

附件 2

保健食品用菌种致病性评价程序 (征求意见稿)

1 范围

本程序规定了保健食品生产用菌种（包括细菌、丝状真菌和酵母）的致病性评价程序。

本程序规定了作为保健食品的活性成分（活菌）和作为保健食品生产发酵用菌株两类微生物的致病性评价。

本程序适应于保健食品申请审批时对生产用菌种的致病性评价，对用拟评价菌种生产的产品中其他成分的评价，应参照国家相关规定进行。

本程序不适应于基因修饰微生物的致病性评价。

2 术语和定义

2.1 致病性, Pathogenicity

微生物感染宿主造成健康损害引起疾病的能力。

2.2 产毒能力, Toxigenicity

微生物产生对人和动物有毒作用的活性代谢产物的能力。

2.3 毒性, Toxicity

微生物有毒代谢产物引起的宿主健康损伤。

3 拟评价微生物菌种的基本要求

3.1 基本信息

菌种名称(包括学名、俗名、拉丁名等)、来源及用途。

3.2 菌种分类学资料

提供由有菌种鉴定资质的检验机构出具的拟评价菌种规范、科学的分类学(属、种、株名称或株号)资料。细菌的分类和命名应遵循原核生物系统学国际委员会(International Committee on Systematics of Prokaryotes)的规定,并符合原核生物国际命名法规(International Code of Nomenclature of Prokaryotes)要求。真菌的分类和命名应遵循国际藻类、真菌和植物命名法规(International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants)进行。

3.3 菌种鉴定资料

根据目前已有的知识,提供基于表型或最新基因测序技术确切鉴定到种水平的资料。

3.4 菌种生长环境条件资料

提供菌种生长最适培养基及培养条件(培养时间、培养温度和湿度、光照等),以及菌种保藏及复壮方法等。

3.5 诱变菌种

经诱变的菌种还需提供详细的诱变方法(包括使用的诱变剂、诱变条件及诱变实验流程等)。

3.6 生产相关信息

包括但不限于安全用于保健食品工业生产的记录、工艺流程、企业标准等资料。

3.7 其他国家审批资料

提供其他国家批准拟评价菌种作为保健食品或普通食品生

产使用的资料；

3.8 其他需要说明的信息。

4 评价方法

4.1 国内外安全性评价资料综述

基于国内外文献数据，提供拟评价菌种的国内外使用历史、安全性评价资料，包括其致病性和产毒能力的报告、科技文献或综述等；若无拟评价菌种的上述资料，应提供同种内其他菌株或与其相近种属的安全性评价资料。

4.2 全基因组测序(Whole Genome Sequencing, WGS)

4.2.1 基因测序

对拟评价菌株进行全基因组测序，提供包括但不限于以下信息：

- DNA 提取方法
- 测序方案及仪器设备
- 序列组装方法
- 序列质量评价
- FASTA 文件
- 与预期基因组大小相关的 contigs 总长度
- 基因注释流程
- 对真菌而言，还需提供从相关数据库中获得的注释质量信息。

4.2.2 基因序列分析

将拟评价菌株的基因组序列与已有的数据库(包括但不限于

VFDB、PAI DB、MvirDB、CGE 等) 最新版本中存储的序列进行对比, 并分析拟评价菌种遗传物质中与致病相关的已知毒力因子、毒素代谢基因的存在情况。至少提供包括以下信息的分析报告:

- 毒力 (或产毒相关) 基因名称、所在位置、与最新数据库中已有毒力基因的匹配度等信息

- 编码的蛋白及序列号

- 毒力因子 (毒素产生、侵袭和粘附因子等)

- 同源百分比和 e 值

- 数据库中已充分描述过的菌株名称

- 基因组图谱

- 拟评价的真菌菌种还应根据文献报道能够产生的毒素类别, 针对性检索是否存在毒素合成关键基因。

4.3 动物致病性试验

由有菌种致病性检测和评价资质的机构, 按照附录 A、B 和 C 实验方案进行保健食品用拟评价细菌、真菌、酵母菌种对动物的致病性实验、评价并出具报告。

4.4 产毒实验

对某些能够产生真菌毒素的真菌, 应在多种基质 (单品种固体、多品种固体复合、不同成分液体组合等) 中进行产毒实验, 并按照国家标准检测方法或国际组织/相关国家规定的标准检测方法进行有毒活性代谢产物含量检测。

