

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB32/T 5062—2025

人类肠道菌群样本制备和保藏技术规范

Technical specification for human intestinal flora sample preparation and
preservation

2025-02-21 发布

2025-03-21 实施

江苏省市场监督管理局 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言Ⅲ

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 基本要求2

5 制备2

 5.1 方案制定2

 5.2 知情同意2

 5.3 粪便样本3

 5.4 肠道菌群样本4

6 保藏5

7 数据管理5

附录A(资料性) 布里斯托大便分类法6

附录B(资料性) 数据记录明细7

参考文献.....8

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。

本文件由江苏省卫生健康委员会提出并组织实施。

本文件由江苏省卫生健康标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：苏州市疾病预防控制中心、南京医科大学、徐州市贾汪区疾病预防控制中心、苏州善佰生物技术有限公司。

本文件主要起草人：戴宁彬、张钧、吴云侠、刘芳、杨海兵、穆延召、姜来、杨文浩、詹亚惠、朱晓燕。

人类肠道菌群样本制备和保藏技术规范

1 范围

本文件规定了人类肠道菌群样本制备和保藏的基本要求、制备流程、保藏要求和数据管理等技术内容。

本文件适用于人类肠道菌群样本制备和保藏。

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 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
GB/T 39725 信息安全技术 健康医疗数据安全指南
GB/T 41908 人类粪便样本采集与处理
GB/T 41910 洗涤粪菌质量控制和粪菌样本分级
WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肠道菌群 intestinal flora

寄居在肠道内的正常菌群、条件致病菌和致病菌等微生物群系。

3.2

生物样本库 biobank

开展生物样本获得和储存过程的合法实体或其部分,获得和储存过程包括生物样本及相关数据的收集、制备、保存、测试、分析和分发。

3.3

布里斯托大便分类法 Bristol stool scale

依据粪便不同形态和质地进行分类的一种方法,从1型最硬粪块到7型水样便共分7种类型,常以图片展示和文字描述的视觉性图表形式呈现。

注:又称Bristol评分。

3.4

批次 lot

在规定限度内具有同一性质和质量,并在同一连续生产周期中生产出来的一定数量的生物样本为一批次。

3.5

香农-威纳指数 Shannon Wiener index

从物种种类数和均匀性(各物种的相对比例)两方面来衡量群落物种多样性的一项指标,该指数越大代表群落的物种多样性越高。

3.6

保存液 tabilizer

能保存粪便微生物固相和核酸物质的化学试剂。

注:保存液的主要作用为:

- a) 固定微生物,使微生物不能继续生长变化,相关蛋白酶等失去活性;
- b) 保护脱氧核糖核酸(DNA),稳定DNA使其不易发生降解和变异。

4 基本要求

4.1 从事人类肠道菌群样本制备和保藏活动的生物样本库应符合 GB 19489、GB/T 37864 和 WS 233 的规定,相关设备、环境和消毒隔离应满足普通型 BSL-2 实验室要求,所有肠道菌群样本制备用设备、耗材和所在环境应保证无菌。

4.2 实施人类肠道菌群样本制备和保藏的人员应符合 GB/T 41908 和 GB/T 41910 的规定。

4.3 应建立质量管理体系规范人类粪便样本采集和质量控制,以及人类肠道菌群样本制备、质量控制和保藏的全过程。

4.4 人类肠道菌群样本制备和保藏过程中产生的各类数据应及时、准确和清晰地记录、保存和备份。

4.5 应对样本捐赠人提供足够的隐私保护,样本捐赠人信息管理应符合 GB/T 39725 的规定。

5 制备

5.1 方案制定

在生物样本采集前,应明确生物样本采集目的、种类、数量、时间和周期,明确样本捐赠人的纳入排除标准,制定详细的生物样本采集、处理、质量控制和保藏方案。

5.2 知情同意

生物样本采集和保藏项目应通过伦理审查,招募人员应接受规范化培训,应使用样本捐赠人能够理解的简明语言传达信息,使他们了解采集样本的风险、获益和可能产生的后果,使其知情并征得其同意,信息应包括但不限于:

- 捐赠人纳入排除标准;
- 捐赠人准备说明;
- 捐赠人知情同意要求;
- 捐赠人的权利、义务、风险和可能产生的后果;
- 生物样本采集种类、数量、采集容器类型和采集方法等采集内容;
- 粪便样本接收标准;
- 保护捐赠人个人信息的政策;
- 特殊处理要求等其他需要沟通的内容。

5.3 粪便样本

5.3.1 采集

粪便采集地点宜邻近样本质量控制和制备的实验室。捐赠人解大便前应先进行手部清洁并排尽尿液,宜使用洁净的蹲式便器,在其内放置一个内径不低于10 cm,体积不低于500 mL,无菌,具有易于开启且密封性良好盖子的采集容器,打开采集容器盖子,将粪便排入采集容器。采集完成后即时密闭采集容器,将粪便样本、样本相关信息和知情同意书交实验人员。

5.3.2 质量控制

- 5.3.2.1 称量并记录粪便样本重量,每份样本不低于100 g为合格。
- 5.3.2.2 观测粪便样本性状,不应混合污染物,如尿液、污水和消毒剂等异物。
- 5.3.2.3 采用布里斯托大便分类法(见附录A)评估粪便样本,3型~5型为合格,用于制备肠道菌群样本。
- 5.3.2.4 每批次粪便样本应留样,用于质量控制和溯源。
- 5.3.2.5 每批次粪便样本应随机抽样1份,按表1进行质量控制检测;长期捐赠人的粪便样本应每2个月另行随机抽样1份留样,按表2进行质量控制检测。

表1 每批次粪便样本质量合格项目指标

质量控制项目	结果	检测方法
寄生虫	未检出	镜检法
虫卵	未检出	镜检法
夏科莱登结晶	未检出	镜检法
孢子	未检出	镜检法
菌丝	未检出	镜检法
隐血	阴性	免疫法
霍乱弧菌	阴性	培养法
副溶血弧菌	阴性	培养法
沙门氏菌	阴性	培养法
志贺氏菌	阴性	培养法
大肠埃希菌O157	阴性	培养法
轮状病毒抗原	阴性	免疫法

表2 长期捐献粪便样本捐赠人每2个月粪便样本质量合格项目指标

质量控制项目	结果	检测方法
菌群多样性	菌群种类数≥200种 香农-威纳指数>4.0	测序法
幽门螺杆菌	阴性	测序法
艰难梭菌	阴性	测序法
弯曲菌	阴性	测序法

