

T/CVDA

团体标准

T/CVDA XXXXX—2024

改善宠物肠黏膜功能产品的有效性检验方 法和程序

Effectiveness testing methods and procedures for improving pet
intestinal mucosal products

（征求意见稿）

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国兽药协会 发布

目 录

前 言 2

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

 3.1 肠黏膜 3

 3.2 肠道屏障功能 3

 3.3 机械/物理屏障 4

 3.4 化学屏障 4

 3.5 免疫屏障 4

 3.6 生物屏障 4

4 通用要求与原则 4

 4.1 试验原则 4

 4.2 受试样品及处理要求 4

 4.3 对实验动物、饲料、实验环境的要求 4

 4.4 宠物试食试验的基本要求 5

5 动物实验 5

 5.1 动物实验 5

 5.2 分析测定指标 6

6 宠物试食试验 8

 6.1 试验设计及分组要求 8

 6.2 受试样品的剂量和使用方法 9

 6.3 一般指标 9

 6.4 功效性指标 9

7 数据处理与结果判定 10

 7.1 数据处理 10

 7.2 结果判定 10

8 实验报告 11

参考文献 12

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。

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。

本文件由中国兽药协会提出并归口管理。

本文件起草单位：上海宠幸宠物用品有限公司、卫仕营养科学研究院（江苏）有限公司、江苏大学。

本文件主要起草人：马海乐、段玉清、李云亮、刘淑琴。

1 范围

本标准规定改善宠物肠粘膜功能产品的术语和定义，并规范改善宠物肠粘膜产品有效性检验操作，包括试验动物和受试样品要求、实验设计、测试项目、试验方法、数据处理和结果判定及注意事项。

本标准适用于声称具有改善肠粘膜屏障功能的宠物饲料（食品）、保健产品、饲料原料及添加剂的有效性评价。

本标准适用的宠物品种包括犬、猫为主的伴侣动物。

2 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
GB14925 实验动物 环境及设施
GB19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 27476.1 检测实验室安全第1部分：总则
GB/T 31190 实验室废弃化学品收集技术规范
GB/T 35507 生化用试剂测定通则
GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求
GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南
SN/T 3509 实验室样品管理指南
SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南
SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求
GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
GB 13432 预包装特殊膳食用食品标签通则
GB 16740 保健（功能）食品通用标准
GB 26687 食品安全国家标准 复配食品添加剂通则
GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则
GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差。
《宠物饲料标签规定》，农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》
保健食品功能检验与评价技术指导原则（2023年版）
保健食品功能检验与评价方法（2023年版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 肠黏膜 intestinal mucosa

肠腔内最表面的一层结构，分为小肠粘膜和大肠粘膜。

3.2 肠道屏障功能 intestinal mucosal barrier function

指肠道能够防止肠内的有害物质如细菌和毒素穿过肠黏膜进入机体内其他组织、器官和血液循环的结构和功能的总和。肠道屏障主要由机械屏障、生物屏障、化学屏障及免疫屏障组成。

3.3 机械/物理屏障 Mechanical / physical barriers

机械屏障又叫物理屏障，其生理结构基础是黏膜上皮、固有层和黏膜肌层。肠上皮细胞通过细胞连接紧密排列，细胞之间的连接由紧密连接、黏附连接和桥粒等组成，能有效的阻挡细菌、病毒及内毒素进入。

3.4 化学屏障 Chemical barrier

由肠上皮细胞所分泌的粘液、消化液及正常菌分泌的抑菌物质组成。如短链脂肪酸、胆汁酸等。

3.5 免疫屏障 Immunologic barrier

由肠道相关淋巴细胞组织和弥散免疫细胞组成。肠道相关淋巴组织包括上皮内淋巴细胞、固有层淋巴细胞和肠道淋巴结。在肠道黏膜上皮细胞间、固有层以及黏膜下层分布大量淋巴组织和细胞。环境中的细菌、病毒、毒素等抗原刺激肠道黏膜产生免疫反应，肠道黏膜免疫系统可对机体中抗原识别，产生体液免疫和细胞免疫，对抗原进行有效清除，具有抵御病原微生物入侵、抗过敏反应、抑制免疫应答等功能。

