

T/CVDA

团体标准

T/CVDA XXXXX—2025

有助于增强宠物免疫力产品有效性评价技 术标准

Technical standards for evaluating the effectiveness of products that enhance pet
immunity

（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

目 录..... 1

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 宠物..... 3

 3.2 免疫[力]..... 3

 3.3 受试样品..... 3

 3.4 试食宠物..... 4

 3.5 宠物试食试验..... 4

4 实验要求..... 4

 4.1 受试样品及处理要求..... 4

 4.2 受试样品给予的要求..... 4

5 动物实验..... 4

 5.1 实验动物与组别设置..... 4

 5.2 细胞免疫功能-迟发型超敏反应..... 5

 5.3 体液免疫功能-血清溶血素水平测定..... 5

 5.4 单核—巨噬细胞功能测定..... 7

 5.5 NK 细胞活性测定..... 9

6 犬猫试食试验..... 10

 6.1 试食宠物要求..... 10

 6.2 组别设置要求..... 10

 6.3 分析测定指标和方法..... 10

7 数据处理与结果判定..... 11

 7.1 数据处理..... 11

 7.2 结果判定..... 11

8 实验报告..... 12

参考文献..... 13

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。

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、青岛市华测检测技术有限公司、芜湖卫仕生物科技有限公司、东西志览国际文化发展无锡有限公司。

本文件主要起草人：马海乐、段玉清、李云亮、严子华、许丽、刘淑琴、宋亮亮。

1 范围

本标准规定增强宠物免疫力产品的术语和定义，并规范增强宠物免疫力产品有效性评价技术标准，包括实验要求（受试样品及处理要求、组别设置要求、受试样品给与要求）、分析测试指标和方法、数据处理与结果判定、实验报告。

本标准适用于声称具有增强宠物免疫力的宠物饲料（宠物食品）、保健产品、宠物零食、饲料原料及添加剂等的有效性评价。

本标准适用于以宠物品种为犬、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；凡未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 13078-2017 饲料卫生标准

GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差

GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行

GB 10648-2013/XG1-2020 《饲料标签》国家标准第1号修改单

T/SNHFA 008—2020 基于斑马鱼模型的保健食品有助于增强免疫力功能快速评价方法

SN/T 2497.7-2010 第7部分：小鼠耳肿胀试验

SN/T 2497.9-2010 第9部分：血清溶血素测定试验

SN/T 2497.10-2010 第10部分：T淋巴细胞增殖功能测定试验

SN/T 2497.24-2010 第24部分：细胞免疫功能体外检测方法

SN/T 2497.25-2010 第25部分：体液的免疫功能试验

SN/T 2497.26-2010 第26部分：巨噬细胞功能试验

DB21/T 2356-2014 饲料和饲料添加剂使用监督规范

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）

农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》

中华人民共和国农业部公告第1224号《饲料添加剂安全使用规范》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 宠物 pet

家庭豢养并宠爱的动物。主要指作为伴侣动物的犬和猫。

3.2 免疫[力] immunity

机体抵抗感染的能力。

3.3 受试样品 feeding trial products

指用于宠物试食试验的产品。

3.4 受试宠物 trial feeding pets

符合试验要求及动物伦理的前提下，试吃受试产品后用以评价增强宠物免疫力产品有效性的宠物。

3.5 宠物试食试验 pet feeding trial

通过宠物试食用以评价产品的性能/功能的试验。

4 实验要求

4.1 受试样品及处理要求

4.1.1 受试样品要求

4.1.1.1 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。

4.1.1.2 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。

4.1.1.3 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。

4.1.1.4 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。

4.2 受试样品给予的要求

4.2.1 给予受试样品剂量的要求

4.2.1.1 受试样品剂量选择应合理，尽可能找出最低有效剂量。

4.2.1.2 受试样品的功能实验剂量必须在毒理学评价确定的安全剂量范围之内。

4.2.2 受试样品给予方式、剂量和时间的要求

4.2.2.1 受试样品给予方式，经口给予受试样品或者拌粮服用。

4.2.2.2 给予受试样品宠物试食的时间应根据具体实验结果而定，原则上为 30 天~2 个月，一般不低于 30 天。

5 动物实验

实验动物可采用正常或免疫功能低下的模型动物进行实验。在动物实验中所列的指标包括体重、脏器/体重比值（胸腺/体重比值，脾脏/体重比值）、细胞免疫功能（迟发型变态反应实验）、体液免疫功能（抗体生成细胞检测、血清溶血素测定）、单核—巨噬细胞功能测定（小鼠碳廓清实验，小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验）、NK 细胞活性，上述指标均为必做项目。

