

- [20] Klapproth J M, Scaletsky I C, McNamara B P, et al. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation[J]. *Infect Immun*, 2000, 68 (4) :2148 —2155.
- [21] Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α hemolysin family[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 117: 189 —196.
- [22] Bauer M E, Welch R A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Infect Immun*, 1996, 64(1) :167 —175.
- [23] Chart H, Jenkins C, Smith H R, et al. Haemolysin production by strains of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Microbiology*, 1998, 144:103 —107.
- [24] Law D, Kelly S. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga-like toxin producing *Escherichia coli* serogroups[J]. *Infect Immun*, 1995, 63 (2) : 700 —702.
- [25] Brunder W, Schmidt H, Karch H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Microbiology*, 1996, 142:3305 —3315.
- [26] Waterman S R, Small P L. Characterization of the acid resistance phenotype and *ipoS* alleles of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Infect Immun*, 1996, 64 (7) : 2808 —2811.
- [27] Brunder W, Schmidt H, Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V[J]. *Mol Microbiol*, 1997, 24(4) :767 —778.
- [28] Schmidt H, Henkel B, Karch H. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 148(2) :265 —272.
- [29] Lathem W W, Grys T E, Witowski S E, et al. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 45(2) :277 —288.
- [30] Paton A W, Paton J C. Reactivity of convalescent-phase hemolytic-uremic syndrome patient sera with the megaplasmid-encoded TagA protein of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* O157[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4) :1395 —1399.

[收稿日期:2004 - 01 - 08]

中图分类号:R15;R378.21 文献标识码:E 文章编号:1004 - 8456(2004)03 - 0000 - 00

益生菌的安全性

杨宝兰 徐 进

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:在食品生产中传统的益生菌有很长的安全使用历史,新的益生菌菌种也正在不断地开发。目前我国需要完善对这些新菌种进行系统的安全性评价的程序。益生菌对消费者安全方面的问题包括全身性感染、有害的代谢活性产物和耐药基因的转移三个方面。新的益生菌菌种在使用前应进行安全性评价。

关键词:有益菌种;安全;危险性评估

Safety of probiotics

Yang Baolan, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021)

Abstract: Traditional probiotics have a long history of safe use and most strains are considered having no pathogenic potential. There is a growing interest in the cultivation of new and more active strains. But it can not be assumed that these novel probiotic organisms share the historical safety of the traditional strains. Recently, attention has been focused on a number of reports of human infections caused by probiotic. Probiotics may theoretically be responsible for four types of side effects: systematic infections, deleterious metabolic ac-

作者简介:杨宝兰 女 副主任技师

tivities , excessive immune stimulation in susceptible individuals , and antibiotics resistance gene transfer. So the use of new strains of probiotics should be carefully assessed and tested for its safety.

Key Words : Probiotics ,safety ; Risk Assessment

益生菌是含有生理性作用的活菌或死菌,经口服或其他途径摄入,旨在改善粘膜表面微生物和酶的平衡,或刺激机体特异性或非特异性免疫机制,提高机体定植抗力或免疫力的微生物制剂。^[1]我们通常所说的益生菌主要是指乳杆菌和双歧杆菌等乳酸菌。这些益生菌广泛应用于发酵食品中,如酸奶、乳酪,或者将益生菌直接制成菌粉食用。

益生菌制品的好坏首先取决于菌种的选择。选择菌种的标准必须以微生态学理论为指导,根据来源于自然,回归自然的标准,选择与原宿主、原生境、原微生物系、原微种群相适应的菌种最理想。传统的益生菌菌种在安全应用上已有很长的历史,大多数菌种被认为是没有致病可能性的共生微生物体,且绝大部分分离自健康人体的肠道。我国卫生部发布的《益生菌类保健食品评审程序》规定可用于保健食品的益生菌有 *Bifidobacterium. bifidum*、*Bifidobacterium. infantis*、*Bifidobacterium. longum*、*Bifidobacterium. breve*、*Bifidobacterium. adolescenti*、*Lactobacillus. acidophilus*、*Lactobacillus. delbrueckii subsp. bulgaricus*、*Lactobacillus. casei subsp. casei*、*Lactobacillus. plantarum*、*Streptococcus. thermophilus*。在国外,特别是在欧洲,除了应用这些传统的菌种外,还利用自己的技术优势开发新的菌种,目前已有法国、日本、加拿大和韩国等国家的益生菌产品或菌粉进口到我国,其中包括罗伊氏乳杆菌和鼠李糖乳杆菌。目前这些新菌种的安全性已引起国内外专家的关注。此外,由于同一菌种内菌株与菌株之间也会有差异,因此即使是传统的益生菌菌种也不能保证种内的所有菌株都是安全的。

