

ICS 11.100

CCS C00/09

# 团 体 标 准

T/SBIAORG 002—2020

---

## 肠道菌群移植样本质量控制标准

Diagnostic criteria for samples of faecal microbiota transplantation

(征求意见稿)

2020 - 09 - 29 发布

2020 - 10 - 01 实施

---

上海市生物医药行业协会  
发布



# 目 录

1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 定义 .....	1
4 肠道常见致病病原体检测 .....	1
5 供体多重耐药基因检测 .....	2
6 供体肠道微生态平衡检测 .....	3
7 肠道菌群活性鉴定 .....	4
附录 A（资料性附录）消化道致病病原体及多重耐药基因 .....	6
附录 B（规范性附录）实验室诊断方法 .....	7

# 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国肠道微生态创新诊疗联盟提出。

本标准起草单位：上海宝藤生物医药科技股份有限公司、同济大学附属第十人民医院、上海张江医学创新研究院、上海宝藤医学检验所有限公司。

本标准主要起草人：楼敬伟、秦环龙、李宁、陈启仪、叶琳珊、吴守信、林灵、梅卫玲。

本标准首次发布。

# 肠道菌群移植样本质量控制标准

## 1 范围

本标准规定了肠道菌群移植过程中供体来源样本的质量控制方法。  
本标准适用于肠道菌群移植过程中供体来源样本的质量评估。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

WS 271-2007 感染性腹泻诊断标准  
WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用  
SN/T 1193 基因检验实验室技术要求  
SN/T 4274-2015 国境口岸沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌O157:H7的三重荧光PCR检测方法  
SN/T 3953-2014 国境口岸轮状病毒(A组)、诺如病毒、星状病毒的多重RT-PCR检测方法  
GB 4789.42 食品微生物学检验 诺如病毒检验  
GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程  
GB/T 37870-2019 个体鉴定的高通量测序方法  
GB 4789.1 食品微生物学检验 总则  
GB 4789.2 食品微生物学检验 菌落总数测定  
GB 4789.34 食品微生物学检验 双歧杆菌检验  
GB 4789.35 食品微生物学检验 乳酸菌检验

## 3 定义

### 3.1 肠道菌群移植 fecal microbiota transplantation

是将健康人粪便中功能菌群移植到患者肠道内，重建新的肠道菌群，实现肠道及肠道外疾病的治疗。

### 3.2 高通量测序 high-throughput sequencing

是指一次对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定的方法。

### 3.3 操作分类单元 Operational Taxonomic Units

OTU是在系统发生学研究或群体遗传学研究中，为了便于进行分析，人为给某一个分类单元（品系，种，属，分组等）设置的同一标志。通常按97%的相似度，对所有序列进行OTU划分并进行生物信息统计分析。

### 3.4 香农-威纳指数 Shannon Wiener index

Shannon指数是指测量群落的异质性。

### 3.5 菌落总数 aerobic plate count

粪便样本经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每g（mL）检样中形成的微生物菌落总数。

## 4 肠道常见致病病原体检测

## 4.1 常见肠道致病微生物检测

### 4.1.1 流行病学特征

见WS 271-2007和附录A。

### 4.1.2 实验室检查

—沙门氏菌检验：按SN/T 4274-2015或WS 271-2007中B.1执行。

—志贺氏菌检验：按SN/T 4274-2015执行。

—大肠杆菌O157:H7检验：按SN/T 4274-2015执行。

—副溶血性弧菌：按WS 271-2007中B.3执行。

—小肠结肠炎耶尔森检验：按WS 271-2007中B.5执行。

—隐孢子虫检验：按WS 271-2007中B.9执行。

—弯曲菌检验：按WS 271-2007中B.4执行。

--艰难梭状芽孢杆菌及其产毒基因*tcdA*和*tcdB*的检测：详见附录B。

### 4.1.3 病原确诊原则

病原确诊应依据从粪便中检出病原体或特异性核酸片段检测阳性。

### 4.1.4 结果判定

供体制备出的菌液中沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌O157:H7、副溶血性弧菌、小肠结肠炎耶尔森、隐孢子虫、弯曲菌、艰难梭状芽孢杆菌及其产毒基因*tcdA*和*tcdB*的检测结果为阴性。