5.3.2.6 所有项目均合格者为合格粪便样本。标识不合格粪便样本,标识由不合格粪便样本制备的肠道菌群样本为不合格肠道菌群样本。

5.3.2.7 不合格粪便和肠道菌群样本应单独存放在不合格区,执行销毁并记录。

5.4 肠道菌群样本

5.4.1 制备

5.4.1.1 新鲜粪便样本应在采集后 30 min 内开始制备肠道菌群样本,从粪便排出体外至菌液制作完成应保证在 2 h 以内。

5.4.1.2 肠道菌群样本制备应按照以下程序操作。

- a) 稀释:每次取不少于 50 g 粪便置于一个无菌容器,加入 3 倍~5 倍质量的无菌生理盐水。
- b) 搅拌:使用无菌电动搅拌器以 450 r/min~900 r/min 搅拌 10 min,充分混匀。
- c) 过滤:以最大 200 目(0.07 mm)过滤网过滤去渣,过滤时间视情况而定。
- d) 离心:4 500 r/min 离心 5 min,生物安全柜内去上清,加入 400 mL 生理盐水相同条件再次离心去上清。
- e) 分装:离心后得到的菌群沉淀可分装成菌液、干粉胶囊或液体胶囊三种类型。
 - 1) 菌液:称量菌群沉淀重量,按 1 g 菌群加 10 mL 保存液的比例加入保存液,用无菌搅拌棒充分混匀为菌液,将菌液按 50 mL/管分装到无菌耐低温 50 mL 离心管或注射器。
 - 2) 干粉胶囊(平板冻干法):称量菌群沉淀重量,按 1 g 菌群加 5 mL 保存液的比例加入保存液,用无菌搅拌棒充分混匀为菌液。将菌液倒入无菌培养皿中,盖好培养皿盖,—80℃冷冻菌液 2 h~3 h 为固体后取出,打开培养皿盖,将培养皿放入真空干燥机中干燥后取出,用无菌药勺刮取干燥后的菌群,使用胶囊灌装器按 0.5 g/粒将菌群干粉装入羟丙甲基纤维素胶囊壳,将制作好的胶囊按需装瓶,在瓶中加入适量干燥剂。
 - 3) 干粉胶囊(旋转冻干法):称量菌群沉淀重量,按 1 g 菌群加 5 mL 保存液的比例加入保存液,用无菌搅拌棒充分混匀为菌液,将菌液倒入无菌茄形瓶中,将茄形瓶置于低温旋动仪旋转冷冻,使菌液均匀凝固在茄形瓶内表面,后置于 T 型冷冻干燥机冷冻干燥,用无菌药勺刮取干燥后的菌群,使用胶囊灌装器按 0.5 g/粒将菌群干粉装入羟丙甲基纤维素胶囊壳,将制作好的胶囊按需装瓶,在瓶中加入适量干燥剂。
 - 4) 液体胶囊:称量菌群沉淀重量,按 1 g 菌群加 1 mL 保存液的比例加入保存液,用无菌搅拌棒充分混匀为菌液,使用移液器按 0.5 mL/粒将菌液注入明胶胶囊壳,将制作好的明胶胶囊放入羟丙甲基纤维素胶囊壳中,将制作好的胶囊按需装瓶,在瓶中加入适量干燥剂。
- f) 标识:贴标签标识样本名称、批次、生产日期、保质期和保存条件。

5.4.2 质量控制

5.4.2.1 每批次肠道菌群样本应留样,用于质量控制和溯源。

5.4.2.2 每批次肠道菌群样本应随机抽样 1 份按表 3 进行质量控制。

表 3 每批次肠道菌群样本质量合格项目指标

质量控制项目	菌液结果	胶囊结果	检测方法
外观	悬浊液	整洁,不应有黏结、变形、渗漏或囊壳破裂	目检法
活菌数	不小于 2.5×10^{12} 个/50 mL	不小于 1×10^9 个/g	流式细胞法
细菌活性	不低于 80%	不低于 70%	流式细胞法

5.4.2.3 肠道菌群样本对应的父代粪便样本按 5.3.2.5 质量控制有不合格项的被视为不合格肠道菌群样本。

5.4.2.4 所有项目均合格者为合格样本。标识不合格样本,不合格样本应单独存放在不合格区,执行销毁并记录。

6 保藏

6.1 肠道菌群样本—20℃保藏期限最长为1个月,—80℃保藏期限最长为12个月。

6.2 留样的粪便和肠道菌群样本应—80℃保存至少12个月。

6.3 超过保藏期限的样本应执行销毁并记录。

7 数据管理

7.1 应及时、准确、清晰地记录人类肠道菌群样本制备和保藏过程中产生的各类数据,记录内容见附录B。

7.2 应建立、成文并实施人类肠道菌群样本相关数据的传输和接收程序,数据传输应确保其完整性并防止侵犯数据隐私。数据传输前,应就数据的采集和接收与有关各方达成工作协议。








7.3 人类肠道菌群样本相关数据应经数据清洗后储存,数据清洗包括补充完整缺失值,复核异常值,合并或删除重复数据,以及更正不规范数据等。

7.4 人类肠道菌群样本相关数据应有备份,原份和备份数据应至少保存20年。

附 录 A
(资料性)
布里斯托大便分类法

表 A. 1 给出了布里斯托大便分类法示意。

表 A. 1 布里斯托大便分类法示意

类型	图片示例	描述	备注
1		一颗颗硬球	<div>便秘</div> <div>↑</div> <div>↓</div> <div>正常</div> <div>↓</div> <div>腹泻</div>
2		像一串葡萄,表面凹凸,质地较硬	
3		像玉米,表面有裂痕	
4		像香肠,表面光滑,质地较软	
5		像鸡块,质地柔软的半固体	
6		像粥,无固定外形	
7		水状,完全液体无固体	