3.6 生物屏障 biological barrier

肠道菌群主要包括黏膜菌群和肠腔菌群，黏膜菌群主要以双歧杆菌和乳酸杆菌为主，肠腔菌群多为大肠杆菌和肠球菌，它们黏附在肠道黏膜层上，形成了一个多层次的肠道微生物屏障。

4 通用要求与原则

4.1 试验原则

动物实验和宠物试食试验所列指标均为必做项目；正常动物或各种模型动物（肠道炎症、肠道菌群紊乱、便秘模型动物）任选其一；受试样品中含双歧杆菌、乳杆菌以外的其它益生菌时，应在动物和宠物试验中加测该益生菌；在进行宠物试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

4.2 受试样品及处理要求

应提供受试样品的名称、性状、规格、批号、生产日期、保质期、保存条件、申请单位名称、生产企业名称、配方、生产工艺、质量标准、营养功能以及推荐摄入量等信息；受试样品应是规格化的定型产品，即符合既定的配方、生产工艺及质量标准；应提供受试样品的主要成分、功效成分/标志性成分及可能的有害成分的分析报告；申请产品审定或登记的受试物，应与拟上市的产品完全一致。

4.3 对实验动物、饲料、实验环境的要求

4.3.1 实验动物要求

根据各项实验的具体要求，合理选择实验动物。常用大鼠和小鼠，品系不限，应使用适用于相应功能评价的动物品系，推荐使用近交系动物。动物的性别、周龄依实验需要进行选择。实验动物的数量要求为小鼠每组 10-15 只（单一性别），大鼠每组 8-12 只（单一性别）。

4.3.2 饲养环境

动物及其实验环境应符合国家对实验动物及其实验环境的有关规定。

4.3.3 动物饲料

应提供饲料生产商等相关资料。如为定制饲料，应提供基础饲料配方、配制方法，并提供动物饲料检验报告。

4.4 宠物试食试验的基本要求

4.4.1 基本原则

- 4.4.1.1 宠物试食试验受试样品必需经过动物毒理学安全性评价，并确认为安全的食品。
- 4.4.1.2 原则上受试样品已经通过动物实验证实，确定其具有改善肠黏膜的保健功能。
- 4.4.1.3 原则上宠物试食试验应在动物功能学实验有效的前提下进行。
- 4.4.1.4 根据试食试验设计要求、受试样品的性质、期限等，选择一定数量的受试者。试食试验报告中试食组和对照组的有效例数不少于 50 例，且试验的脱离率一般不得超过 20%。
- 4.4.1.5 开始试食前要根据受试样品性质，估计试食后可能产生的反应，并提出相应的处理措施。

4.4.2 受试宠物的要求

- 4.4.2.1 选择受试者应根据所需判定功能的要求进行选择。
- 4.4.2.2 受试者应当符合纳入标准和排除标准要求，以排除可能干扰试验目的的各种因素。
- 4.4.2.3 在受试者身上采集各种生物样本应详细记录采集样本的种类、数量、次数、采集方法和采集日期。
- 4.4.2.4 纳入标准：一个月内未患过胃肠疾病者；一个月内未服用过抗生素者；受试对象为具有肠黏膜损伤症状的宠物（腹泻、腹胀、腹痛和不规律的排便、恶臭便、便血以及食欲不振等）。
- 4.4.2.5 排除标准：老龄犬猫、妊娠或哺乳期犬猫；合并有心、肝、肾和造血系统等严重疾病者；短期内服用与受试功能有关的物品，影响结果判断者；未能按标准服用受试样品，资料不全影响功效判断者。