## 4.2 常见肠道致病病毒检测

### 4.2.1 流行病学特征

见GB 4789.42、WS 271、SN/T 3953-2014和附录A。

### 4.2.2 实验室检查

—诺如病毒检验：按GB 4789.42或WS 271或SN/T 3953-2014执行。

—轮状病毒检验：按SN/T 3953-2014或WS 271中B.6.3执行。

—新型冠状病毒检验：详见附录B。

### 4.2.3 病原确诊原则

病原确诊应依据从粪便中检出病毒或特异性核酸片段检测阳性。

### 4.2.4 结果判定

供体制备出的菌液中诺如病毒、轮状病毒和新型冠状病毒检测结果为阴性。

## 5 供体多重耐药基因检测

### 5.1 生物安全和PCR防污染要求

实验室生物安全符合GB 19489的规定。PCR防污染措施按WS/T 230和SN/T 1193的规定执行。

### 5.2 主要仪器

5.2.1 二级B型生物安全柜。

5.2.2 涡旋振荡器。

5.2.3 冰箱：4℃、-20℃和-70℃。

5.2.4 超净工作台。

5.2.5 微型离心机。

5.2.6 荧光定量 PCR 仪。

5.2.7 超净工作台。

5.2.8 微量可调移液器一套（含以下 3 种规格：10 μL、100 μL、1 mL）。

### 5.3 主要试剂

5.3.1 病毒核酸抽提试剂盒。

5.3.2 PCR 扩增试剂盒。

### 5.4 实验步骤

#### 5.4.1 病毒核酸提取

按适用于病毒基因组提取的商品试剂盒说明书操作。

#### 5.4.2 实时荧光定量 PCR 扩增

按适用于新型冠状病毒 PCR 扩增的试剂盒说明书操作。

### 5.5 检验结果及判读报告

根据扩增试剂盒的质量控制要求，判定待测样本的阴阳性。

合格的供体菌液中各多重耐药基因检测结果应为阴性。

或者供体肛拭子经过多重耐药菌（碳青霉烯类耐药的肠杆菌科（CRE），产广谱β-内酰胺酶菌（ESBL）和耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌（MRSA）等）体外培养，检测结果为阴性。

## 6 供体肠道微生态平衡检测

### 6.1 原理

使用高通量测序仪对16S rDNA可变区进行扩增测序，可以同时检测样本中的优势物种、稀有物种及一些未知物种，获得样本的微生物群落组成以及相对丰度。

### 6.2 仪器与设备

6.2.1 PCR 仪：温度设置范围为 0℃~99℃，最大循环数为 99。

6.2.2 高通量测序仪：测序读长≥300 bp，碱基识别质量 Q30>70%。

6.2.3 离心机：迷你离心机和实验室通用高速离心机，最高转速不低于 16 000 r/min。

6.2.4 涡旋振荡仪。

6.2.5 冰箱：温度调节范围为-20℃~4℃。

6.2.6 磁力架：放置 1.5 mL 离心管。

### 6.3 试剂

#### 6.3.1 DNA 抽提试剂盒

基因组DNA提取试剂盒。

### 6.3.2 文库制备试剂

扩增引物及PCR反应的预混体系。PCR的预混体系包括DNA聚合酶、PCR缓冲液、镁离子、dNTP、PCR稳定剂和增强剂。

### 6.3.3 高通量测序试剂

高通量测序试剂包含芯片、测序引物、高效测序反应酶、缓冲液。

## 6.4 实验步骤

### 6.4.1 DNA 提取

按照DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取。

### 6.4.2 文库制备与 DNA 测序

通过16S rDNA的V4或V3-V4高变区的引物序列和PCR反应的预混体系加至适量的DNA中进行PCR扩增。扩增完成后选择合适的磁珠对PCR产物进行纯化。纯化后的产物通过Index PCR及纯化，取纯化后的PCR产物进行文库质检。当文库的片段长度分布符合预期，且文库浓度符合高通量测序仪要求时，文库质检合格。最后将多个质检合格的文库按比例混合后，选择合适的测序读长进行高通量测序。

### 6.4.3 数据过滤和拼接

一个样本对应一个Barcode序列，根据序列的不同从原始数据中拆分出各样本数据。对序列进行质控和过滤。同时对双端测序的成对reads进行拼接，截去Barcode和引物序列。筛选低质量序列的标准是：序列小于50bp，平均质量值低于20，含有不明确碱基N以及含有>8bp的单核苷酸重复序列。

