

· 指南与共识 ·

消化道微生态标准化样本库共识

中国医药生物技术协会组织生物样本库分会
中国医学装备协会消化病学分会微生物学组及生物样本库学组
中华医学会消化病学分会微生态、生物样本库与转化医学协作组

[摘要] 消化道微生态标准化样本库共识由中国医药生物技术协会、中国医学装备协会及中华医学会相关分会组织临床消化、伦理、消化道微生态研究、微生物组测序分析、生物样本库等多学科专家协同编订。主要针对消化道微生态研究相关样本的采集、制备、储存等标准化达成共识,包括粪便、黏膜组织、血液、胆道相关样本和口腔微生物样本,为促进消化道微生态研究的规范化与标准化提供指导。

[关键词] 消化道微生态;标准化;样本库;共识

[中图分类号] R57

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2018)04-0198-06

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2018.04.002

Consensus of standard biobanking of gut microbiome

Biobank Branch, China Medicinal Biotechnology Association

Committee of Biobanking Gut Microbiome, Chinese Association of Digestive Disease of Medical Equipment Committee of Gut Microbiome, Committee of Biobanking and Translational Medicine of Chinese Society of Gastroenterology

[Abstract] The consensus of standard biobanking of gut microbiota is organized by the Chinese Medical Biotechnology Association, the Chinese Medical Equipment Association of Digestive Disease and the Chinese Society of Gastroenterology to organize multidisciplinary experts such as clinical digestion, ethics, gut microbiota, microbiome sequence analysis, and biological sample library. The consensus is reached on the standardization of collection, preparation and storage of related samples of gut microbiota, including fecal, mucous tissue, blood, bile duct related samples and oral samples. The aim of this consensus is to provide guidance for regularization and standardization of gut microbiota research.

[Key words] Gut microbiota; Standardization; Biobank; Consensus

生物样本库主要是指标准化采集、处理、储存和应用健康和疾病生物体的器官、组织、细胞、血液、体液、分泌物、排泄物以及生物大分子衍生物等各种生物样本,以及与这些样本相关的临床、检验、病理、影像、治疗、随访、患者知情同意等信息,包括质量控制、信息管理与应用系统。

人类消化道生存着众多微生物,包括细菌、古生菌、真菌、病毒、原虫等^[1]。肠道微生物与宿主长期共同进化,构成肠道微生态,影响着宿主的健康。随着测序等高通量技术和生物信息学的发展,以消化道微生态(主要是细菌和真菌)样本为基础的研究将我们对消化道微生态的认知和应用向前推进了一大步^[2],成为国内外重要的研究热点。消化道微生

态样本的采集、制备、储存等是后续研究的第一步,对检测和分析结果有着重要的影响^[3]。统一标准、高质量的生物样本是研究数据真实性、可重复性、一致性以及整合数据和应用等的基础,也是进行基础和临床大数据研究的重要保障。消化道微生态样本可用于基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学、培养组学、营养组学、微生态移植、转化医学等多方面的研究。目前尚缺乏消化道微生态样本库构建的标准和规范,制订相关共识意见非常迫切和必要。

本共识意见主要针对消化道微生态研究相关样本的采集、制备、存储等标准化达成共识,包括粪便、黏膜组织、血液、胆道相关样本和口腔微生物样本。由临床消化、伦理、消化道微生态研究、微生物组测序分析、生物样本库等多学科专家组成工作组,通过检索 PubMed、Embase、Cochrane Library、中国期刊全

[通讯作者] 杨永生(中国人民解放军总医院消化内科), E-mail: sunny301ddc@126.com

文数据库、中文科技期刊全文数据库、万方全文数据库等,参考《生物标本采集技术规范及数据库建立指南》、《中国医药生物技术协会生物样本库标准(试行)》和《ISBER 生物样本库最佳实践 2018》,遵照我国原国家卫生计划生育委员会《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》(2016)、世界医学学会《赫尔辛基宣言》、国际医学科学组织委员会《涉及人类受试者的生物医学研究国际伦理准则》等,形成共识意见草案,经工作组共同修改、讨论而成。

1 范围与定义

本共识意见主要包括消化道微生态生物样本(粪便、消化道黏膜活检组织、血液、胆道相关样本、口腔微生物样本)的采集、制备、储存等流程和临床资源数据库管理的基本方法。

2 引文

下列文件为本共识的必需文件。凡是注明日期的引用文件,仅注明日期的版本适用于本共识。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本(包括所有修改单)适用于本共识。

GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写

GB/T 20000 标准化工作指南

GB/T 20001 标准编写规则

GB/T 12905-2000 条码术语

GB/T 17172-1997417 条码

GB/T 18347-2001128 条码

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 20269-2006 信息安全技术 信息系统安全管理要求