5 动物实验

肠黏膜监测主要包括肠黏膜通透性监测、血浆内毒素含量测定、细菌移位等。肠黏膜通透性监测是反映肠黏膜屏障功能的重要指标。

肠道评分是一种通过评估肠道健康状态的方式，可以通过多种因素对肠道功能、菌群、黏膜屏障等进行评估。肠道评分标准通常包括肠道症状、粪便特征、肠道菌群、肠道黏膜屏障等指标。

5.1 动物实验

5.1.1 实验动物

推荐用近交系小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

5.1.2 剂量分组及受试样品给予

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30d，必要时可以延长至45d。

5.1.3 肠道粘膜损伤动物模型

5.1.3.1 原理

葡聚糖硫酸钠（Dextran Sulfate Sodium Salt, DSS）诱导建模法。DSS 是一种聚阴离子衍生物，可诱导结肠炎性粘膜损伤模型，虽然 DSS 诱导结肠炎模型的机制虽仍未十分明确，但通常认为与巨噬细胞功能失调、肠道菌群失调、DSS 对结肠上皮的毒性作用、细胞因子在 DSS 结肠炎性粘膜损伤模型的发病中起重要作用（肿瘤坏死因子、白介素、干扰素、IL-10 和 IL-12）等机制有关。也就说明，该模型引起肠粘膜的机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障功能均会产生影响，是目前肠炎造模研究领域金标准。

5.1.3.2 急性结肠炎粘膜损伤模型

选取成年小鼠正常饲养 1-2 周，饮水中加入 2%-5% DSS，自由饮水 5-7d，观察症状体征，7d 后处死动物用于分析检测。

5.1.3.3 慢性结肠炎粘膜损伤模型

选取成年小鼠正常饲养 1-2 周，饮水中加入 2%-3% DSS，自由饮水 5-7d，观察症状体征，停止饮用含有 DSS 水，改为正常饮水 7-14d 后，再用含 2%-3% DSS 的水饲喂 5-7d，观察症状体征，停止饮用含有 DSS 水，改为正常饮水 7-14d 后，处死动物用于分析检测。

5.1.3.4 DSS 肠炎造模的观察指标和方法

主要包括 a. 疾病活动指数（DAI，表 1）的评估：包括体重，大便性状和血便。b. 组织学损伤指数（HI）的评估：观察结肠内有无出血，溃疡等。取一小块组织常规石蜡包埋、切片、HE 染色，观察组织学改变并进行评分；c. 病理切片，HE 染色观察。

表 1 DAI 评分标准

体重下降（%）	大便性状*	大便隐血/肉眼血便	记分
0	正常	正常	0
1-5	松散	隐血阳性	1
5-10	稀便	肉眼血便	2
10-15			3
>15			4

*正常大便：成型大便；松散大便：不黏附于肛门的糊状、半成形大便；稀便：可黏附于肛门的稀水样便。

5.2 分析测定指标

5.2.1 体征指标

5.2.1.1 体重

给与受试样品前和后每周称量体重，直至实验结束，并做好记录。

5.2.1.2 DAI 评分

各组实验动物的 DAI 评分方法见表 1。

5.2.2 组织学观察

5.2.2.1 组织学损伤指数（HI）的评估

观察结肠内有无出血，溃疡等。取一小块组织常规石蜡包埋、切片、HE 染色，观察组织学改变。

5.2.2.2 病理形态

采用 HE 染色观察有无病理学改变。

5.2.3 肠黏膜物理/机械屏障功能分析

肠道黏膜具有一定的选择性渗透性,可以允许有益物质进入体内,同时阻止有害物质的通过。但是,当肠道通透性增加时,有害物质、细菌等可能会通过肠道壁,引发炎症和其他健康问题。肠黏膜的通透性增高是肠黏膜物理屏障功能受损害的一个重要指标。常用的检测肠黏膜通透性的血液生化指标包括D-乳酸、二胺氧化酶(DAO)、细菌内毒素(ET)。

