

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

益生菌调节生殖道微生物生态功效评价方法

Evaluation method for the efficacy of probiotics in regulating reproductive tract
microecology

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 一般要求 1

5 基本原理 1

6 试剂或耗材 1

7 样品 2

8 试验步骤 3

9 结果判定 3

10 试验报告 4

参考文献 5

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××××提出。

本文件由中国国际经济技术合作促进会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

益生菌调节生殖道微生态功效评价方法

1 范围

本文件规定了益生菌调节生殖道微生态功效评价的术语和定义、一般要求、基本原理、试剂或耗材、样品、试验步骤、结果判定以及试验报告。

本文件适用于益生菌对生殖道微生态调节的功效评价。

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/T 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生殖道 genital tract

与生殖相关的腔道。

注：通常指女性生殖道，一般包括下生殖道（宫颈、阴道、外阴）和上生殖道（子宫、输卵管、卵巢）。

3.2

生殖道微生态 genital tract microecology

由生活在生殖道中的细菌、真菌、病毒等微生物与它们生存的微环境共同组成的生态系统。

3.3

益生菌 probiotics

是指活的微生物，当摄取足够数量时，对宿主健康有益。

4 一般要求

4.1 人体生殖道微生态评估应当遵守伦理学原则要求，评估前应完成必要的产品安全性评价，确保在正常、可预见的情况下，不会对受试者的健康产生危害。

4.2 所有受试者应当签署知情同意后后方可开展试验，且应采取必要的医学防护措施，最大程度地保护受试者的利益。

4.3 试验期间，如受试者出现过敏、肿胀、不适等不良反应，应立即停止测试，并对受试者进行免费医治，对不良反应应予以记录。

5 基本原理

采集施予益生菌干预前后的生殖道微生态样本，基于16S rRNA和宏基因组测序技术，对生殖道样本提取后得到的基因进行文库构建和测序，比对数据库识别样本中所含微生物的种类和相对丰度的变化，评价益生菌是否具有调节生殖道微生态的功效。

6 试剂或耗材

- 6.1 无菌采样拭子。
- 6.2 采样管。
- 6.3 保存液。
- 6.4 DNA 提取试剂盒。
- 6.5 文库构建试剂盒。
- 6.6 高通量测序试剂。

7 样品

7.1 受试者要求

确保最终完成有效例数不低于30人，脱落人数不超过20%。

7.2 受试者条件

7.2.1 入选准则：

- a) 符合试验要求的健康志愿者和/或主要功效宣称的问题生殖道组；
- b) 充分理解试验过程，自愿参加试验并签署书面知情同意书者；
- c) 年龄在 18~55 周岁。

7.2.2 排除准则：

- a) 患有系统性疾病或近一个月内正在接受（抗肿瘤、抗生素、激素等）药物治疗的患者；
- b) 患有生殖道疾病并正在接受相关科室治疗的患者，或被判定为影响本项目功效评价的患者；
- c) 近一个月内参加过其他临床试验研究者；
- d) 试验负责人/研究医生判断为不适合参加本测试项目的人群。

7.3 益生菌干预

7.3.1 试验设计

益生菌干预试验需设置对照组进行研究。

7.3.2 益生菌的选用

根据益生菌产品形态或剂型，选择口服或阴道内使用的方式进行益生菌干预。

7.3.3 益生菌的剂量

根据益生菌产品标注的每日推荐使用量使用。

7.3.4 干预周期

根据益生菌产品使用说明进行使用，推荐使用期为30~60天，或根据疾病特点和临床经验设置合适干预时间。

7.3.5 采样

在干预前后分别进行生殖道分泌物采样。

- a) 用无菌采样拭子采取阴道口内4 cm内侧壁或后穹窿处分泌物。拭子取出后不应触及皮肤，避免污染；
- b) 取样完成后，样品保存按下列情况之一进行：
 - 1) 迅速将采样拭子放回采样管保存液中，折断拭子手柄部位，旋紧管盖密封，置于-80℃环境下保存，避免样本反复冻融；
 - 2) 迅速将采样拭子放回采样管中，折断拭子手柄部位，旋紧管盖密封，置于-80℃环境下保存，避免样本反复冻融；
 - 3) 如需后期细菌分离培养，保存液中加入甘油，将采样拭子放回采样管保存液中，折断拭子手柄部位，旋紧管盖密封，置于-80℃环境下保存，避免样本反复冻融。
- c) 记录采样样品的相应信息（样本编号、采样时间等）。