根据到目前为止我国已批准可用于保健食品的真菌名单, 用于保健食品生产用的红曲霉属应进行桔青霉素产毒实验。

5 结果判定

5.1 出现以下结果一个以上者，则认为菌株的致病风险较低，可作为保健食品生产用菌种

5.1.1 三个以上国家批准作为食品或保健食品用菌种且具有长期（30年以上）的使用历史。

5.1.2 全基因序列分析结果显示不存在已知的毒力相关基因或毒素合成关键基因；

5.1.3 动物实验显示无致病性，

5.1.4 产毒实验结果显示在受试的基质中均不产生有毒活性代谢产物。

5.2 出现以下结果之一者，则认为具有致病风险，不能作为保健食品生产用菌种

5.2.1 根据现有知识，全基因序列分析发现存在已知毒力基因（或毒素合成关键基因）；

5.2.2 动物试验结果显示有致病性；

5.2.3 产毒实验显示在受试的任何一种基质中可产生有毒活性代谢产物。

5.3 其他需要综合判断的情况

5.3.1 全基因序列中发现存在已知毒力基因（或毒素合成关键基因），但动物实验显示不具有致病性，或产毒实验未检测到已知的有毒活性代谢产物；

5.3.2 全基因测序列中未发现存在已知的毒力基因（或毒素合成关键基因），但动物实验显示具有致病性，产毒实验未检测到已知的有毒活性代谢产物；

出现上述情况之一者，需结合国内外使用历史和安全性评价资料、国内外文献综述、生产工艺、生产条件、终产品中生产菌种的存在情况等综合判断。

附录 A

(规范性附录)

保健食品用细菌致病性试验方法

1 范围

本方法规定了保健食品用细菌的致病性试验方法。

本方法适用于保健食品用细菌的致病性评价。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。

2.2 电子天平：感量 0.1 g。

2.3 锥形瓶：容量 500 mL。

2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.5 无菌试管：16 × 160 mm。

2.6 显微镜：10 × ~ 100 ×。

2.7 微量移液器及枪头：1.0 mL。

2.8 注射器：1.0 mL。

2.9 小鼠灌胃针头。

2.10 厌氧培养装置：厌氧罐、厌氧箱。

2.11 Class II 生物安全柜

3 培养基和试剂

3.1 0.85%无菌生理盐水：商品化的生理盐水，或 8.5gNaCl 溶于 1000mL 生流水中，121℃高压灭菌 15 min，备用。

3.2 LB 肉汤培养基：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备 LB 肉汤培养基，备用。

3.3 LB 琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书配用蒸馏水制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备 LB 琼脂平板，备用。

3.4 MRS 肉汤培养基：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备 MRS 肉汤培养基，备用。

3.5 MRS 琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备 MRS 琼脂平板，备用。

3.6 双歧杆菌琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备双歧杆菌琼脂平板，备用。

4 实验动物

选用昆明或 ICR 健康小鼠，雌雄各半，体重 18.0g~22.0 g。

5 操作步骤

所有拟评价的菌株均必须进行腹腔注射和经口灌胃两种途径染毒动物，评价菌株对动物的致病性。

5.1 腹腔注射

5.1.1 菌种活化与菌悬液制备

到目前为止我国批准的可用于保健食品的细菌菌种主要是双歧杆菌和乳杆菌，新的申报菌种在以下描述中归为其他细菌。

根据菌种的培养特征，将双歧杆菌和乳杆菌接种 MRS 肉汤、其它细菌接种 LB 肉汤，并置适宜的培养条件下(包括培养温度、湿度，厌氧、需氧、微需氧等)培养一定时间后，将双歧杆菌接种 MRS 琼脂平板或双歧杆菌琼脂平板，乳杆菌接种 MRS 琼脂平板，其他细菌接种 LB 琼脂平板，培养一定时间后，刮取平板上的菌落，将其悬浮于无菌生理盐水中，充分混匀后，用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度，用比浊法使菌悬液中菌体细胞的最终浓度不低于 5.0×10^7 CFU/mL。

5.1.2 腹腔注射

小鼠 40 只，雌雄各半，分别随机分成 4 组（每组 10 只），包括雄性小鼠菌悬液灭活对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠菌悬液灭活对照组、雌性小鼠菌悬液组。每只小鼠注射 0.2 mL，使每只小鼠注射菌量至少 10^7 CFU/只。

5.1.3 动物观察

动物腹腔注射后每天观察 1 次，至少观察 21 d。

观察动物出现下列（但不限于）异常的情况：（1）皮肤和毛；（2）眼睛和粘膜；（3）呼吸系统；（4）肢体活动；（5）行为方式；（6）特别注意观察出现震颤、抽搐、腹泻、嗜睡、流涎和昏迷等现象；（7）体重：注射前及注射后每周所有小鼠称量，并测量实验期间死亡的、最终处死的小鼠体重。若小鼠的存活时间超过 1d，记录其体重变化；（8）尽可能精确记录小鼠的死亡时间。