5.2.3.1 D-乳酸检测

原理: D-乳酸是肠内细菌的代谢产物,当机体严重创伤或感染后肠黏膜缺血、缺氧致肠黏膜顶部上皮脱落,肠黏膜通透性增高,大量D-乳酸进入血流,而哺乳动物不具有将其分解的酶系统,故血浆D-乳酸水平可显著升高。因此,测定血中D-乳酸含量可反映肠黏膜缺血程度和肠通透性的改变。

采用酶催化法,用血液自动分析仪。酶催化法测定血液乳酸含量。原理是在NAD存在时,乳酸脱氢酶催化乳酸氧化成丙酮酸,同时生成NADH。加入胍或氨基脒与丙酮酸生成复合物,使丙酮酸不断从反应体系中减少,促使反应向右进行。在紫外可见分光光度计波长340nm处监测吸光度的升高速率,计算乳酸含量。在测量血液乳酸含量时,应选择肝素-氟化钠作为抗凝剂,尽快分离出血浆。避免选择草酸钾/氟化钠作为抗凝剂,因为草酸钾对乳酸脱氢酶有一定的抑制作用;采血前应空腹,使血中乳酸浓度达到稳定。

5.2.3.2 二胺氧化酶(DAO)检测

原理: DAO是存在于哺乳动物小肠的黏膜或纤毛上皮细胞中催化二胺的细胞内酶,能够催化多胺氧化生成醛,并可通过调节细胞内的离子平衡、影响传导通路、促进细胞修复等,对肠黏膜起保护作用。当肠黏膜细胞受损、坏死后DAO即释放入血,致血中活性升高。血DAO水平可作为反映肠道机械屏障的完整性和受损伤程度的重要指标,可评估肠黏膜损伤和修复程度。

比色法测定DAO含量。DAO催化尸胺产生醛和过氧化氢,外源添加过量的辣根过氧化物酶,催化过氧化氢氧化邻联茴香胺生成有色物质,在500nm处有特征吸收峰,通过测定该波长吸光度增加速率,计算DAO活性。(可用检测试剂盒的方法进行)。

5.2.3.3 细菌内毒素(ET)

原理: 肠道内存在大量的G-杆菌,能产生大量的内毒素,当肠黏膜通透性增加,肠屏障功能破坏,内毒素入血,导致内毒素血症。故血浆内毒素水平也可反映肠道黏膜屏障功能情况,评估细菌易位,可作为辅助检测指标。细菌脂多糖的测定是监测细菌内毒素的直接指标。

细菌内毒素脂多糖测定: 脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分,对宿主有毒性。脂多糖只有当细菌死亡溶解或用人工方法破坏菌细胞后才释放出来,所以叫做内毒素。其毒性成分主要为类脂质A。血液肝素抗凝,使用脂多糖检测试剂盒(光度法)方法测定。

5.2.4 肠黏膜化学屏障功能分析

5.2.4.1 黏蛋白2(MUC2)测定

小鼠结肠黏膜中MUC2含量采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。

5.2.4.2 短链脂肪酸(SCFAs)含量测定

肠黏膜化学屏障物质主要是肠道菌群的代谢产物,如短链脂肪酸、脂多糖等。当肠道菌群的代谢产物出现异常时,可能会影响肠道蠕动和收缩力。其中,短链脂肪酸的含量作为肠黏膜化学屏障功能分析的主要指标。短链脂肪酸(SCFAs)是指链长为1-6个碳原子的脂肪酸,主要包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸。SCFAs是由未消化的膳食纤维、蛋白质及碳水化合物经肠道微生物代谢生成,其中乙酸、丙酸、丁酸约占总量90%以上。SCFAs的检测方法采用气相色谱法(GC)或气相色谱法与质谱联用(GC-MS)。

5.2.4.2.1 气相色谱法(GC)

