附件7

**细菌回复突变试验技术指导原则**

**（征求意见稿）**

中国食品药品检定研究院

2023年4月

目 录

[一、概述 1](#_Toc127950793)

[二、基本原则 2](#_Toc127950794)

**[（一）试验管理](#_Toc127950795)** [2](#_Toc127950795)

**[（二）具体问题具体分析](#_Toc127950796)** [2](#_Toc127950796)

**[（三）随机、对照、重复](#_Toc127950797)** [2](#_Toc127950797)

[三、基本内容 3](#_Toc127950798)

**[（一）菌株](#_Toc127950799)** [3](#_Toc127950799)

**[（二）代谢活化系统](#_Toc127950801)** [3](#_Toc127950801)

**[（三）受试物的处理](#_Toc127950802)** [4](#_Toc127950802)

**[（四）溶剂的选择](#_Toc127950803)** [4](#_Toc127950803)

**[（五）最高浓度的确定](#_Toc127950804)** [5](#_Toc127950804)

**[（六）对照组的设置](#_Toc127950805)** [5](#_Toc127950805)

[四、试验结果分析与评价 6](#_Toc127950806)

**[（一）数据处理](#_Toc127950808)** [6](#_Toc127950808)

**[（二）结果评价](#_Toc127950809)** [6](#_Toc127950809)

**[（三）结果分析与解释](#_Toc127950810)** [7](#_Toc127950810)

[五、参考文献 7](#_Toc127950812)

[六、注释 8](#_Toc127950813)

细菌回复突变试验技术指导原则

一、概述

细菌回复突变试验又称Ames试验，是一项检测基因突变的体外致突变性试验，通过检测受试物对微生物（细菌）的基因突变（注释1）作用，预测其遗传毒性和潜在的致癌作用。

细菌回复突变试验利用鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌来检测点突变，涉及DNA的一个或几个碱基对的置换、插入或缺失（注释2）。鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的试验菌株分别为组氨酸缺陷突变型和色氨酸缺陷突变型，在无组氨酸或色氨酸的培养基上不能生长，在有组氨酸或色氨酸的培养基上才能正常生长。致突变物存在时可以回复突变为原养型，在无组氨酸或色氨酸的培养基上也可以生长。故可根据菌落形成数量来衡量受试物是否为致突变物。

某些致突变物需要代谢活化后才能使上述细菌产生回复突变，受试物要同时在有和没有代谢活化系统的条件下进行试验。

本指导原则依据《化妆品安全技术规范》《化妆品注册和备案检验工作规范》《化妆品注册备案资料管理规定》《化妆品新原料注册备案资料管理规定》等相关要求，并参考国内外相关指南制定。本指导原则适用于化妆品和化妆品新原料的研究及安全评估。

本指导原则是在现行法规和标准以及当前科学认知水平下制定的，随着法规和标准的更新完善，以及科学技术的发展，将适时进行调整。

二、基本原则

**（一）试验管理**

本指导原则所指的细菌回复突变试验属于化妆品安全性评价的毒理学研究，应在符合化妆品相关法规的前提下开展。

**（二）具体问题具体分析**

细菌回复突变试验的设计，应基于化妆品或化妆品原料自身特点、性质和使用情况，遵循“具体问题具体分析”的原则。根据受试物特点、现有数据、试验目的等选择合适的试验方法，设计适宜的试验方案，并结合其他毒理研究信息对试验结果进行全面的评价。

**（三）随机、对照、重复**

遗传毒性试验应符合毒理学试验随机、对照、重复的基本原则。

三、基本内容

**（一）****菌株**

细菌回复突变试验至少应采用5种菌株，包括用于检测组氨酸靶基因中鸟嘌呤-胞嘧啶（G-C）位点碱基置换或移码突变的4种组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌（TA98；TA100；TA1535；TA1537/TA97/ TA97a），以及用于检测组氨酸或色氨酸基因中腺嘌呤-胸腺嘧啶（A-T）位点碱基置换与检测交联剂的鼠伤寒沙门氏菌TA102或大肠杆菌WP2 uvrA或大肠杆菌WP2 uvrA（pKM101）。

新获得的或者长期保存的菌种，在试验前需要进行菌株的生物特性鉴定。鉴定的判断标准应满足《化妆品安全技术规范》的要求。

**（二）代谢活化系统**

一些具有致突变的物质需要代谢活化后才会引起细菌回复突变，因此细菌在加或不加代谢激活系统的情况下均应暴露于受试物。

最常用的代谢活化系统是用多氯联苯（PCB混合物）或用苯巴比妥和 β-萘黄酮组合处理的哺乳动物（大鼠）肝脏微粒体酶（S9）。S9在S9混合液中的浓度一般为5%～30%（v/v）。代谢活化系统的选择和条件取决于所测试化学物质的类别。在某些情况下，可能需要使用两种或两种以上浓度的S9；对于偶氮染料和重氮化合物，更适合使用还原性代谢活化系统。

**（三）受试物的处理**

受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映上市样品质量和安全性的样品。

在处理细菌之前，应将固体受试物溶解或悬浮在适当的溶剂或溶媒中，并在必要时进行稀释。液体受试物可以直接添加到测试系统中和/或在处理之前进行稀释。

受试物应新鲜配制，有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

对于化妆品终产品，应按照产品使用方法配制受试物，并明确配制方法和使用浓度。如为染发产品，应按照产品使用方法或产品使用说明书中各剂型的配制比例进行配制，如有多种配制比例，则需进行多个比例受试物的配制。配制后的受试物如需进一步稀释，则应选用合适的溶剂并设阴性对照。