5.1 实验动物与组别设置

5.1.1 实验动物

推荐用近交系小鼠，18~22 g，单一性别，每组 10~15 只。

5.1.2 组别设置

应设试验组和阴性对照组，必要时可设阳性对照组或空白对照组。以载体和功效成分（或原料）组成的受试样品，当载体本身可能具有相同功能时，在实验中应将该载体作为对照。试验组应设低、中、

高三个剂量组。

5.2 细胞免疫功能-迟发型超敏反应

迟发型超敏反应 (delayed type hypersensitivity, DTH), 是由特异性致敏效应 T 细胞介导的细胞免疫应答的一种类型。该型反应均在接触抗原 24~48 小时出现高峰反应。通过该实验可反映机体细胞免疫应答能力。下列方法可任选其一。

5.2.1 二硝基氟苯诱导小鼠耳廓肿胀法

二硝基氟苯 (DNFB) 稀释液可与腹壁皮肤蛋白结合成完全抗原, 由此刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞。4~7 天后再将其涂抹于外耳廓进行抗原攻击, 使局部肿胀, 一般在抗原攻击后 24~48h 达高峰, 其肿胀程度可以反映迟发型变态反应程度。

5.2.1.1 实验材料, DNFB、丙酮、麻油、硫化钡、打孔器。

5.2.1.2 试剂配制, DNFB 溶液, 应新鲜配制, 称取 DNFB 50mg, 置清洁干燥小瓶中, 将预先配好的 5mL 丙酮麻油溶液 (丙酮:麻油体积比=1:1), 倒入小瓶, 盖好瓶塞并用胶布密封。混匀后, 用 250 μ L 注射器通过瓶盖取用。操作时应避免 DNFB 与皮肤接触。

5.2.1.3 致敏, 将每只小鼠腹部皮肤用硫化钡脱毛或剃毛 (3cm \times 3cm), 用 DNFB 溶液 50 μ L 均匀涂抹致敏。

5.2.1.4 DTH 的产生与测定, 致敏 5 天后, 用 DNFB 溶液 10 μ L 均匀涂抹于小鼠右耳廓 (两面) 进行攻击。攻击后 24 小时颈椎脱臼处死小鼠, 剪下左右耳廓。用打孔器取下左右耳廓直径 8mm 的耳片, 称重。用左右耳重量之差表示 DTH 的程度。

5.2.1.5 注意事项, 操作时应避免 DNFB 与皮肤接触。

5.2.2 绵羊红细胞诱导小鼠足跖增厚法

绵羊红细胞 (SRBC) 可刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞, 4 天后, 当再以 SRBC 攻击时, 攻击部位出现肿胀, 其肿胀程度可反映迟发型变态反应程度。

5.2.2.1 实验材料, 游标卡尺 (精密度 0.02 mm)、SRBC、微量注射器 (50 μ L)。

5.2.2.2 致敏, 小鼠用 2% (v/v) SRBC 腹腔或静脉注射免疫, 每只鼠注射 0.2 mL (约 1×10^8 个 SRBC)。DTH 的产生与测定, 免疫后 4 天, 测量左后足跖部厚度, 然后在测量部位皮下注射 20% (v/v) SRBC, 每只鼠 20 μ L (约 1×10^8 个 SRBC), 注射后于 24 小时测量左后足跖部厚度, 同一部位测量三次, 取平均值。以攻击前后足跖厚度的差值来表示 DTH 的程度。

5.2.2.3 注意事项, 测量足跖厚度时, 最好由专人来进行。卡尺紧贴足跖部, 但不要加压, 否则会影响测量结果。攻击时所用的 SRBC 要新鲜 (4 $^{\circ}$ C 保存期不超过 1 周)。

