 4 h, 6 h và đến 24 h nếu phản ứng coagulase chưa xuất hiện trong vòng 6 h. Sự đông huyết tương ở thời điểm 24 h cần được khẳng định.

Thực hiện đồng thời mẫu thử với mẫu kiểm tra dương tính và mẫu kiểm tra âm tính.

Kiểm tra xem có phải phản ứng coagulase dương tính không

10 Biểu diễn kết quả (phát hiện *Staphylococcus aureus*)

Nếu kết quả định danh xác định được sự có mặt của loài vi khuẩn này thì kết quả được ghi như sau:

— Phát hiện *Staphylococcus aureus* trong mẫu, S.

Nếu không thấy có sự phát triển trên môi trường tăng sinh và / hoặc kết quả định danh khuẩn lạc

TCVN 13640:2023

không xác định được sự có mặt của loài vi khuẩn này thì kết quả được ghi như sau:

— Không phát hiện *Staphylococcus aureus* trong mẫu, S.

11 Trung hòa thuộc tính kháng vi sinh vật của sản phẩm

11.1 Quy định chung

Các phép thử khác được mô tả dưới đây dùng để chứng minh các chủng vi sinh vật có thể phát triển trong điều kiện thử nghiệm.

11.2 Chuẩn bị chủng cấy

Trước khi tiến hành thử nghiệm, cấy chủng *Staphylococcus aureus* lên trên bề mặt thạch casein đậu tương (SCDA) hoặc môi trường thích hợp khác (môi trường không chọn lọc, không chứa chất trung hòa). Ủ ở $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 18 h đến 24 h.

Để thu hoạch chủng vi sinh vật đã nuôi cấy, sử dụng que cấy vòng vô khuẩn, lấy khuẩn lạc trên bề mặt môi trường và trộn lại trong dung dịch pha loãng để được hỗn dịch chủng và điều chỉnh hỗn dịch này để thu được hỗn dịch chủng hiệu chỉnh chứa khoảng 1×10^8 CFU/ml (ví dụ có thể sử dụng máy đo quang phổ để xác định nồng độ tương đối trong TCVN 13637 (ISO 21148), Phụ lục C).

Sử dụng hỗn dịch chủng hiệu chỉnh và các hỗn dịch chủng pha loãng trong vòng 2 h.

11.3 Tính phù hợp của phương pháp phát hiện

11.3.1 Quy trình

11.3.1.1 Pha loãng hỗn dịch chủng ban đầu trong các ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng để được nồng độ chủng cuối cùng chứa khoảng 100 CFU/ml đến 500 CFU/ml. Để đếm nồng độ cuối cùng của vi sinh vật sống lại được trong dung dịch pha loãng, chuyển 1 ml hỗn dịch chủng vào đĩa Petri và đổ 15 ml đến 20 ml môi trường thạch tan chảy được giữ ấm trong bể điều nhiệt ở nhiệt độ không quá $48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ủ đĩa ở $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 h đến 24 h.

11.3.1.2 Chuẩn bị hai ống hoặc hai bình hỗn dịch mẫu ban đầu theo điều kiện đã được lựa chọn cho thử nghiệm (chứa ít nhất 1 g hoặc 1 ml sản phẩm trong một thể tích xác định môi trường tăng sinh lỏng). Khi sử dụng phương pháp màng lọc, lọc ít nhất 1 ml sản phẩm từ 2 ống / bình như trên và chuyển mỗi màng lọc vào một ống nghiệm hoặc bình chứa môi trường tăng sinh lỏng trong điều kiện đã được lựa chọn cho thử nghiệm.

11.3.1.3 Chuyển 0,1 ml hỗn dịch chủng được pha loãng từ hỗn dịch chủng ban đầu đã biết số lượng vi sinh vật (11.3.1.1) vào một ống nghiệm hoặc bình (thử nghiệm tính phù hợp). Trộn đều, sau đó ủ các ống nghiệm / bình (thử nghiệm tính phù hợp và mẫu kiểm tra không chứa vi sinh vật) ở $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 h đến 24 h.

11.3.1.4 Phân lập vi sinh vật từ mỗi ống nghiệm / bình (trong thử nghiệm tính phù hợp và mẫu kiểm tra không chứa vi sinh vật). Sử dụng que cấy vòng vô khuẩn lấy một vòng hỗn dịch đã được ủ cấy lên bề mặt đĩa Petri (đường kính 85 đến 100 mm) chứa khoảng 15 ml đến 20 ml môi trường thạch

cetrimid. Ủ đĩa ở $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h đến 48 h.

11.3.2 Giải thích các kết quả thử nghiệm tính phù hợp

Kiểm tra số lượng vi sinh vật trong hỗn dịch chủng sau khi pha loãng (11.3.1.1) phải chứa khoảng từ 100 CFU/ml đến 500 CFU/ml.

Nếu *Staphylococcus aureus* phát triển đặc trưng trên đĩa thử tính phù hợp và không có sự phát triển nào trên đĩa kiểm tra thì phương pháp trung hòa có hiệu quả và và phương pháp phát hiện là phù hợp.