5.2 经口灌胃

5.2.1 菌种活化与菌悬液制备

除制备菌悬液浓度不小于 2.5×10^8 CFU/mL 外，其他操作步骤同 5.1.1。

5.2.2 灌胃

小鼠 40 只，雌雄各半，分别随机分成 4 组（每组 10 只），包括雄性小鼠菌悬液灭活对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠菌悬液灭活对照组、雌性小鼠菌悬液组，分别以 2.0 mL/100g • BW 的剂量给小鼠灌胃，灌胃前应禁食一夜，灌胃后 3~4h 喂食。

5.2.3 观察

同 5.1.3。

6 结果与报告

对 5.1 和 5.2 的实验结果进行统计学分析，并进行评价，包括：

- （1）拟评价菌株对动物体重的影响是否有统计学意义；
- （2）动物出现异常特征的时间及症状描述、出现异常的动物数目等，包括每只动物的死亡时间；

(3) 受试物组动物在实验期间未出现中毒症状或死亡，且对其生长发育等影响无统计学意义，即可判定该菌种无致病性；受试物组动物在试验期间出现中毒症状或死亡，或试验期间影响其生长发育，即可判定该菌种具有致病性。

附录 B

(规范性附录)

保健食品用丝状真菌的致病性试验方法

1 范围

本方法规定了保健食品用丝状真菌的致病性试验方法。

本方法适用于保健食品用丝状真菌的致病性评价。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1 培养箱：28 °C ± 1 °C。

2.2 电子天平：感量 0.1 g。

2.3 锥形瓶：容量 500 mL。

2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.5 显微镜：10× ~ 100×。

2.6 微量移液器及枪头：1.0 mL。

2.8 比浊仪。

2.9 注射器：1.0 mL。

2.10 小鼠灌胃针头。

2.11 接种针。

2.11 Class II 生物安全柜

3 培养基和试剂

3.1 麦芽汁琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备麦芽汁琼脂平板，备用。

3.2 马铃薯葡萄糖琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备马铃薯葡萄糖琼脂平板，备用。

3.3 0.85%无菌生理盐水：商品化的生理盐水，或 8.5gNaCl 溶于 1000mL 蒸馏水中，121℃高压灭菌 15 min，备用。

4 实验动物

选用昆明或 ICR 健康小鼠，雌雄各半，体重 18.0g~22.0 g。

5 操作步骤

所有拟评价的菌株均必须进行腹腔注射和经口灌胃两种途径染毒动物，评价菌株对动物的致病性。

5.1 腹腔注射

5.1.1 菌种活化与菌悬液制备

将送检菌种接种于适宜的培养基上，到目前为止我国批准的可用于保健食品的真菌菌种除了红曲霉属菌种接种麦芽汁琼脂平板外，其他菌种均接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板，28℃±1℃培养 7 d~14 d 后，刮取平板上的菌落，将其悬浮于无菌生理盐

水中，充分混匀后，用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度，用比浊法菌悬液中孢子的最终浓度不低于 5.0×10^7 CFU/mL。

5.1.2 注射

小鼠 40 只，雌雄各半，分别随机分成 4 组（每组 10 只），包括雄性小鼠菌悬液灭活对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠菌悬液灭活对照组、雌性小鼠菌悬液组，每只小鼠注射 0.2mL，使每只小鼠注射的孢子量不少于 10^7 CFU/只。

5.1.3 观察

动物腹腔注射后每天观察 1 次，至少观察 21 d。

观察动物出现下列（但不限于）异常的情况：（1）皮肤和毛；（2）眼睛和粘膜；（3）呼吸系统；（4）肢体活动；（5）行为方式；（6）特别注意观察出现震颤、抽搐、腹泻、嗜睡、流涎和昏迷等现象；（7）体重：注射前及注射后每周称量所有小鼠的体重，并测量实验期间死亡的、观察期内存活的、最终处死的小鼠均需称重。若小鼠的存活时间超过 1d，记录其体重变化；（8）尽可能精确记录小鼠的死亡时间。

5.2 经口灌胃

5.2.1 菌种活化与菌悬液制备

除制备浓度不小于 2.5×10^8 CFU/mL 的菌悬液外，其他操作步骤同 5.1.1。

5.2.1 灌胃

小鼠 40 只，雌雄各半，分别随机分成 4 组（每组 10 只），包

括雄性小鼠菌悬液灭活对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠菌悬液灭活对照组、雌性小鼠菌悬液组，以 2.0 mL / 100g · BW 的剂量给小鼠灌胃，灌胃前禁食一夜，灌胃后 3~4h 喂食。