将 60 mg 粪便与 1.5 mL 磷酸盐缓冲液混合均匀,加入 0.1 mL 磷酸溶液,冰浴中涡旋使其充分溶解,12000r/min 离心 10min,取上清液,用气相色谱 (GC) 检测 SCFAs 含量,参数如下:色谱柱为 DB-FFAP 毛细管柱 (30mm×250 μm×0.25 μm),柱箱温度 60℃,前进样口温度 250℃,压力 15psi,流速 27mL/min 隔垫吹扫流量 3.0mL/min,前检测器 FID 检测器,温度 280℃,燃气流量 29mL/min,进样量 1 μL。甲酸、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸为标准品,根据浓度和峰面积绘制标准曲线,计算样品的 SCFAs 含量。

5.2.4.2.2 气相色谱法与质谱联用 (GC-MS)

取适量样品加入 2 mL 磷酸溶液 (V (磷酸):V (去离子水)=1:3),涡旋均浆 2 min,加入 2 mL 乙醚萃取 10 min,4 000 r/min 低温离心 20 min;离心后取出乙醚相,再加入 2 mL 乙醚萃取,4 000 r/min 低温离心 10 min,离心后再次取出乙醚相,将两次萃取液合并挥发定容至 2 mL,进样进行气相色谱-质谱分析。色谱条件:色谱柱为 HP-INNOWAX 色谱柱 (25 m×0.20 mm, 0.40 μm);柱温为初温 100 °C 保持 5 min,以 5 °C/min 升至 150 °C,再以 30 °C/min 升至 240 °C,保持 30 min;进样口温度为 240 °C;载气流速为 1.0 mL/min;不分流。质谱条件:电子轰击离子源;离子源温度为 200 °C;传输线温度为 250 °C;轰击电压为 70 eV;单离子扫描模式为定量离子 60、73。短链脂肪酸的含量按下式计算。

$$\omega = (\rho \times V \times N) / (m \times M)$$

式中:ω 为试样中短链脂肪酸的含量/(mmol/g);ρ 为试样测定液中短链脂肪酸的质量浓度/(mg/L);V 为定容体积/mL;N 为稀释倍数;m 为试样的质量/g;M 为摩尔质量/(g/mol)。

5.2.5 肠黏膜免疫屏障功能分析

免疫球蛋白 sIgA 和肠黏膜炎症因子 (IL-4、IL-5、IFN-γ、IL-6、IL-1β 等) 水平测定均采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测定。取出目的肠道组织,在冰冷的 PBS 中纵向剪开,小心洗去腔内的消化液,在平板纸上吸去多余液体;10 mL 圆底离心管中加入 1~2 mL 组织裂解液和漂洗后的肠组织,在冰浴状态下匀浆 30s;冰上孵育 10 min,全部转移 1.5 mL EP 管中,4 °C、12000 r/min 离心 15 min;小心分离上清,使用 BCA 法测定蛋白浓度;测定浓度后的上清分装后 -80℃ 保存或冰上等待,立刻用于 ELISA 检测。

5.2.6 肠道菌群结构分析

无菌采取小鼠结肠内容物或者粪便 1.0g,抽提其菌群 DNA,采用 16S rRNA 高通量测序法检测肠道菌群。针对编码 16S rRNA 的 DNA 序列进行扩增测序,可以对微生物群落的组成和结构进行分析。

a. 对肠道菌群 OUT 主成分分析。获得 OTU Rank 曲线是一种展现样品中物种多样性的形式,可同时反映样品多样性的丰富度和均匀度。

b. α-多样性分析。一种用来反映微生物群落多样性和丰度的指标。

c. 菌群结构分析。分别在门的分类水平上、在属水平的菌群丰度,进行分析,采用 LEfSe 分析不同物种在各个分类水平上的差异,根据 LDA 评分鉴定生物标志分类群。

d. 微生物功能预测。根据 Tax4 Fun 预测,受试犬猫肠道微生物群与代谢、遗传信息处理和环境信息处理相关的功能。

6 宠物试食试验

根据受试样品的性质和改善宠物肠黏膜作用确定观察的指标,应包括一般指标和功效性指标。

6.1 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。接受试者的菌群状况随机分为试食和对照组,尽可能考虑影响结果

