

化粧品中白色念珠菌之檢驗

Method of Test for *Candida albicans* in Cosmetics

1. 適用範圍：本方法適用於化粧品中白色念珠菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養後進行鑑別之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為 100 呎燭光以上，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。
 - 2.2. 器具及材料：
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
 - 2.2.3. 培養箱：能維持內部溫度溫差± 1.0°C以內者。
 - 2.2.4. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到100 g，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.5. 光學顯微鏡。
 - 2.2.6. 旋渦混合器。
 - 2.2.7. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.8. 吸管輔助器或微量吸管。
 - 2.2.9. 吸管：已滅菌。1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL刻度。
 - 2.2.10. 吸管尖：1000 µL。
 - 2.2.11. 玻璃珠：直徑約5~7 mm，已滅菌。
 - 2.2.12. 培養皿：已滅菌，內徑約90 mm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
 - 2.2.13. 稀釋用容器：無菌袋或有100 mL、50 mL或10 mL標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶或試管。
 - 2.2.14. 紗布墊、藥勺、抹刀、剪刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
 - 2.2.15. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈹或鉻線材質。

或可拋棄式者。

2.2.16. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。

2.2.17. 試藥：

結晶紫 (crystal violet)、亞硫酸氫鈉 (NaHSO₃)、氯黴素 (chloramphenicol)、聚山梨醇酯80 (polysorbate 80)、葡萄糖 (dextrose)、草酸銨 (ammonium oxalate)、碘化鉀、碘、沙黃O (safranin O)及95%乙醇均採用化學試藥級。Infusion from corn meal、Lethen培養液 (Lethen broth)、胰化酪蛋白胨 (trypticase peptone)、硫蛋白胨 (thiotone peptone)、酵母抽出物 (yeast extract)、胃消化動物組織 (peptic digest of animal tissue)、胰消化乾酪素 (pancreatic digest of casein)、洋菜 (agar)及胎牛或馬血清均採用微生物級。

2.2.18. 試劑：

2.2.18.1. 70%乙醇溶液：

取95%乙醇560 mL，溶於蒸餾水200 mL，混合均勻。

2.2.18.2. 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)：

2.2.18.2.1. 哈克氏 (Hucker's) 結晶紫液 (初染劑)：

溶液A：取結晶紫2 g，溶於95%乙醇20 mL。

溶液B：取草酸銨0.8 g，溶於蒸餾水80 mL。

將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

2.2.18.2.2. 革蘭氏碘液 (媒染劑)：

取碘化鉀2 g及碘1 g，置於研鉢中，研磨5~10秒，加蒸餾水1 mL研磨，次加蒸餾水5 mL研磨，再加蒸餾水10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水中，將此溶液注入褐色試藥瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，併入洗液，加蒸餾水使成300 mL。

2.2.18.2.3. 哈克氏複染液 (複染劑)：

取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，供作複染原液。

使用時，取複染原液10 mL，加入蒸餾水90 mL，混合

均勻，作為複染液。

註：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，需注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.19. 培養基：

2.2.19.1. 改良式Lethen培養液(Modified letheen broth, MLB)

Lethen培養液(Lethen broth)	25.7 g
胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	5 g
硫蛋白朊(thiotone peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
亞硫酸氫鈉(NaHSO ₃)	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.2。

2.2.19.2. 沙氏葡萄糖氯黴素瓊脂培養基(Sabouraud dextrose chloramphenicol agar)

葡萄糖(dextrose)	40.0 g
胃消化動物組織(peptic digest of animal tissue)	5.0 g
胰消化乾酪素(pancreatic digest of casein)	5.0 g
氯黴素(chloramphenicol)	0.050 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為5.6 ± 0.2。

2.2.19.3. 含1%聚山梨醇酯80之玉米粉瓊脂培養基(Corn meal agar with 1% polysorbate 80)

Infusion from corn meal	50.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
聚山梨醇酯80 (polysorbate 80)	10.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最後pH值為 6.0 ± 0.2 。

2.3. 檢液之調製：

2.3.1. 液態檢體：

量取檢體 1 mL，置於滅菌試管，加入 MLB 9 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.2. 固態與粉末檢體：

稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之聚山梨醇酯80 1 mL，利用抹刀將檢體分散後，再加入MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.3. 面霜與油脂類檢體：

稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入經121°C滅菌15分鐘之聚山梨醇酯80 1 mL、無菌玻璃珠5~7顆及MLB 8 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.4. 噴霧劑：

以70%乙醇溶液濕潤之紗布消毒噴霧器之噴嘴，先從噴嘴噴出部分檢體於無菌紗布墊，丟棄，再將檢體噴灑於稀釋瓶中，稱取檢體1 g，置於滅菌試管，加入MLB 9 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.5. 無水材料類檢體：參照2.3.2.與2.3.3.節。

2.4. 分離培養試驗：

將2.3節之10倍稀釋檢液於 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養至少20小時，以無菌接種環取一環耳劃線培養於沙氏葡萄糖氯黴素瓊脂培養基(Sabouraud dextrose chloramphenicol agar)，於 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養24~48小時，觀察所形成菌落之生長狀態，選取白色至米色，表面奶油狀隆起之菌落，進行生化試驗。

2.5. 生化試驗：

2.5.1. 革蘭氏染色鏡檢：

2.5.1.1. 鈎取適當菌量，與滴在載玻片上的無菌生理食鹽水混合，製成薄抹片，採自然風乾固定，勿用火烤。

- 2.5.1.2. 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘後，水洗，水洗時間應不超過5秒鐘。
 - 2.5.1.3. 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。
 - 2.5.1.4. 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以水洗。此步驟需時甚短，僅數秒鐘即可，惟視抹片之厚薄而定。
 - 2.5.1.5. 複染：用複染液複染30秒鐘，水洗。
 - 2.5.1.6. 自然風乾。
 - 2.5.1.7. 鏡檢：白色念珠菌呈現深紫色，短卵圓形或細長細胞有時具出芽酵母細胞。
- 2.5.2. 發芽管實驗(Germ tube test)
- 2.5.2.1. 將一接種環酵母菌落與血清(胎牛或馬血清)0.5~1.0 mL 共置於小試管中。
 - 2.5.2.2. 於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中培養1.5~2小時或於 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養箱中培養3小時。
 - 2.5.2.3. 取2.5.2.2培養後一滴血清，置於載玻片上，覆蓋蓋玻片，以顯微鏡下觀察發芽管之產生。發芽管係源自芽生孢子(blastospore)之圓柱形細絲(filament)，於發芽點無任何收縮，且細絲上並無明顯的膨脹。
 - 2.5.2.4. 若未形成發芽管，則進行2.5.3試驗，觀察是否產生菌絲(hyphae)、假菌絲(pseudohyphae)及厚膜孢子(chlamydospores)
- 2.5.3. 含1%聚山梨醇酯80之玉米粉瓊脂培養基培養試驗(Culture on corn meal agar with 1% polysorbate 80)
- 2.5.3.1. 用無菌接種環取一環耳酵母菌落，於含1%聚山梨醇酯80之玉米粉瓊脂培養基畫線，將無菌蓋玻片覆蓋於接種線上方。
 - 2.5.3.2. 於 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養至3天。
 - 2.5.3.3. 於培養24小時後，打開培養皿上蓋，以放大倍率為100到400倍下，鏡檢蓋玻片上白色念珠菌生長狀況。白色念珠菌在菌絲末端或短側枝上產生高折射率的大厚壁(thick-

walled)厚膜孢子(chlamyospore)。

2.6. 判定：

分離培養試驗及生化試驗結果確認為白色念珠菌。

2.7. 可使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統。

2.8. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. International Organization for Standardization. 2016. Cosmetics-Microbiology -Detection of *Candida albicans*. ISO 18416.
2. Huang, J., Hitchins, A. D., Tran, T. T. and McCarron, J. E. 2021. Bacteriological Analytical Manual Chapter 23 Microbiological Methods for Cosmetics. USFDA.
3. 衛生福利部。2021。中華藥典。第九版。

檢驗流程圖