8 试验步骤

8.1 核酸提取

生殖道拭子在核酸提取前应进行释放，首先采用涡旋的方式充分释放拭子中的微生物，然后采用物理破碎（如珠磨、超声破碎等）或化学裂解的方式充分裂解微生物，释放核酸。
核酸提取操作应遵循试剂盒的操作说明，并在提取后进行质控。
生殖道样本提取的核酸包含大量宿主核酸片段，必要时可使用去宿主提取试剂盒去除宿主DNA。

8.2 文库构建

将样本提取DNA片段化后进行文库构建。
按照常规方式提取的核酸量一般满足常规建库试剂盒所需的起始量（>10 ng）要求，如不能满足时，再选择特殊建库方案（如微量DNA建库、超微量DNA建库等）。文库构建过程中的核酸片段化长度应依据测序平台而定，文库片段化方式可以选择物理法（如超声）或酶切法，建库操作应遵循建库试剂盒的操作说明进行，在文库构建完成后进行质控。

8.3 高通量测序

应选择合适的高通量测序平台和测序试剂对构建的文库进行测序，按GB/T 35537—2017中附录A执行。

8.4 数据处理

按GB/T 40226—2021中10.3的规定执行。

9 结果判定

9.1 评估指标

生殖道微生态结果宜从生殖道菌群多样性、生殖道优势菌属（相对丰度）、生殖道病原菌或条件致病菌属（相对丰度）、病毒（相对丰度）、其他致病微生物等指标进行评估，详见表1。

表1 测序结果相关评价指标

检测指标	具体评价指标
生殖道菌群多样性	香浓指数
	物种数量
生殖道优势菌属 （相对丰度）	乳酸杆菌属（卷曲乳杆菌、格氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、嗜性乳杆菌等）
	双歧杆菌属
生殖道病原菌或条件致病菌属 （相对丰度）	嗜性乳杆菌
	加德纳菌属
	普雷沃菌属
	链球菌属
	肠球菌属
	肠杆菌属
	假丝酵母菌属
病毒（相对丰度）	人乳头瘤病毒 HPV
	单纯疱疹病毒 HSV2
其他致病微生物	衣原体
	支原体

9.2 结果判定

干预前后：
a) 生殖道菌群多样性发生显著变化（ $p<0.05$ ）；

- b) 任一项生殖道优势菌属相对丰度发生显著升高 ($p < 0.05$) ;
 - c) 任一项生殖道病原菌或条件致病菌、病毒及其他致病微生物相对丰度发生显著降低 ($p < 0.05$) ;
- 满足以上任一指标,即可表明该益生菌产品具有调节生殖道微生态的功效。

10 试验报告

试验报告至少应包含下列内容:

- a) 受试益生菌产品所需的全部资料;
- b) 受试者信息;
- c) 检测机构名称、检测员、样品接收时间等;
- d) 高通量测序平台、测序策略以及对应的试验依据;
- e) 数据分析对应使用的注释方法、软件、参数和数据库版本等信息;
- f) 试验结果: 样本中生殖道相关微生物组成及相对丰度,可采用可视化多元展现方式;
- g) 试验结论: 根据统计结果得出益生菌产品是否具有调节生殖道微生态的功效;
- h) 检验者、校核人和技术负责人分别的签字以及检验单位公章。

参 考 文 献

- [1] GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
 - [2] GB/T 33681.1 高通量基因测序样本预处理方法 第1部分：动物组织样本预处理
 - [3] GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求
 - [4] GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范
 - [5] GB/T 40664 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求
 - [6] WS 628 消毒产品卫生安全评价技术要求
 - [7] 保健食品功能检验与评价技术指导原则（2022年版）
 - [8] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(supplement_1): 4680-4687.
 - [9] Ma B, Forney L J, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease[J]. Annual review of microbiology, 2012, 66: 371-389.
 - [10] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2014.
 - [11] Salminen S, Collado MC, Endo A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics[J]. Nature reviews Gastroenterology & Hepatology. 2021.
-