Khi trên đĩa kiểm tra có vi sinh vật phát triển (sản phẩm tạp nhiễm), phương pháp trung hòa có hiệu quả và và phương pháp phát hiện là phù hợp nếu *Staphylococcus aureus* được phục hồi trên đĩa thử tính phù hợp.

Khi không thấy sự phát triển của vi sinh vật ở các đĩa thử tính phù hợp thì chứng tỏ hoạt tính kháng khuẩn vẫn còn và cần phải điều chỉnh các điều kiện của phương pháp bằng việc tăng thể tích môi trường dinh dưỡng lỏng mà vẫn giữ nguyên lượng mẫu, hoặc bằng cách kết hợp một lượng đủ tác nhân khử hoạt tính trong môi trường tăng sinh lỏng hoặc sự kết hợp các biện pháp điều chỉnh để *Staphylococcus aureus* phát triển được.

Mặc dù có sự kết hợp của các tác nhân khử hoạt tính kháng khuẩn thích hợp và sự gia tăng đáng kể thể tích của môi trường lỏng nhưng vi sinh vật không sống lại được như mô tả ở trên thì kết luận rằng mẫu thử không nhiễm *Staphylococcus aureus*.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm bao gồm:

- Viện dẫn tiêu chuẩn này, nghĩa là TCVN 13640 (ISO 22718:2018); Amendment 1:2022;
- Tất cả các thông tin cần thiết của sản phẩm;
- Phương pháp đã sử dụng;
- Các kết quả đã thu được;
- Chi tiết các bước tiến hành chuẩn bị hỗn dịch mẫu ban đầu
- Mô tả phương pháp với chất trung hòa và môi trường đã sử dụng;
- Chứng minh sự phù hợp của phương pháp, ngay cả khi thử nghiệm đã được thực hiện riêng rẽ;
- Bất kỳ điểm nào không được nêu trong tài liệu này, hoặc được coi là tùy chọn (không bắt buộc), cùng với các chi tiết về bất kỳ sự cố nào có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các môi trường khác

A.1 Các môi trường tăng sinh lòng khác

A.1.1 Môi trường lòng casein thủy phân từ đậu tương

A.1.1.1 Thành phần

Casein thủy phân bởi pancreatin	15,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	5,0 g
Natri clorid	5,0 g
Nước	1 000 ml

A.1.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên hoặc hòa tan môi trường khô hoàn chỉnh trong nước bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt $7,3 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

A.1.2 Môi trường trung hòa D/E lòng (Môi trường trung hòa Dey/Engley lòng)

A.1.2.1 Thành phần

Glucose	10,0 g
Lecithin đậu nành	7,0 g
Natri thiosulfat pentahydrat ($H_{10}Na_2O_8S_2$)	6,0 g
Polysorbate 80	5,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Natri sunfit ($NaHSO_3$)	2,5 g
Cao nấm men	2,5 g
Natri thioglycolat ($C_2H_3NaO_2S$)	1,0 g
Bromcresol	0,02 g
Nước	1 000 ml

A.1.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan tất cả các thành phần trên hoặc môi trường khô hoàn chỉnh trong nước bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt $7,6 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

A.1.3 Môi trường letheen lỏng cải tiến**A.1.3.1 Thành phần**

Pepton từ thịt	20,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Cao thịt bò	5,0 g
Cao nấm men	2,0 g
Lecithin	0,7 g
Polysorbat 80	5,0 g
Natri clorid	5,0 g
Natri bisulfit	0,1 g
Nước	1 000 ml

A.1.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan hoàn toàn lần lượt polysorbate 80 và lecithin trong nước sôi. Hòa tan các thành phần còn lại bằng cách vừa khuấy vừa đun nóng. Trộn nhẹ nhàng tránh tạo bọt. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở nhiệt độ 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH sẽ phải đạt $7,2 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

A.2 Môi trường thạch chọn lọc khác**A.2.1 Môi trường thạch muối – Mannitol (thạch Chapman)****A.2.1.1 Thành phần**

Cao thịt bò	1,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Thịt bò thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Natri clorid	75,0 g
D-mannitol	10,0 g
Thạch	15,0 g
Đỏ phenol	0,025 g
Nước	1 000 ml

TCVN 13640:2023

A.2.1.2 Chuẩn bị

Vừa khuấy vừa đun nóng, đun sôi trong 1 min để hòa tan hoàn toàn. Phân phối môi trường vào các bình có thể tích thích hợp. Hấp diệt khuẩn ở nhiệt độ 121 °C trong 15 min. Sau khi hấp và để nguội, pH phải đạt $7,4 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

A.2.2 Môi trường thạch Vogel – Johnson

A.2.2.1 Thành phần

Casein thủy phân bởi pancreatin	10,0 g
Cao nấm men	5,0 g
Mannitol	10,0 g
Dikali hydrophosphat	5,0 g
Lithi clorid	5,0 g
Glycin	10,0 g
Thạch	16,0 g
Đỏ phenol	0,025 g
Nước	1 000 ml