5.2.2 观察

同 5.1.3。

6 结果与报告

对5.1和5.2的实验结果进行统计学分析，并进行评价，包括以下内容：

- (4) 拟评价菌株对动物体重的影响是否有统计学意义；
- (5) 动物出现异常特征的时间及症状描述、出现异常的动物数目等，包括每只动物的死亡时间；
- (6) 受试物组动物在实验期间未出现中毒症状或死亡，且对其生长发育等影响无统计学意义，即可判定该菌种无致病性；受试物组动物在试验期间出现中毒症状或死亡，或实验期间其生长发育受到影响，即可判定该菌种具有致病性。

附录 C

(规范性附录)

保健食品用酵母的致病性试验方法

1 范围

本方法规定了保健食品用酵母的致病性试验方法。

本方法适用于保健食品用酵母的致病性评价。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1 培养箱：28 °C ± 1 °C。

2.2 电子天平：感量 0.1 g。

2.3 锥形瓶：容量 500 mL。

2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.5 显微镜：10× ~ 100×。

2.6 微量移液器及枪头：1.0 mL。

2.8 比浊仪。

2.9 注射器：1.0 mL。

2.10 小鼠灌胃针头。

2.11 温湿度计。

2.12 接种针。

2.13 Class II 生物安全柜

3 培养基和试剂

3.1 麦芽汁琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121℃高压灭菌 15 min，制备麦芽汁琼脂平板，备用。

3.2 0.85%无菌生理盐水：商品化的生理盐水，或 8.5gNaCl 溶于 1000mL 蒸馏水中，121℃高压灭菌 15 min，备用。

4 实验动物

选用昆明或 ICR 健康小鼠，雌雄各半，体重 18.0g~22.0 g。

5 操作步骤

所有拟评价的菌株均必须进行腹腔注射和经口灌胃两种途径染毒动物，评价菌株对动物的致病性。

5.1 腹腔注射

5.1.1 菌种活化与菌悬液制备

将送检菌种接种麦芽汁琼脂平板，28℃±1℃培养 2 d~7 d 后，刮取平板上的菌落，将其悬浮于无菌生理盐水中，充分混匀后，用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度，用比浊调整菌悬液中菌的最终浓度不低于 5.0×10^7 CFU/mL。

5.1.2 注射

小鼠 40 只，雌雄各半，分别随机分成 4 组（每组 10 只），包括雄性小鼠菌悬液灭活对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠菌悬液灭活对照组及雌性小鼠菌悬液组，每只小鼠注射 0.2mL，使每只小鼠注射的菌量不少于 10^7 CFU/只。

5.1.3 观察

动物腹腔注射后每天观察 1 次，至少观察 21d。

观察动物出现下列（但不限于）异常情况：（1）皮肤和毛；（2）眼睛和粘膜；（3）呼吸系统；（4）肢体活动；（5）行为方式；（6）特别注意观察出现震颤、抽搐、腹泻、嗜睡、流涎和昏迷等现象；（7）体重：注射前及注射后每周称量所有小鼠的体重，并测量实验期间死亡的、观察期内存活的、最终处死的小鼠均需称重。若小鼠的存活时间超过 1d，记录其体重变化；（8）尽可能精确记录小鼠的死亡时间。

5.3 经口灌胃

5.3.1 菌种活化与菌悬液制备

除制备菌悬液浓度不小于 2.5×10^8 CFU/mL 外，其他操作步骤同 5.1.1。

5.3.1 灌胃

小鼠 40 只，雌雄各半，分别随机分成 4 组（每组 10 只），包括雄性小鼠菌悬液灭活对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠菌悬液灭活对照组及雌性小鼠菌悬液组，以 2.0 mL / 100g · BW 的剂量给小鼠灌胃，灌胃前应禁食一夜，灌胃后 3~4h 喂食。

5.3.2 观察

同 5.1.3。

6 结果与报告

对5.1和5.2的实验结果进行统计学分析，并进行评价，包括以下内容：

- (7) 拟评价菌株对动物体重的影响是否有统计学意义；
- (8) 动物出现异常特征的时间及症状描述、出现异常的动物数目等，包括每只动物的死亡时间；
- (9) 受试物组动物在实验期间未出现中毒症状或死亡，且对其生长发育等影响无统计学意义，即可判定该菌种无致病性；受试物组动物在试验期间出现中毒症状或死亡，或实验期间其生长发育受到影响，即可判定该菌种具有致病性。