近年来有一些关于益生菌不良作用的报道,特别是乳酸菌与菌血症、心内膜炎、尿道感染等疾病有关的报道,并提出其有益的作用前景并不如以前想象的那么好。根据国外目前的资料,^[2] 益生菌安全性问题主要表现在以下三个方面:①全身性感染;②有害的代谢活性产物;③耐药基因的转移,其中最受关注的是由益生菌引起的菌血症、感染性心内膜炎和耐药性。

1 菌血症 菌血症是由于细菌进入血液而引起的疾病。目前国外由益生菌引起的菌血症的报告多为散发病例,大规模的流行病学资料很少。芬兰的国家疾病监测网在 1990 年~2000 年对全国 520 万人

口中患菌血症患者的血培养物分析表明,^[3]有 66 例患者的菌血症是由益生菌引起的,其中 48 例为乳杆菌引起,益生菌引起菌血症的发病率为 0.15~0.76/10 万人,见表 1。可引起菌血症的乳杆菌以鼠李糖乳杆菌为主,感染病例主要发生在免疫力低下(器官移植或癌症)及年老体弱者。鉴于此,欧盟工作组(Europe union workshop)将鼠李糖乳杆菌列入监管使用的范畴。法国的资料显示,^[16]从 1988 年~1990 年从血培养分离的微生物中,乳杆菌平均为 0.1%,明串珠菌为 0.007%。乳杆菌引起的感染多为二次感染。Donohue^[17]等则认为益生菌中大多数乳杆菌是安全的,而链球菌属和肠球菌属的某些菌株为条件致病菌,见表 2。

表 1 可引起菌血症的乳杆菌菌种^[3]

乳杆菌	病例数(%)
鼠李糖乳杆菌(<i>Lactobacillus. rhamnosus</i>)	26(54)
发酵乳杆菌(<i>Lactobacillus. fermentum</i>)	9(19)
干酪乳杆菌(<i>Lactobacillus. casei</i>)	7(15)
加氏乳杆菌(<i>Lactobacillus. gasseri</i>)	2(4)
詹氏乳杆菌(<i>Lactobacillus. jensenii</i>)	2(4)
玉米乳杆菌(<i>Lactobacillus. zeae</i>)	1(2)
清酒乳杆菌(<i>Lactobacillus. sake</i>)	1(2)

表 2 不同益生菌的安全性情况^[17]

种类	感染潜力
乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	主要为非致病菌,有些为机会感染(通常为免疫低下的患者。)
乳球菌属(<i>Lactococcus</i>)	主要为非致病菌。
明串珠菌属(<i>Leuconostc</i>)	主要为非致病菌,有些分离物有感染性。
链球菌属(<i>Streptococcus</i>)	口服链球菌主要为非致病菌(包括嗜热链球菌),有些可能引起机会感染。
肠球菌属(<i>Enterococcus</i>)	有些菌株为条件致病菌,具有溶血性和耐药性。
双歧杆菌属(<i>Bifidobacterium</i>)	主要为非致病菌,有些分离物有感染性。
酵母菌属(<i>Saccharomyces</i>)	主要为非致病菌,有些分离物有感染性。

2 感染性心内膜炎 除菌血症外,益生菌具有引起感染性心内膜炎的危险性。心内膜炎是由微生物定植在心脏瓣膜或相邻心内膜上引起的,多数发生在先天或后天瓣膜损伤的病人身上。微生物进入血液,黏附并定植在瓣膜上。所以,任何暂时的菌血症都有引发心内膜炎的潜在危险。在人体存在的正常菌群中,除肠球菌外,由乳酸菌引起的感染很低。从 1939 年出现第一个病历到目前为止,共报道 48 例(不包括肠球菌),^[4~6]见表 3。虽然报道的病例数不

多,但专家认为这个数字被低估了,实际上可能有相当多的由乳酸菌引起的心内膜炎感染被错误的归为肠球菌。

表3 从48例心内膜炎感染者中分离到的乳酸菌^[4~6]

菌种	病例数
鼠李糖乳杆菌(<i>Lactobacillus. rhamnosus</i>)	19
植物乳杆菌(<i>Lactobacillus. plantarum</i>)	11
干酪乳杆菌(<i>Lactobacillus. casei</i>)	12
嗜酸乳杆菌(<i>Lactobacillus. acidophilus</i>)	2
唾液乳杆菌(<i>Lactobacillus. salivarius</i>)	1
詹氏乳杆菌(<i>Lactobacillus. jensenii</i>)	1
乳酸乳球菌(<i>Lactococcus. lactis</i>)	2
肠膜明串珠菌(<i>Leuconostoc. mesenteroides</i>)	1