### 6.4.4 OTU 聚类和物种注释

采用OTU聚类分析软件对其序列进行分析。分析过程包括去嵌合体，去重复序列，聚类等。默认以97%相似度将序列聚类成OTUs，并得到各OUT的代表序列。基于参考数据库（如RDP、SILVA、Greengenes、NCBI NT等）对代表序列进行物种注释，结合序列比对结果进一步生成OUT丰度表，并在门、纲、目、科、属等各个分类水平上，统计各样本的群落组成。

## 6.5 结果分析及报告

### 6.5.1 菌群多样性

菌群多样性包括两个维度，一个是肠道菌群种类的数量，人群中肠道菌群的种类参考范围在200~2000种，种类数量越多多样性越高。另一个维度是均匀性，即各个菌种的含量丰度较为均一没有出现单一菌种占据绝大部分的情况。

合格的菌液中OUT的数量不少于200，Shannon指数大于2.8。

### 6.5.2 肠型类型

除了血型，人类还有不同的肠型类型。不同的菌落类型反映着不同的饮食习惯。研究表明，人群中肠型可根据不同菌群比例分为拟杆菌属(Bacteroides)型、普雷沃氏菌属(Prevotella)型和厚壁菌门(Firmicutes)型。制备出的菌液根据检测结果出具肠型类型的报告，供体和受体之间肠道菌群移植的肠型类型要一致。

## 7 肠道菌群活性鉴定



## 7.1 菌群活性及活菌总数鉴定

### 7.1.1 仪器和设备

7.1.1.1 超净工作台。

7.1.1.2 高分辨率显微镜。

### 7.1.2 试剂

7.1.2.1 0.4%台盼蓝染色液。

7.1.2.2 生理盐水。

### 7.1.3 实验步骤

7.1.3.1 将待测菌液按10倍稀释，或者1粒胶囊用1mL生理盐水悬浮，稀释成梯度浓度菌液。

7.1.3.2 将稀释好的菌液按9:1与0.4%台盼蓝混合，室温染色3-10 min。

7.1.3.3 使用血球计数板在高分辨率显微镜下进行计数。

7.1.3.4 根据不同型号血球计数板，对计数结果进行计算最后得出菌液中细菌浓度(CFU/mL)。

### 7.1.4 结果判定

标准化菌液菌群活性>80%，活菌数量 $\geq 2 \times 10^{10}$ CFU；标准化胶囊菌群活性>80%，活菌数量 $\geq 1.5 \times 10^{10}$ CFU。

## 7.2 双歧杆菌、乳酸菌检验

### 7.2.1 培养基和试剂

见GB 4789.34、GB 4789.35。

### 7.2.2 检验方法

--双歧杆菌检验：按GB 4789.34执行；

--乳酸菌检验：按GB 4789.35执行；

### 7.2.3 结果与报告

参照根据菌落计数结果出具报告，报告单位以CFU/mL表示。

### 7.2.4 菌液活性判读

供体菌液中双歧杆菌 (*Bifidobacteria*) 菌落总数 $\geq 5.0 \times 10^8$  CFU/mL，乳酸菌 (*Lactobacilli*) 菌落总数 $\geq 2.0 \times 10^8$  CFU/mL，才可用于肠道菌群移植。

附录 A  
(资料性附录)

消化道致病病原体及多重耐药基因

A.1 消化道致病病原体

A.1.1 新型冠状病毒

新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎起病以发热为主要表现,可合并轻度干咳、乏力、呼吸不畅、腹泻等症状,流涕、咳痰等症状少见。部分患者起病症状轻微,可无发热,仅表现为头痛、心慌、胸闷、结膜炎、轻度四肢或腰背部肌肉酸痛。部分患者在一周后出现呼吸困难,严重者病情进展迅速。多数患者预后良好,少数患者病情危重,甚至死亡。

A.1.2 艰难梭菌

艰难梭菌(*Clostridium difficile*)是革兰阳性厌氧产芽孢杆菌,是引起抗菌药物相关性腹泻和伪膜性结肠炎的主要致病菌,已成为院内感染腹泻的代表。产毒型艰难梭菌可通过肠毒素、细胞毒素引起腹泻、结肠炎、伪膜性肠炎甚至中毒性巨结肠症。艰难梭菌主要含有毒素A(*tcdA*)和毒素B(*tcdB*),是否携带毒素是判定临床感染的重要证据。