5.3 体液免疫功能-血清溶血素水平测定

血清溶血素的测定可采用血凝法和半数溶血值 (HC_{50}) 测定法, 两种方法可任选其一。

5.3.1 血凝法

SRBC 免疫动物后, 产生抗 SRBC 抗体 (溶血素), 利用其凝集 SRBC 的程度来检测溶血素的水平。

5.3.1.1 仪器和材料, SRBC、生理盐水、微量血凝实验板、离心机。

5.3.1.2 SRBC 绵羊颈静脉取血, 将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中, 朝一个方向摇动, 以脱纤维, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用, 可保存 2 周。或者直接购买。

5.3.1.3 免疫动物及血清分离, 取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次离心 (2000 r/min) 10 min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2% (v/v) 的细胞悬液, 每只鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫。4~5 天后,

摘除眼球取血于离心管内，放置约 1 小时，将凝固血与管壁剥离，使血清充分析出，2000 r/min 离心 10 min，收集血清。

5.3.1.4 凝集反应，用生理盐水将血清倍比稀释，将不同稀释度的血清分别置于微量血凝实验板内，每孔 100 μ L，再加入 100 μ L 0.5 % (v/v) 的 SRBC 悬液，混匀，装入湿润的平盘内加盖，于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 3 小时，观察血球凝集程度。血清凝集程度一般分为 5 级（0—IV）记录，按下式计算抗体积数。

$$\text{抗体水平} = (S_1 + 2S_2 + 3S_3 + \cdots + nS_n)$$

式中 1、2、3……n 代表对倍稀释的指数；S 代表凝集程度的级别（见表 1），抗体积数越大，表示血清抗体越高。

表 1 血清凝集程度分级

级别（S）	具体描述
0	红细胞全部下沉，集中在孔底部形成致密的圆点状，四周液体清晰
I	红细胞大部分沉集在孔底成园点状，四周有少量凝集的红细胞
II	凝集的红细胞在孔底形成薄层，中心可以明显见到一个疏松的红点
III	凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层，中心隐约可见一个小红点
IV	凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层，凝块有时成卷折状

5.3.1.5 注意事项，血清稀释时要充分混匀，最后一个稀释度应不出现凝集现象。

5.3.2 半数溶血值（HC₅₀）的测定

用 SRBC 免疫动物后，血清中出现 SRBC 抗体（溶血素），在补体参与下，与 SRBC 一起孵育，可发生溶血反应，释放血红蛋白，通过测定血红蛋白含量反映动物血清中溶血素的含量。

5.3.2.1 仪器和材料 721 分光光度计、离心机、恒温水浴、SRBC、补体（豚鼠血清）、SA 缓冲液（用于免疫毒理实验中血清等样品稀释的试剂）、都氏试剂（碳酸氢钠 1.0 g、高铁氰化钾 0.2 g、氰化钾 0.05g，加蒸馏水至 1000 mL）。

5.3.2.2 试剂配制，①SA 缓冲液，5 倍 SA 母液配方：巴比妥酸 2.3 g、氯化镁（MgCl₂·6H₂O）0.5 g、氯化钙（CaCl₂·2H₂O）1.0 g、氯化钠 41.9 g、碳酸氢钠 1.26 g、巴比妥钠 1.5 g 按顺序依次在双蒸水中加热溶解，冷却后，双蒸水定容至 1000 mL，4 $^{\circ}$ C 备用。②都氏试剂，碳酸氢钠 1.0 g、高铁氰化钾 0.2 g、氰化钾 0.05 g，加蒸馏水至 1000 mL。

5.3.2.3 SRBC 绵羊颈静脉取血，将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中朝一个方向摇动，以脱纤维，放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用，可保存 2 周。

5.3.2.4 制备补体，采集豚鼠血，分离出血清（至少 5 只豚鼠的混合血清），将 1 mL 压积 SRBC 加入到 5mL 豚鼠血清中，放 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 min，经常振荡，离心取上清，分装，-70 $^{\circ}$ C 保存。用时以 SA 液按体积比 1:8 稀释。

5.3.2.5 免疫动物及血清分离，取羊血，用生理盐水洗涤 3 次，每次离心（2000 r/min）10 min。将压积 SRBC 用生理盐水配成 2 % (v/v) 的细胞悬液，每只鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫。4~5 天后，摘除眼球取血于离心管内，放置约 1 小时，使血清充分析出，2000 r/min 离心 10 min，或 6000 r/min，4 min，收集血清。