目前通常把益生菌对肠道粘膜的粘附和定植与否作为筛选益生菌先决条件,这是因为益生菌必须对肠道上皮细胞组织具有粘附性才能长期在肠道中存活并发挥作用。^[7]但对于致病菌而言,粘附能力的大小又是评价其致病能力大小的一个重要条件。当人体胃肠道粘膜屏障受到破坏,或者免疫力低下时,粘附能力强的致病菌可以由肠道进入血液,即细菌移位。同样,粘附能力强的益生菌也可由抵抗力差的肠道进入血液,除形成菌血症外,还可与血小板产生凝集反应,从而促进心内膜炎的形成,这也是益生菌引起心内膜炎的重要原因之一。^[8] Harty^[9] 等对5株从心内膜炎感染患者中分离到的鼠李糖乳杆菌与其他的16株鼠李糖乳杆菌进行了比较,发现从心内膜炎患者分离到的鼠李糖乳杆菌全部具有血小板凝集作用,而其他的菌株则只有一半具有该反应。血小板凝集反应与细菌细胞外层蛋白结构有关。某些益生菌菌种可以产生使肠道粘膜细胞表面糖蛋白脱落的糖苷酶或芳香氨基酶引起感染,如从心内膜炎感染患者中分离到的鼠李糖乳杆菌就有这两种酶,而双歧杆菌则没有。Effie^[10] 的研究表明,从临床血样本中分离出的鼠李糖乳杆菌的粘附性要强于从人类粪便中分离出的鼠李糖乳杆菌、发酵乳杆菌和双歧杆菌及食品工业用益生菌,如干酪乳杆菌和嗜酸乳杆菌等。

3 耐药性 益生菌安全性另一个非常重要的方面是其耐药性。万古霉素是一极为重要的糖肽类抗生素,在临床上通常被推荐用来治疗甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)感染,包括败血症、心内膜炎、组织和骨感染,主要用做经β-内酰胺类抗生素或其他抗菌药物治疗失败后使用的最后手段,固也通常被认为是抗菌药物的最后一道防线。在美国,肠球菌已经成为第三种最常见的医源性感染细菌。^[11]

许多乳杆菌,如罗特乳杆菌和鼠李糖乳杆菌均具有对万古霉素的耐药性,且被认为是一种天然特性。肠球菌耐万古霉素的基因由质粒编码,这种质粒是可以转移的,它可以通过结合的方法从肠球菌转移到诸如口腔链球菌和A组链球菌等革兰氏阳性菌。肠球菌的耐药性可分为A型耐药和B型耐药,A型耐药对万古霉素高度耐药,这些耐药菌可被万古霉素诱导,并通过质粒传播,编码这种耐药的基因为vanA;B型耐药对万古霉素不同程度耐药,可被万古霉素诱导,由vanB基因介导。^[12] 有实验表明罗特乳杆菌可将耐药因子传递给肠球菌,但是这种传递是在抗生素的选择压力下产生的,不用抗生素未发现耐药质粒的传递。^[14] Klein^[13] 等对罗特乳杆菌DSM20016、ATCC55149、ATCC53608、ATCC55730、ATCC55148和鼠李糖乳杆菌ATCC53103进行耐万古霉素基因vanA、vanB和vanC的分析表明,这6株菌均对万古霉素有耐药性,均未检测到vanA、vanB和vanC基因的存在,作者认为乳杆菌的耐药基因位于染色体上,因此检测不到vanA和vanB基因。世界各国生产酸奶用的乳杆菌、双歧杆菌和链球菌大部分都有耐药性及耐药基因。如果没有其它选择性压力的存在,作为益生菌传递耐药性的忧虑是没有必要的。但当抗生素的滥用已成为一种严重的社会问题时,监测益生菌的耐药性就显得非常迫切了。目前国外已逐渐建立益生菌的耐药资料,并进行市场监测,分析耐药基因传递的流行病学规律。国内目前研究益生菌耐药的报道不多,尚未建立益生菌耐药试验的标准化方法及相关检测程序。

益生菌产生有害的代谢活性是指发酵蛋白质产生氨、吲哚、酚等物质或有害酶类。还未见有报道双歧杆菌和乳杆菌能够产生有毒物质,双歧杆菌有较低的脱胺酶活性,具有较高的同化氨的能力,同时对胆汁酸有较强的脱饱和能力。^[18]

4 FAO/WHO 专家工作组有关益生菌安全性评价指标导则 考虑到大多数益生菌分离自人体的肠道,且同一菌种不同菌株间的区分在技术上还面临许多难题。因此考虑到益生菌的安全性问题,证明益生菌,尤其是新菌种进入市场前的安全性是非常重要的。目前国外许多国家制定了自己的益生菌的安全性评价体系。2002年,FAO/WHO联合专家委员会提出了用于食品的益生菌安全性评价指导原则。^[15]

首先要对待评价的益生菌菌株进行生物学上的分类,即利用生化与遗传学的方法明确菌株的属、种和株;其次是安全性评价。为确保所使用益生菌菌株的安全性,至少要进行下列试验。