A.2 多重耐药基因

A.2.1 产超广谱β-内酰胺酶细菌核酸测定

产超广谱β-内酰胺酶是由质粒介导的2be、2ber、2de和2e类β-内酰胺酶;除了能水解青霉素类和一二代头孢菌素外,还能水解三代头孢菌素及单环酰胺类氨基曲南;能被β-内酰胺酶抑制剂所抑制。目前大肠埃希氏菌(大肠杆菌)、肺炎克雷伯氏菌是最常见的产ESBLs菌株的细菌,其次,阴沟肠杆菌、粘质沙雷氏菌、弗劳地枸橼酸菌、铜绿假单胞菌也可出现产ESBLs菌株的细菌。目前最有效的抗生素为碳青霉烯类(泰能),其次,头孢西丁及含酶抑制剂的复合剂、氨基糖甙类部分有效。建议对产超广谱β-内酰胺酶细菌的10种耐药基因(SHV、TEM、CTX-M1、CTX-M2、CTX-M9、CTX-M25、CTX-M8、OXA1、OXA10、OXA2)的特异性DNA核酸片段进行荧光检测。

A.2.2 碳青霉烯耐药基因 KPC 检测

碳青霉烯类抗生素使抗菌谱最广,抗菌活性最强的非典型β-内酰胺抗生素,因其具有对β-内酰胺酶稳定以及毒性低等特点,已经成为治疗严重细菌感染最主要的抗菌药物之一。碳青霉烯酶是指能够明显水解碳青霉烯类抗生素的一类β-内酰胺酶,KPC(*Klebsiella pneumonia carbapenemase*)属于Ambler分子分类的A型、bush分类的2f亚群,由质粒介导,不仅存在于肺炎克雷伯菌,也存在其他肠杆菌科、不动杆菌属以及铜绿假单胞菌等细菌中。如果一直致病菌产生了KPC酶,则应该避免使用碳青霉烯类药物。此外因其质粒介导、水解谱广泛的特性,危险性很高,因此对KPC的监控和预防非常重要。

A.2.3 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌核酸检测

滥用抗生素使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染率逐年上升,以肺部感染为主,已成为肺部院内感染的主要致病菌,呈现高度耐药和多重耐药,除糖肽类抗生素外,对其他抗生素广泛耐药。

A.2.4 耐万古霉素耐药基因 VanA、VanB 核酸检测

耐万古霉素肠球菌是人和动物体内上呼吸道、口腔或肠道的常居菌,当其定植于其它黏膜部位时,能引起心内膜炎等临床感染,病死率达到21.0%~27.5%,是全球范围内主要的医院条件致病菌。VanA型可被万古霉素和替考拉宁诱导且对二者高度耐药, VanB型只能由万古霉素诱导对万古霉素耐药,对替考拉宁敏感。