5.3.2.6 溶血反应测定，取血清用 SA 缓冲液稀释（一般为 200~500 倍）。将稀释后的血清 1mL 置试管内，依次加入 10 % (v/v) SRBC 0.5 mL，补体 1 mL（用 SA 液按体积比 1:8 稀释）。另设不加血清的对照管（以 SA 缓冲液代替）。置 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 15~30min 后，冰浴种终止反应。2000 r/min 离心 10 min。取上清液 1mL，加都氏试剂 3 mL，同时取 10 % (v/v) SRBC 0.25 mL 加都氏试

剂至 4 mL，充分混匀，放置 10 min 后，于 540 nm 处以对照管作空白，分别测定各管吸光度值。溶血素的量以半数溶血值（ HC_{50} ）表示，按下列公式计算：

$$HC_{50} = \frac{\text{样品 OD}}{\text{SRBC 半数溶血时的 OD}} \times \text{稀释倍数}$$

5.4 单核—巨噬细胞功能测定

5.4.1 小鼠碳廓清实验

在一定范围内，体内碳颗粒被清除速率与血碳浓度呈指数关系。以血碳浓度对数值为纵坐标，时间为横坐标，两者呈直线关系。此直线斜率（ K ）可表示吞噬速率。动物肝、脾重量影响吞噬速率，一般以校正吞噬指数 a 表示。

5.4.1.1 仪器和试剂，分光光度计、计时器、血色素吸管、印度墨汁、 Na_2CO_3

5.4.1.2 溶液配制，注射用墨汁，将印度墨汁原液用生理盐水稀释 3~4 倍。 Na_2CO_3 溶液取 0.1 g Na_2CO_3 ，加蒸馏水至 100 mL。

5.4.1.3 注射墨汁，按体重从小鼠尾静脉注入稀释的印度墨汁（10 mL/kg），待墨汁注入，立即计时。

5.4.1.4 测定，注入墨汁后 2 min、10 min，分别从内眦静脉丛取血 20 μ L，并立即将其加到 2 mL 0.1 % Na_2CO_3 溶液中。于分光光度计 600 nm 波长处测定光密度值（OD），以 Na_2CO_3 溶液作空白对照。将小鼠处死，取肝脏和脾脏，用滤纸吸干脏器表面血污，分别称重。以吞噬指数 a 表示小鼠碳廓清的能力。按照下式计算吞噬指数：

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1}$$

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{K}$$

式中， K 为吞噬速率； a 为吞噬指数； OD_1 和 OD_2 分别为墨汁推进 t_1 （2 min）和 t_2 （10 min）时间的光密度值。

5.4.1.5 注意事项，静脉注入碳粒的量、取血时间、取血量一定要准确；墨汁放置中，碳粒可沉于瓶底，临用前应摇匀；使用新的墨汁时，应在实验前摸索一个最适墨汁注入量，即正常小鼠在 20min 内不易廓清。

5.4.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

滴片法和半体内法可任选其一评价小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力。

5.4.2.1 滴片法

利用巨噬细胞对光滑表面如玻璃表面具有粘附的特性，将含有巨噬细胞的腹腔液滴于载玻片上，加入鸡红细胞，孵育一定时间后，冲洗掉未粘附的细胞，固定染色，在显微镜下计数吞噬鸡红细胞的巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数，据此判定巨噬细胞的吞噬能力。

（1）仪器和材料，显微镜、37 $^{\circ}$ C 孵箱、计数器、手术器械一套、注射器、滴管、胶头吸管、吸耳球、载玻片、染色槽、试管

（2）玻片处理，重复使用的载玻片要经洗液浸泡、洗净晾干后，经酒精浸泡过夜。用前以纱布拭干或晾干，否则会影响巨噬细胞粘附和镜检。在玻片上标号，用 3 % 琼脂（配方见试剂部分）每个玻片上划两个圆圈（圆圈必须全封闭，否则液体会流出），晾干备用。