的主要因素如年龄、性别、饮食因素等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 15 例。

6.2 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 14 天，必要时可以延长至 30 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

6.3 一般指标

在受试期间应取得下列资料：

6.3.1 一般状况

包括精神、睡眠、饮食、大小便等。

6.3.2 血、尿、便常规检查

6.3.3 肝、肾功能检查

6.3.4 常规的血液学指标

包括血红蛋白、红细胞和白细胞计数，必要时做白细胞分类。

6.3.5 常规生化指标

包括转氨酶、血清总蛋白、白蛋白，尿素、肌酐、血脂、血糖等。

6.4 功效性指标

6.4.1 粪便评分

每日记录受试者试食前后排便情况，并按照表 2 对粪便评分。评分标准系统中，3 分为最理想的状态。在此基础上，分数越大，粪便中含水量越低，结合其他症状。可以怀疑肠胃蠕动功能减弱，大便在肠道中停留时间过长，再加上动物饮水量不够，就会出现大便干硬，严重的可能会出现肠梗阻和肠坏死等。分数越低，粪便中含水量越多，结合临床症状，可以怀疑出现胃肠道疾病、急性或慢性胃炎、过敏等。某些急性传染病，如犬细小病毒感染、犬瘟，均会出现 5 分的粪便。

表 2 粪便等级评分标准

分值	粪便形态
5	含水量极低，干燥、易碎，呈块状
4	粪便表面有清晰可见的纹路和干裂，容易拾起，基本不在地面有残留
3	粪便潮湿，呈圆柱状，从地面捡起时会有残留
2	粪便湿度较大，但不是完全呈液态。不易拾起，有些时候还会在宠物肛周粘连
1	完全的液态粪便

6.4.2 机械屏障功能分析

血液中 D-乳酸、二胺氧化酶（DAO）、细菌内毒素含量测定。抽取受试宠物空腹状态下静脉血 3mL。方法同 5.2.3

6.4.3 短链脂肪酸（SCFAs）含量测定

参见 5.2.4。

6.4.4 生物屏障功能分析

肠道菌群 16S rRNA 高通量测序。针对编码 16S rRNA 的 DNA 序列进行扩增测序，可以对微生物群落的组成和结构进行分析。无菌采取受试者粪便 1.0g，抽提其菌群 DNA，采用 16S rDNA 高通量测序法检测肠道菌群。

- 对肠道菌群 OUT 主成分分析。获得 OTU Rank 曲线是一种展现样品中物种多样性的形式，可同时反映样品多样性的丰富度和均匀度。
- α -多样性分析。一种用来反映微生物群落多样性和丰度的指标。
- 菌群结构分析。分别在门的分类水平上、在属水平的菌群丰度，进行分析，采用 LEfSe 分析不同物种在各个分类水平上的差异，根据 LDA 评分鉴定生物标志分类群。
- 微生物功能预测。根据 Tax4 Fun 预测，受试犬猫肠道微生物群与代谢、遗传信息处理和环境信息处理相关的功能。

7 数据处理与结果判定

7.1 数据处理

所有实验数据均应使用国家法定剂量单位。

使用数理统计软件进行统计分析，计算总实验重复数内的平均值，所有数据以平均值±标准方差表示。一般采用方差分析，但需先进行方差齐性检验，方差齐，则计算 F 值。若 F 值 $< F_{0.05}$ ，结论为各组均数间差异无显著性；若 F 值 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），结论为各组均数间差异有显著性，需进一步使用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计分析。对非正态分布或方差不齐的数据需进行适当的变量转换，待满足正态分布或方差齐的要求后，用转换后的数据进行统计分析；若经变量转换仍不能达到正态分布或方差齐的目的，则改用秩和检验进行统计分析。