附录 B  
(规范性附录)  
实验室诊断方法

**B. 1 新型冠状病毒**

**B. 1. 1 检测对象**

经粪菌处理仪制备出的供体菌液。

**B. 1. 2 生物安全和 PCR 防污染要求**

实验室生物安全符合 GB 19489 的规定。PCR 防污染措施按 WS/T 230 和 SN/T 1193 的规定执行。

**B. 1. 3 主要仪器**

B.1.3.1 二级 B 型生物安全柜。

B.1.3.2 涡旋振荡器。

B.1.3.3 冰箱：4℃、-20℃和-70℃。

B.1.3.4 超净工作台。

B.1.3.5 微型离心机。

B.1.3.6 荧光定量 PCR 仪。

B.1.3.7 冰箱：4℃、-20℃和-70℃。

B.1.3.8 微量可调移液器一套（含以下 3 种规格：10 μL、100 μL、1 mL）。

**B. 1. 4 主要试剂**

B.1.4.1 病毒核酸抽提试剂盒。

B.1.4.2 PCR 扩增试剂盒。

**B. 1. 5 检验程序**

**B.1.5.1 病毒核酸提取**

按适用于病毒基因组提取的商品试剂盒说明书操作。

**B.1.5.2 PCR 扩增**

按适用于新型冠状病毒 PCR 扩增的试剂盒说明书操作。

**B. 1. 6 检验结果及判读报告**

根据扩增试剂盒的质量控制要求，判定待测样本的阴阳性。

合格的供体菌液中新型冠状病毒阴性。

**B. 2 艰难梭菌及其产毒基因 *tcdA* 和 *tcdB***

**B. 2. 1 检测对象**

经粪菌处理仪制备出的供体菌液。

**B. 2. 2 生物安全和 PCR 防污染要求**

实验室生物安全符合 GB 19489 的规定。PCR 防污染措施按 WS/T 230 和 SN/T 1193 的规定执行。

**B. 2. 3 主要仪器**

B.2.3.1 二级 B 型生物安全柜。

B.2.3.2 涡旋振荡器。

- B.2.3.3 冰箱：4℃、-20℃和-70℃。
- B.2.3.4 超净工作台。
- B.2.3.5 微型离心机。
- B.2.3.6 3BI 7500 PCR 仪。
- B.2.3.7 冰箱：4℃、-20℃和-70℃。
- B.2.3.8 微量可调移液器一套（含以下 3 种规格：10 μL、100 μL、1 mL）。

## B. 2. 4 主要试剂

- B.2.4.1 病毒核酸抽提试剂盒。
- B.2.4.2 去离子水。
- B.2.4.3 PCR 引物应以 PAGE 以上级别纯化，引物序列见 B.2.5.2 a)。
- B.2.4.4 多重荧光定量 PCR 基础试剂。

## B. 2. 5 检验程序

### B.2.5.1 病毒核酸提取

按适用于病毒基因组提取的商品试剂盒说明书操作。

### B.2.5.2 多重荧光定量 PCR 扩增

#### a) 引物

引物应用液浓度配置成 10 μmol/L，探针浓度为 6 μmol/L，序列分别如下：

艰难梭菌引物：

- CD16S-F: 5' -GCAAGTTGAGCGATTTACTTCGGT-3' ；
- CD16S-R: 5' -GTACTGGCTCACCTTTGATATTYAAGAG-3' ；
- CD16S-P: 5' -FAM-TGCCTCTCAAATATATTATCCCGTATTAG-BHQ1-3' 。

产毒基因 *tcdA*：

- tcdA-F: 5' -CAGTCGGATTGCAAGTAATTGACAAT-3' ；
- tcdA-R: 5' -AGTAGTATCTACTACCATTAACAGTCTGC-3' ；
- tcdA-P: 5' -VIC-TTGAGATGATAGCAGTGTCAGGATTG-BHQ1 -3' 。

产毒基因 *tcdB*：

- tcdB-F: 5' -TACAAACAGGTGTATTTAGTACAGAAGATGGA-3' ；
- tcdB-R: 5' -CACCTATTTGATTTAGMCCTTTAAAAGC-3' ；
- tcdB-P: 5' -CY5-TTKCCAGTAAAATCAATTGCTTC-BHQ2-3' 。

#### b) 阳性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照和空白对照，阳性对照为扩增目标区域的阳性质粒；空白对照用无菌水作为多重 PCR 反应的模板。

#### c) 反应体系组成

多重 PCR 反应体系应采用以下参数：2×PCR 缓冲液 12.5 μL；引物 2 μL；去离子水 5.5 μL；最后加模板 5 μL，使反应总体积为 25 μL。

#### d) 反应条件

多重荧光定量 PCR 反应条件：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 15 s，60℃ 退火及延伸 30 s，收集荧光信号，45 个循环。因不同 PCR 仪器的性能差异，可根据条件优化适当调整 PCR 退火温度和时间。

## B. 2. 6 检验结果判读及报告

阳性质控的 3 个目标基因的 Ct 值 < 35，而阴性质控无扩增曲线时才可对样本进行结果判读及报告，否则视为试验失败，需重新试验。本标准检验结果判断及报告如下：

- a) FAM 通道扩增曲线呈 S 型，且 Ct 值 ≤ 35，报告“检出艰难梭菌特异性基因”；
- b) HEX/VIC 通道扩增曲线呈 S 型，且 Ct 值 ≤ 35，报告“检出艰难梭菌 *tcdA* 产毒基因”；

- c) C<sub>Y5</sub> 通道扩增曲线呈 S 型，且 Ct 值 ≤ 35，报告“检出艰难梭菌 *tcdB* 产毒基因”；
- d) 3 个荧光信号通道都无扩增曲线，报告“未检出艰难梭菌及其产毒基因 *tcdA* 和 *tcdB*”。