（3）搪瓷或塑料盒，内垫半湿纱布（用温水湿透，置于孵箱内备用），纱布一定要平整。

(4) 试剂配制方法, ①3 %琼脂的配制: 取琼脂 3 g, 加水 100 mL, 加热煮沸至透明, 加入 1 % 的溴甲酚紫指示剂 1~2 滴。② PBS 缓冲液的配制方法: KH_2PO_4 6.66 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.38 g, 将上述试剂溶于 1000 mL 蒸馏水中调 pH 值至 7.2 即成。③1 %鸡红细胞悬液: 实验前取鸡颈静脉或动脉血, 置于盛有玻璃珠 (20 个左右) 的三角瓶内, 连续顺一个方向充分摇动 5~10 min, 除去纤维蛋白, 4 °C 冰箱保存。实验前用生理盐水洗涤 3 次, 1500 r/min, 离心 10 min, 弃去上清, 按血球压积用 Hank's 液配制成 1 %的红细胞悬液。④Giemsa 染液: a. 取 Giemsa 染料 0.5 g, 中性甘油 33 mL, 甲醇 33 mL。先将 Giemsa 染料置清洁研钵中, 加甘油后, 研磨片刻, 倒入棕色瓶内, 放置 55~60 °C 水浴箱内 2 小时, 不断摇匀, 再加入甲醇摇匀, 保存备用。b. 稀释姬姆萨氏染色液: 使用时, 用 pH 6.8 的缓冲液 8 份, 加姬姆萨氏染色液原液 1 份, 即成应用液。⑤Giemsa 染液脱色液: 配制方法: 甲醇 20 mL, 蒸馏水 80 mL。混合后加 2N HCl 2 滴即成。

(5) 实验步骤, ①小鼠巨噬细胞的激活: 实验前 4 天给每只小鼠腹腔注射 2 %压积羊红细胞 0.2 mL。用颈椎脱臼法处死小鼠, 腹腔注射加小牛血清的 Hank's 液 4 mL/只, 轻轻按揉腹部 20 次, 以充分洗出腹腔巨噬细胞, 然后将腹壁剪开一个小口, 用胶头吸管吸取腹腔洗液 2 mL 于试管内 (或用注射器)。用 1 mL 加样器吸取腹腔洗液 0.5 mL 加入盛有 0.5 mL 1 %鸡血红细胞悬液的试管内, 混匀。用注射器 (装大针头) 吸取 0.5 mL 混合液, 加入玻片的琼脂圈内。放置孵箱内 37 °C 孵育 15~20 分钟。孵育结束后迅速用生理盐水将未贴壁细胞冲掉, 于甲醇液中固定 1 分钟, Giemsa 液染色 15 分钟。用蒸馏水冲洗干净, 晾干, 用 40×显微镜计数巨噬细胞吞噬鸡红细胞的数目, 并计算吞噬率和吞噬指数。吞噬率为每 100 个巨噬细胞中, 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞所占的百分率; 吞噬指数为平均每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的个数。

$$\text{吞噬百分率}(\%) = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{100 \text{ 个巨噬细胞}} \times 100$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{100 \text{ 个巨噬细胞数}}$$

(6) 注意事项, 颈椎脱臼处死小鼠勿用力过大, 防止腹腔内血管和内脏破裂出血影响实验结果; 放滴片的搪瓷盘内应保持一定的湿度, 以防液体干燥; 孵育后的标本冲洗次数的差别不宜太大, 更不要直接冲在有细胞的部分; 实验操作过程中应严格掌握时间; 在镜下计数细胞时要数完一个视野后再换另一个视野。

5.4.2.2 半体内法

在体内腹腔巨噬细胞能吞噬鸡红细胞。据此判断巨噬细胞的吞噬功能。

(1) 仪器和材料 显微镜、鸡红细胞、丙酮、甲醇、生理盐水、Giemsa 染液。

(2) 试剂配制, 鸡红细胞悬液制备: 取鸡血置于有玻璃珠的锥形瓶中, 朝一个方向充分摇动, 以脱纤维。用生理盐水洗涤 2~3 次, 离心 (2000 r/min, 10 min), 去上清, 用生理盐水配成 20 % (v/v) 的鸡红细胞悬液。