对于化妆品新原料，应根据原料的溶解性选择适宜的溶剂进行配制或稀释，并设阴性对照。

**（四）溶剂的选择**

所用溶剂应不与受试物发生反应，对试验菌株毒性低且无致突变性。首选灭菌蒸馏水/去离子水，对于不溶于水的受试物可选择其他溶剂，常用的有二甲基亚砜（DMSO）、丙酮、95%乙醇。

**（五）最高浓度的确定**

细菌回复突变试验中受试物的最高浓度主要取决于受试物对细菌的毒性和溶解度。细菌自发回变数的减少，背景菌变得清晰或被处理的培养物细菌存活数减少都是毒性的标志。

对原料而言，一般最高剂量组可为5mg/皿或5µL/皿。对产品而言，有杀菌作用的受试物，最高剂量可为最低抑菌浓度，无杀菌作用的受试物，最高剂量可为原液。受试物至少应设四个剂量组。每个剂量均做三个平行平板。

用细菌回复突变试验检测某些受试物时，在不溶解的浓度范围内也能检测出剂量相关性的遗传毒性。建议采用以下方法检测相对不溶的受试物：

如果沉淀不干扰计数，应对产生沉淀的浓度进行计数，且最高浓度不超过5mg/皿或5µL/皿。当未观察到细菌毒性时，应以产生沉淀的最低浓度作为计数的最高浓度；当观察到剂量相关的细菌毒性或诱变性时，应按可能产生毒性时的要求来确定最高浓度。

对于初始实验，应至少使用五种不同的可分析浓度的测试物质，各测试点之间的间隔约为。在研究剂量-反应关系时，可以适当缩小测试点之间间隔。

**（六）对照组的设置**

试验应同时设阳性对照组、溶剂对照组和未处理（空白）对照组，包括加和不加S9两种情况。

阳性对照物要根据采用的菌株进行选择，并选择合适的剂量以保证每次试验的有效性。

一般选择已知的阳性诱变剂，如《化妆品安全技术规范》中收录的叠氮化钠、2-氨基蒽、敌克松、苯并（a）芘等。

四、试验结果分析与评价

**（一）数据处理**

应及时对受试物各剂量组、空白对照（自发回变）、溶剂对照以及阳性对照的每皿回变菌落数进行记录，并计算平均值和标准偏差。

**（二）结果评价**

根据统计分析结果，受试物经5个试验菌株测定后，只要有一个试验菌株，无论在加S9或未加S9条件下，符合下列情形之一的可判定受试物在本试验系统中具有致突变阳性：

（1）受试物TA1535、TA1537、WP2uvrA的回变菌落数在任一剂量条件下是溶剂对照回变菌落数的三倍或三倍以上并有可重复性；

（2）受试物TA97、TA97a、TA98、TA100、TA102、WP2uvrA（pKM101）的回变菌落数在任一剂量条件下是溶剂对照回变菌落数的二倍或二倍以上并有可重复性；

（3）受试物TA1535、TA1537、WP2uvrA的回变菌落数是溶剂对照回变菌落数的三倍或三倍以上并呈剂量-反应关系；

（4）受试物TA97、TA97a、TA98、TA100、TA102、WP2uvrA（pKM101）的回变菌落数是溶剂对照回变菌落数的二倍或二倍以上并呈剂量-反应关系。

如果受试物经五个试验菌株检测后，无论加S9和未加S9均为阴性，则可判定该受试物为致突变阴性。

**（三）****结果分析与解释**

试验结果的生物学相关性为首要考虑因素，试验结果的统计学意义不应作为评判阳性反应的唯一因素。细菌回复突变试验出现阳性结果，应考虑受试物的纯度，以确定阳性结果是否污染物所致。氨基酸（组氨酸或色氨酸）污染可能导致菌落数的升高而出现假阳性结果。

细菌回复突变试验阳性结果常出现在最低抑菌浓度和最高非抑菌浓度的范围内，因此当试验中出现可疑阳性时，应通过改变试验条件（如调整受试物或S9浓度，改变培养条件等），对可疑阳性的受试物进行重复试验，确保试验结果的可靠性和准确性。

当细菌回复突变试验对某类受试物的潜在致突变性不敏感时，体外哺乳动物细胞基因突变试验可作为很好的替代和补充。

五、参考文献

1.国家药品监督管理局.化妆品安全技术规范.2015.

2. OECD. Guideline for testing of chemicals No.471： Bacterial reverse mutation test. 2020.

3.国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.

4.中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安

全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193.4-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

六、注释

基因突变：在化学致突变物作用下细胞DNA中碱基对的排列顺序发生变化。

碱基置换突变：引起DNA链上一个或几个碱基对的置换。

移码突变：引起DNA链上增加或缺失一个或多个碱基对。

碱基置换：有转换(transition)和颠换(transversion)两种形式。转换是DNA链上的一个嘧啶被另一嘧啶所替代，或一个嘌呤被另一嘌呤所代替。颠换是DNA链上的一个嘧啶被另一嘌呤所替代，或一个嘌呤被另一嘧啶所代替。