附 录 B
(资料性)
数据记录明细

- B.1 项目伦理批件和相关文件。
- B.2 捐赠人数据包括捐赠人编号、知情同意书、访谈记录、一般人口学信息、临床诊疗信息、捐赠前7天的身体情况、饮食情况、用药情况、排便情况、心理压力情况、每次捐献时间、每次捐赠时体温。
- B.3 样本采集和接收数据包括粪便样本编号、采集容器类型、采集时间、采集人员、粪便重量、粪便形状和颜色、布里斯托大便分类、接收时间、接收人员。
- B.4 样本制备数据包括肠道菌群样本制备方法、肠道菌群样本编号、批次号、重量、数量、分装后体积或胶囊数量、制备时间、制备人员。
- B.5 样本质量控制数据包括粪便和肠道菌群样本质量控制检测结果、质量控制时间、质量控制人员。
- B.6 样本保藏数据包括入库时间、入库位置、入库人员、保藏期间温度、出库时间、出库人员。
- B.7 突发事件数据包括突发事件内容、时间、地点、处理方法、处理结果、处理人员。

参 考 文 献

- [1] 史以超,王子恺,杨云生. 消化道微生态标准化样本库共识[J]. 转化医学杂志,2018,7(04):198-203.
- [2] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程. 第4版[M]. 北京:人民卫生出版社,2017.
- [3] 国家卫生健康委员会医院管理研究所,中华医学会肠外肠内营养学分会,中华医学会肠外肠内营养学分会肠道微生态协作组. 肠道菌群移植临床应用管理中国专家共识(2022版)[J]. 中华胃肠外科杂志,2022,25(9):747-756.
- [4] 中华医学会肠外肠内营养学分会,上海预防医学会微生态专业委员会. 肠道菌群移植供体筛选与管理中国专家共识(2022版)[J]. 中华胃肠外科杂志,2022,25(9):757-765. DOI:10.3760/cma.j.cn441530-20220606-00246.
- [5] 郭智,王钧,王强. 中国抗癌协会肠道微生态技术整合诊治指南(精简版)[J]. 中国肿瘤临床,2023,50(18):919-927.
- [6] Vaught JB, Henderson MK. Biological sample collection, processing, storage and information management[J]. IARC Sci Publ. 2011,(163):23-42.
- [7] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(20):3192-3200.
- [8] 何植,张发明. 中华粪菌库的原则、方案和风险管理[J]. 胃肠病学,2017,22(04):193-198.
- [9] Fecal Microbiota Transplantation-standardization Study Group. Nanjing consensus on methodology of washed microbiota transplantation[J]. Chin Med J (Engl). 2020,133(19):2330-2332.
- [10] Dai M, Liu Y, Chen W, Buch H, Shan Y, Chang L, Bai Y, Shen C, Zhang X, Huo Y, Huang D, Yang Z, Hu Z, He X, Pan J, Hu L, Pan X, Wu X, Deng B, Li Z, Cui B, Zhang F. Rescue fecal microbiota transplantation for antibiotic-associated diarrhea in critically ill patients[J]. Crit Care. 2019,23(1):324.
- [11] Song SJ, Amir A, Metcalf JL, Amato KR, Xu ZZ, Humphrey G, Knight R. Preservation methods differ in fecal microbiome stability, affecting suitability for field studies[J]. mSystems, 2016, 1(3):e00021-16.
- [12] Shaw AG, Sim K, Powell E, Cornwell E, Cramer T, McClure ZE, Li MS, Kroll JS. Latitude in sample handling and storage for infant faecal microbiota studies: the elephant in the room?[J]. Microbiome. 2016,4(1):40.
- [13] Zhang T, Lu G, Zhao Z, Liu Y, Shen Q, Li P, Chen Y, Yin H, Wang H, Marcella C. Cui B, Cheng L, Ji G, Zhang F. Washed microbiota transplantation vs. manual fecal microbiota transplantation: clinical findings, animal studies and in vitro screening[J]. Protein Cell 2020, 11(4):251-266.
- [14] Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, Sokol H, Arkkila P, Pintus C, Hart A, Segal J, Aloï M, Masucci L, Molinaro A, Scaldaferri F, Gasbarrini G, Lopez-Sanroman A, Link A, de Groot P, de Vos WM, Högenauer C, Malfertheiner P, Mattila E, Milosavljević T, Nieuwdorp M, Sanguinetti M, Simren M, Gasbarrini A. European FMT Working Group. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice[J]. Gut. 2017,66(4):569-580.