(3) 吞噬功能测定, 每鼠腹腔注射 20 % 鸡红细胞悬液 1 mL。间隔 30 分钟~90 分钟, 颈椎脱臼处死动物, 将其仰位固定于鼠板上, 正中剪开腹壁皮肤, 经腹腔注入生理盐水 2 mL, 转动鼠板 1 min。然后吸出腹腔洗液 1 mL, 平均分滴于 2 片载玻片上, 放入垫有湿纱布的搪瓷盒内, 移置 37 °C 孵箱温育 30 min。孵毕, 于生理盐水中漂洗, 以除去未贴片细胞。晾干, 以体积比 1:1 的丙酮和甲醇溶液固定, 4 % (v/v) Giemsa-磷酸缓冲液染色 3 min, 再用蒸馏水漂洗晾干。油镜下计数巨噬细胞, 每张片计数 100 个, 按下式计算吞噬百分率和吞噬指数。在计数时, 应同时观察鸡红细胞被消化的程度。借以判定巨噬细胞吞噬与消化功能, 通常分为 4 级 (表 2)。

吞噬百分率(%) = $\frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100$

吞噬指数 = $\frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}}$

表 2 巨噬细胞吞噬与消化功能分级

级别	具体描述
I	未消化。被吞噬的鸡红细胞完整，胞质浅红或浅黄带绿色，胞核浅紫色。
II	轻度消化。胞质浅黄绿色、胞核固缩呈紫蓝色。
III	重度消化。胞质淡染，胞核淡浅灰色。
IV	完全消化。巨噬细胞内仅见形态类似鸡红细胞大小的空泡，边缘整齐，胞核隐约可见。

5.5 NK 细胞活性测定

NK 细胞是人体免疫系统的重要防线，能够直接杀伤被病毒感染的细胞和肿瘤细胞。检测 NK 细胞的活性，可以了解机体的天然免疫防御能力。采用乳酸脱氢酶（LDH）法，正常情况下，活细胞胞浆内的含有 LDH 不能透过细胞膜，当细胞受到 NK 细胞的杀伤后，LDH 释放到细胞外。LDH 可使乳酸锂脱氢，进而使 NAD 还原成 NADH，后者再经递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）还原碘硝基氯化四氮唑蓝（INT），INT 接受 H⁺ 被还原成紫红色甲臢类化合物。在酶标仪上用 490nm 比色测定。

5.5.1 仪器和材料

酶标仪、YAC-1 细胞、Hank’s 液（pH 7.2~7.4）、RPMI1640 完全培养液、乳酸锂或乳酸钠、碘硝基氯化四氮唑蓝（INT）、吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）、NAD、0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 8.2）、1 % NP40 或 2.5 % Triton。

5.5.2 基质液和细胞处理

- 5.5.2.1 LDH 基质液的配制 乳酸锂 5×10⁻² mol/L 碘硝基氯化四氮唑蓝（INT） 6.6×10⁻⁴ mol/L 吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS） 2.8×10⁻⁴ mol/L 氧化型辅酶 I（NAD） 1.3×10⁻³ mol/L 将上述试剂溶于 0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中（pH 8.2）。
- 5.5.2.2 靶细胞的传代（YAC-1 靶细胞） 实验前 24 小时将靶细胞进行传代培养。用前以 Hank’s 液洗 3 次，用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10⁵ 个/mL。
- 5.5.2.3 脾细胞悬液的制备（效应细胞） 无菌取脾，置于盛有适量无菌 Hank’s 液的小平皿中，用镊子轻轻将脾磨碎，制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤，或用 4 层纱布将脾磨碎，或用 Hank’s 液洗 2 次，每次离心 10 min（1000 r/min）。弃上清将细胞浆弹起，加入 0.5mL 灭菌水 20 秒，裂解红细胞后再加入 0.5 mL 2 倍 Hank’s 液及 8mL Hank’s 液，1000 r/min，10 min 离心；或采用 NH₄Cl-Tris 红细胞裂解液裂解红细胞，离心 10 min（1000 r/min），弃红色上清。用 1 mL 含 10 %小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬，用 1%冰醋酸稀释后计数，用台酚兰染色计数活细胞数（应在 95 %以上），最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 2×10⁷ 个/mL。

5.5.3 NK 细胞活性检测

取靶细胞和效应细胞各 100 μL（效靶比 50:1），加入 U 型 96 孔培养板中；靶细胞自然释放孔加靶细胞和 培养液各 100 μL，靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1 % NP40 或 2.5 % Triton 各 100 μL；