①对其耐药性进行评价;②评估某些代谢活性;
③对人体实验中出现的副作用进行评估;④商品在市场上销售后,要对其出现的相关副作用病例进行流行病学调查;⑤如果所使用的益生菌菌株所隶属的菌种对哺乳动物是一种已知的产毒素菌种,则被评价的该益生菌菌株必须进行产毒试验;⑥如果所使用的益生菌菌株所隶属的菌种具潜在的溶血活性,则被评价的该益生菌菌株必须进行溶血试验。此外,FAO/WHO 专家工作组还强烈建议需要评价益生菌菌株对免疫低下模型的动物是否有感染性。

5 我国目前对益生菌安全性评价现状 目前我国尚未见由益生菌感染人体的报道,也缺乏益生菌耐药性及人群使用后的流行病学调查资料。随着越来越多的国外益生菌新菌种申报进入中国市场及国内益生菌市场的迅速增长,益生菌安全性评价的管理应受到足够的重视。

参考文献:

[1] Adams M R. Safety of industrial lactic and bacteria[J]. J Biotechnic,1999,68:171—178.
[2] Philippe M. Safety aspects of probiotic products[J]. Scand J Nutr,2001,45:22—24.
[3] Salminen M K,Soile T,Hilpi R,et al.Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland[J]. Clinical Infection Disease,2002,35:45—47.
[4] Mackay A D,Taylor M B,Kibbler C C,et al.Lactobacillus endocarditis by a probiotic organism[J]. Clin Microbiol Infect,1999,5:290—292.
[5] Farina C,Arosio M,Mangia M,et al.lactobacillus casei. subsp rhamnosus sepsis in a patient with ulcerative colitis[J].J Clin Gastroenterol,2001,33:251—252.
[6] Rautio M,Jousimies S H,Kauma H,et al.Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from Lactobacillus rhamnosus strain GG[J]. Clin Infect Dis,

1999,28:1159—1160.
[7] Ouwehand A C,Kirjavainen P V,Shortt C,et al. Probiotics: mechanisms and established effects[J]. Int Dairy J,1999,9:43—52.
[8] Antony S.Lactobacillemia:an emerging cause of infection in both the immunocompromised and the immunocompetent host[J]. J Natl Med Ass,2000,92:83—86.
[9] Harty D W,Oakey H J,Patrikakis M,et al. Pathogenic potential of lactobacillus[J]. Int J Food Microbiol,1994,24:179—189.
[10] Effie A,Pirkla V,Maija S,et al. Good adhesion properties of probiotics:a potential risk for bacteremia? Immunology and Medical[J]. Microbiology,2001,31:35—39.
[11] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐受性[M]. 上海:华东理工大学出版社,2002,138—139.
[12] Soile T,Kavindra V S,Pekka V. Vancomycin resistance factor of Lactobacillus rhamnosus GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes[J]. International Journal of Food Microbiology,1998,4:195—204.
[13] Klein G,Hallmann C,Cases I A,et al. Exclusion of vanA, vanB and VanC type glycopeptide resistance in strains of lactobacillus reuteri and Lactobacillus rhamnosus used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods[J]. Journal of Applied Microbiology,2000,89:815—824.
[14] Markay A D,Taylor M B,Kibbler C C,et al. Lactobacillus endocarditis caused by a probiotic organism[J]. Clinical Microbiology and infection,1999,5:290—292.
[15] WHO/FAO. Guidelines for the Evaluation of probiotics in food[Z]. 2002.
[16] Adams M R. Safety of industrial lactic acid bacteria[J]. Journal of Biotechnlogy,1996,68:1741—1748.
[17] Donohue D C. Safety of probiotic bacteria[J]. Asia Pac J Clin Nutr,1996,5:25—28.
[18] 康白,主编. 微生物学原理[M]. 大连:大连出版社,2002,195.

[收稿日期:2004-03-20]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2004)03-0262-04

[上接第226页]

参考文献:

[1] 赵志晶,刘秀梅. 中国带壳鸡蛋中沙门氏菌定量危险性分析评估的初步研究[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(3):201—206.
[2] 毛新武. 食品添加剂企业产品标准中的卫生安全隐患调查分析[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(3):250—253.
[3] 李晓瑜,王茂起. 国内外食品添加剂管理的法规标准状况及分析[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(3):210—214.
[4] 刘向晔,赵熙和,徐苓. 北京市部分老年妇女近年来饮食结构变化[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(3):238—240.
[5] 杨永珍,宋俊华,吴厚斌,等. 欧盟农药管理措施对我国的影响及对策[J]. 农药科学与管理,2004,25(4):32—37.
[6] Walter C Willett,Meir J Stampfer. 食物金字塔指南[J]. 科学,2003,(3):62—67.