A.2.2.2 Chuẩn bị

Đun sôi dung dịch chứa các chất rắn trong 1 min. Hấp diệt khuẩn ở nhiệt độ 121 °C trong 15 min, làm nguội đến 45 °C và 50 °C, thêm 20 ml dung dịch Kali telurit (K_2TeO_3) đã diệt khuẩn. Sau khi hấp và làm nguội, pH phải đạt $7,2 \pm 0,2$ khi đo ở nhiệt độ phòng.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Các chất trung hòa hoạt tính kháng vi sinh vật của chất bảo quản và các dung dịch rửa/ lọc

Chất bảo quản	Hợp chất hóa học có thể trung hòa hoạt tính kháng khuẩn của chất bảo quản	Ví dụ về thành phần chất trung hòa thích hợp và các dung dịch rửa (dùng cho phương pháp màng lọc)
Các hợp chất phenol: Các paraben, phenoxyethanol, Phenylethanol, v.v...	Lecithin, Polysorbat 80, Ethylen oxid ngưng tụ của cồn béo (fatty alcohol)	30 g/l Polysorbat 80 + 3 g/l lecithin 7 g/l Ethylen oxid ngưng tụ của cồn béo + 20 g/l lecithin + 4 g/l polysorbate 80 Môi trường lỏng trung hòa D/E ^a
Các anilin	Chất hoạt động bề mặt không ion	Dung dịch rửa: nước cất vô khuẩn; 1 g/l trypton, + 9 g/l NaCl; 5 g/l polysorbat 80
Các hợp chất amoni bậc bốn Các chất hoạt động bề mặt cation	Lecithin, saponin, polysorbat 80, natri dodecyl sulphat Ethylen oxid ngưng tụ của cồn béo (fatty alcohol)	30 g/l Polysorbat 80 + 4 g/l natri dodecyl sulphat + 3 g/l lecithin 30 g/l Polysorbat 80 + 30 g/l saponin + 3 g/l lecithin Môi trường lỏng trung hòa D/E ^a Dung dịch rửa: nước cất vô khuẩn; 1 g/l trypton, + 9 g/l NaCl; 5 g/l polysorbat 80
Các andehit Các chất giải phóng formaldehyd	Glycin, histidin	3 g/l Lecithin + 30 g/l polysorbat 80 + 1 g/l L-histidin 30 g/l Polysorbat 80 + 30 g/l saponin + 1 g/l L-histidin + 1 g/l L-cystein Môi trường lỏng trung hòa D/E ^a Dung dịch rửa: nước cất vô khuẩn; 3 g/l polysorbat 80 + 0,5 g/l L-histidin
Các hợp chất oxy hóa	Natri thiosulfat	5 g/l Natri thiosulfat Dung dịch rửa: 3 g/l Natri thiosulfat
Các isothiazolinon, imidazol	Lecithin, saponin Các amin, sulfat, mercaptan, natri bisulfit, natri thioglycolat	30 g/l Polysorbat 80 + 30 g/l saponin + 3 g/l lecithin Dung dịch rửa: 1 g/l trypton + 9 g/l NaCl; 5 g/l polysorbat 80
Các biguanide	Lecithin, saponin, polysorbat 80	30 g/l Polysorbat 80 + 30 g/l saponin + 3 g/l lecithin Dung dịch rửa: 1 g/l trypton + 9 g/l NaCl; 5 g/l polysorbat 80
Các muối kim loại (Cu, Zn, Hg) Các muối thủy ngân hữu cơ	Natri bisulfat, L-cystein Các hợp chất sulfhydryl, axit thioglycolic	0,5 g/l hay 5 g/l Natri thioglycolat 0,8 g/l hay 1,5 g/l L-cystein Môi trường lỏng trung hòa D/E ^a Dung dịch rửa: 0,5 g/l Natri thioglycolat

^a Môi trường lỏng trung hòa D/E (Môi trường lỏng trung hòa Dey/Engley) – xem Phụ lục A

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] COLIPA, *Guidelines on Microbial Quality Management*, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), 1997
 - [2] CTFA, *Microbiology Guidelines*, publish by the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 2007, ISBN 1-882621-32-8
 - [3] EP, *Microbiological Examination of non-sterile products*, 4th edition, published by the *European Pharmacopoeia*, 2002
 - [4] FDA, *Bacteriological Analytical Manual*, 8th edition, U.S. Food and Drug, 1995, Administration, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-23.html>.
 - [5] JP 14, *General Tests – Microbial Limit test*, Japanese Pharmacopoeia, 2001
 - [6] USP 28, *Microbial Limit test <61>*, U.S. Pharmacopoeia, 2005
 - [7] ATLAS R.M., *Handbook of Microbiological Media*, CRC Press, ISBN 0-8493-2944-2, 1993.
 - [8] SINGER S., *The Use of Preservative neutralizers in diluents and plating media*, *Cosmetics and Toiletries*, 1987, 102 (December), pp. 55
 - [9] ISO 21149, *Cosmetic – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*
 - [10] ISO 18415, *Cosmetic – Microbiology – Detection of specified and non-specified microorganisms*
 - [11] EN 1040, *Chemical disinfectants and antiseptics – Basic bactericidal activity – Test method and requirements (phase 1)*.
 - [12] ISO 29621, *Cosmetic – Microbiology – Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products*
-