上述各项均设三个平行孔，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 小时，然后将 96 孔培养板以 1500 r/min 离心 5 min，每孔吸取上清 100 μL 置平底 96 孔培养板中，同时加入 LDH 基质液 100 μL，根据室温不同反应 3~10 min，每孔加入 1 mol/L 的 HCl 30 μL，在酶标仪 490nm 处测定光密度值（OD）。按下式计算 NK 细胞活性。

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{\text{反应孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}}{\text{最大释放孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}} \times 100$$

式中，NK 细胞活性（ p ，用小数表示）需进行数据转换， $X = \text{Sin}^{-1}\sqrt{p}$ ，然后再进行方差分析。

5.5.4 注意事项

靶细胞和效应细胞必须新鲜，细胞存活率应大于 95%；反应时环境温度应保持恒定；LDH 基质液应临用前配制；在一定范围内，NK 细胞活性与效靶比值成正比；一般效靶比值不应超过 100。

6 犬猫试食试验

宠物犬猫的试食试验以不损伤宠物为宗旨，开展相关指标测定。

6.1 试食宠物要求

试食宠物应该按照品种、遗传背景相同或相近，年龄和体重相近、健康程度一致性原则。试验前对试验宠物进行常规的免疫、驱虫处理。受试宠物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。

6.1.1 纳入标准

免疫系统尚未完全发育的幼年宠物；免疫系统功能逐渐下降的老年宠物；需更快恢复健康的患病或康复中的宠物；体弱多病的成年宠物；签注知情同意书的宠物；在研究开始前 1 个月不使用任何同类型产品或药物的宠物。

6.1.2 排除标准

同时参加其他临床研究的宠物；对受试产品及其成分有过敏史的宠物；由于身体原因不能遵照试验要求；由于医学原因不能达到评估时间内禁食或禁饮要求。

6.2 组别设置要求

应设试验组和阴性对照组，必要时可设阳性对照组或空白对照组。每组犬/猫不少于 25 只。以载体和功效成分（或原料）组成的受试样品，当载体本身可能具有相同功能时，在实验中应将该载体作为对照。

6.3 分析测定指标和方法

6.3.1 血常规检测

通过检测白细胞的数量和分类来评估宠物的细胞免疫功能状态。白细胞是人体免疫系统的重要组成部分。其中淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等的数量变化，能反映身体是否存在感染、过敏等情况，以及免疫系统的活跃程度。尤其外周血淋巴细胞计数可反映机体的细胞免疫功能状态，淋巴细胞减少可能提示免疫功能低下，增多可能与病毒感染等有关。

采用血液细胞分析仪法。试食试验前、后抽取各组宠物（禁食 12 小时）静脉血于抗凝剂的采血管中，混合均匀，按照试剂盒的方法进行测定。比较各组宠物试验前后白细胞及分类细胞数量。

6.3.2 免疫球蛋白测定

免疫球蛋白包括 IgG、IgA、IgM，检测免疫球蛋白的含量，可以了解体液免疫功能的状态。如 IgG 是人体内最主要的免疫球蛋白，其水平异常可能与多种疾病有关，包括感染、自身免疫性疾病、肿瘤等，IgG 是血清中免疫球蛋白的主要成分，约占血清免疫球蛋白总量的 75%。它具有抗菌、抗病毒感染、中和毒素及免疫调节的功能。

采用酶联免疫吸附试验（ELISA）测定。试食试验前、后抽取各组宠物（禁食 12 小时）静脉血于的采血管中，离心分离血清，按照试剂盒的方法进行测定。

6.3.3 免疫相关细胞因子检测

免疫相关细胞因子作为调节免疫反应的重要分子，主要由免疫细胞分泌释放。在机体的免疫应答、炎症反应以及细胞间的信号传递中扮演着不可或缺的角色。通过检测血清中的特定免疫相关蛋白来评估免疫功能的状态。常见的细胞因子包括：白细胞介素（如 IL-1、IL-6）、肿瘤坏死因子（如 TNF- α ）、干扰素（如 IFN- γ ）等。其中，IL-1 是一种重要的促炎细胞因子，主要由巨噬细胞、单核细胞等免疫细胞分泌。IL-6 是一种多功能细胞因子，既具有促炎作用，也能控制炎症。TNF- α 是一种强效的促炎细胞因子，主要由巨噬细胞和 T 细胞分泌，在免疫反应中起到关键作用，能够诱导细胞凋亡、促进炎症及增强免疫细胞的功能。干扰素- γ 是由 T 细胞和自然杀伤细胞分泌的一种细胞因子，主要参与抗细菌和抗肿瘤免疫反应。