比较试验组自身或试验组与对照组之间的差异，差异有显著性（ $P < 0.05$ ），则实验结果阳性。

7.2 结果判定

7.2.1 动物实验结果判定

①机械/物理屏障功能指标中 D-乳酸、二胺氧化酶（DAO）、细菌内毒素（ET）三项有一项指标较模型对照组明显降低，且差异有显著性，可判定该受试样品具有一定改善小鼠机械/物理屏障功能的作用。

②化学屏障功能指标中黏蛋白 2（MUC2）和短链脂肪酸（SCFAs）含量两项指标较模型对照组明显降低，且差异有显著性，可判定该受试样品具有一定改善小鼠化学屏障功能的作用。

③免疫屏障功能指标中免疫球蛋白 sIgA 较模型对照组明显降低，且差异有显著性；肠黏膜炎症因子中有一项指标较模型对照组明显降低，且差异有显著性。可判定该受试样品具有一定改善小鼠免疫屏障功能的作用。

④生物屏障功能指标中，肠道菌群多样性（有益菌群）较模型对照组明显增加，且差异有显著性，可判定该受试样品具有一定改善小鼠生物屏障功能的作用。

四项功能指标中，有两项为阳性，即可判定受试样品具有改善小鼠肠黏膜功能。

7.2.2 犬猫试食实验结果判定

①机械/物理屏障功能指标中 D-乳酸、二胺氧化酶（DAO）、细菌内毒素（ET）三项有一项指标较模型对照组明显降低，且差异有显著性，可判定该受试样品具有一定改善犬猫机械/物理屏障功能的作用。

②化学屏障功能指标中短链脂肪酸（SCFAs）含量较模型对照组明显降低，且差异有显著性，可判定该受试样品具有一定改善犬猫化学屏障功能的作用。

③免疫屏障功能指标血液炎症因子中有一项指标较模型对照组明显降低，且差异有显著性。可判定该受试样品具有一定改善犬猫免疫屏障功能的作用。

④生物屏障功能指标中，肠道菌群多样性（有益菌群）较模型对照组明显增加，且差异有显著性，可判定该受试样品具有一定改善小鼠生物屏障功能的作用。

比较试验组自身或试验组与对照组之间的差异，差异有显著性（ $P < 0.05$ ），则实验结果阳性。四项功能指标中，有两项为阳性，即可判定受试样品具有改善犬猫肠黏膜功能。

8 实验报告

实验报告应提供试验获得的所有内容、数据及可视化信息。未纳入统计分析的数据或由于数据缺乏、丢失等无法评价的情况也应报告，并说明在各组别中的平均值及误差。所有试验样品必须留样保存，宠物饲料（食品）留样 $\geq 500\text{g}$ ，宠物日化用品留样 $\geq 50\text{mL}$ 。

实验报告正文至少应包括：

- a. 实验名称；
- b. 实验目的；
- c. 实验材料，至少包括实验用品、受试样品及处理方法、受试动物（包括宠物）要求；
- d. 实验方法，测试指标和方法；
- e. 结果与分析，根据数据统计结果给出平均值和标准方差、误差值及决定系数，并以可视化的数据或图和表形式体现。
- f. 结论，针对受试样品的实验结果给出判定。

此外，试验过程中涉及的所有原始数据和相关可视化图表均要存档。

参考文献

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB14925 实验动物 环境及设施
GB19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 27476.1 检测实验室安全第1部分:总则
GB/T 31190 实验室废弃化学品收集技术规范
GB/T 35507 生化用试剂测定通则
GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求
GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南
GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
GB 13432 预包装特殊膳食用食品标签通则
GB 16740 保健（功能）食品通用标准
GB 26687 食品安全国家标准 复配食品添加剂通则
GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则
GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差。
SN/T 3509 实验室样品管理指南
SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南
SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求
《宠物饲料标签规定》，农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》
保健食品功能检验与评价技术指导原则（2023年版）
保健食品功能检验与评价方法（2023年版）