采用酶联免疫吸附试验（ELISA）测定。试食试验前、后抽取各组宠物（禁食 12 小时）静脉血于采血管中，离心分离血清，按照试剂盒的方法进行测定。

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 \pm 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。

按医学统计方法，对试验组和对照组分别统计试验前、后口气值均数的变化或仪器读数均值变化情况，并比较两组之间各时间段变化。试验组与对照组比较，口气值均数应显著降低，并应具有统计学意义。

7.2 结果判定

7.2.1 动物实验结果判定

有助于增强免疫力判定：在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核—巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方 面任两个方面结果阳性，可判定该受试样品具有有助于增强免疫力作用。其中细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一个实验的两个剂量组结果阳性，可判定 细胞免疫功能测定结

果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定体液免疫功能测定结果阳性。单核—巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定单核—巨噬细胞功能结果阳性。NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性，可判定 NK 细胞活性结果阳性。

迟发型超敏反应：耳廓肿胀法，受试样品组的重量差值显著高于与对照组的重量差值，可判定该项实验结果阳性。足跖增厚度法，受试样品组的差值显著高于对照组的差值，可判定该项实验结果阳性。

血清溶血素含量测定：血凝法，受试样品组的抗体积数显著高于对照组的抗体水平，可判定该项实验结果阳性。半数溶血值（ HC_{50} ），受试样品组的 HC_{50} 显著高于对照组的 HC_{50} ，可判定该项实验结果阳性。

单核—巨噬细胞功能测定：小鼠碳廓清实验，受试样品组的吞噬指数显著高于对照组的吞噬指数，可判定该项实验结果阳性。小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验，滴片法和半体内法，均为受试样品组的吞噬百分率或吞噬指数与对照组比较，差异均有显著性，方可判定该项实验结果阳性。

受试样品组的 NK 细胞活性显著高于对照组的 NK 细胞活性，即可判定该项实验结果阳性。

7.2.2 宠物试食试验结果判定

有助于增强免疫力判定：在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核—巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方面任两个方面结果阳性，可判定该受试样品具有有助于增强免疫力作用。其中细胞免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定细胞免疫功能测定结果阳性。体液免疫功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定体液免疫功能测定结果阳性。单核—巨噬细胞功能测定项目中的两个实验结果均为阳性，或任一实验的两个剂量组结果阳性，可判定单核—巨噬细胞功能结果阳性。NK 细胞活性测定实验的一个以上剂量组结果阳性，可判定 NK 细胞活性结果阳性。

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 ≥ 500 g，液体样品留样量 ≥ 500 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 13078-2017 饲料卫生标准
- GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差
- GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行
- GB 10648-2013/XG1-2020 《饲料标签》国家标准第 1 号修改单
- SN/T 2497.7-2010 第 7 部分：小鼠耳肿胀试验
- SN/T 2497.9-2010 第 9 部分：血清溶血素测定试验
- SN/T 2497.10-2010 第 10 部分：T 淋巴细胞增殖功能测定试验
- SN/T 2497.24-2010 第 24 部分：细胞免疫功能体外检测方法
- SN/T 2497.25-2010 第 25 部分：体液的免疫功能试验
- SN/T 2497.26-2010 第 26 部分：巨噬细胞功能试验
- DB21/T 2356-2014 饲料和饲料添加剂使用监督规范
- T/SNHFA 008—2020 基于斑马鱼模型的保健食品有助于增强免疫力功能快速评价方法
- T/CAB 2001.4-2017 “绿色生物酵素 动物用 第 4 部分：毛皮宠物专用
- 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）
- 农业农村部第 20 号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》
- 中华人民共和国农业部公告第 1224 号《饲料添加剂安全使用规范》
-