GB/T 22278-2008 良好实验室规范原则

CNAS-CL05-2009 实验室生物安全认可准则

WS/T224-2002 真空采血管及其添加剂

世界卫生组织 实验室生物安全手册 第3版

3 术语与定义

3.1 样本 指在特定时间从参与者中采集的器官、组织、分泌物、排泄物等标本。

3.2 生物样本库 指接收、储存、处理、分发样本的实体。样本库包含其地理位置以及与其运营相关的所有活动。

3.3 质量控制 指为使样本达到入库标准所采取的操作技术和活动。

3.4 样本编码 指根据编码规则对样本进行编号的过程。

3.5 实验室生物安全 指实验室的生物安全条件

和状态不低于允许水平,并符合相关法规和标准对实验室生物安全责任的要求,避免实验室人员、来访人员、社区和环境受到不可接受的损害。

3.6 质量管理体系 为实现质量管理的方针目标、有效开展各项质量管理活动,需建立相应的管理体系,这一体系即为质量管理体系。相关文件包括:质量手册、程序文件、标准操作规程和记录。

3.7 信息管理系统 指用于管理人类样本库所储存的生物样本及其相关临床、病理、随访、伦理审查、知情同意等信息的应用软件和硬件。

3.8 知情同意 获得样本捐赠者的知情同意是法律和伦理的重要原则和要求。指具有完全民事行为能力的人,在充分获取信息(包括研究性质、内容、风险、受益、持续时间等)并准确理解其内容后,作出是否参与研究的决定,此决定不受恐吓、利诱、压力或其他不当因素的影响。由于微生态样本库带给个体的风险较小,建议采用广泛同意模式,无需在未来研究中征求二次同意。

3.9 伦理审查委员会 建立消化道微生态样本库以及开展相关研究应提交相关单位伦理审查委员会审查,经批准后方可开展研究。该委员会的组成和一切活动不应受临床试验组织和实施者的干扰或影响。

4 标准化消化道微生态样本库设施、设备和安全管理

4.1 标准化消化道微生态样本库设施和设备 参考《中国医药生物技术协会生物样本库标准(试行)》和《ISBER 生物样本库最佳实践 2018》。

4.2 样本库人员安全 样本库操作人员日常要进行生物样本的采集、分装、入库、出库等操作,在此过程中面临各种风险,因此需做好个人防护,包括穿工作服、戴口罩、手套、帽子等,同时对样本操作中产生的废弃物应按照医疗废弃物管理条例进行处置。

4.3 样本库人员操作安全

4.3.1 超低温冰箱操作安全 超低温冰箱是样本库的主要冻存设备之一,属常规操作设备,样本库操作人员进行超低温冰箱操作时,必须佩戴手套,以防止冻伤。

4.3.2 液氮操作安全 样本库操作人员在液氮罐或取用液氮进行样本处理操作时,必须穿戴防护服,佩戴面罩或眼罩和手套,以防止冻伤。

4.3.3 干冰操作安全 样本库操作人员进行样本采集、分装和转运过程中可能会使用干冰降温,操作过程中需穿戴防护服、手套和口罩,尽量减少皮肤暴露。干冰操作应尽量在通风良好的环境中进行。

4.4 配备和维护有关设施、设备,保障样本安全

4.4.1 样本库安全设计 样本库设计时需考虑设

施和设备的安全。存放样本库的楼层需做加固处理,需准确计算存储设备满载后的最大负重。为确保样本存储冰箱正常工作,样本库需设置备用应急电路和制冷系统。

4.4.2 样本库设备定期维护 样本库超低温冰箱等冻存设备需做好监控记录,定期维护保养。对于重要的样本,建议在2台冰箱中分开储存,如有条件可进行异地备份储存。

4.4.3 样本库应急预案制订 样本库应制订尤其是超低温冰箱的应急处置预案,由样本库主管确保其实施。预案中需明确遇突发情况时冰箱钥匙的存放位置以及转运样本时所需的低温设备如转运盒、冰袋等,最大程度地降低样本库安全风险。

4.5 样本库数据安全

4.5.1 样本数据安全 样本信息是样本的重要组成部分,是关系样本质量的重要衡量指标,因此样本的信息安全至关重要。对于样本采集过程中常规登记的信息,需指定专人负责登记记录的保管;个人计算机或实验室共用计算机录入的样本电子信息,需对涉及捐赠者信息的文件进行密码保护和定期备份。

4.5.2 样本数据传递时的安全 在进行样本共享和转运时,会涉及样本信息的传递,样本库管理人员需对捐赠者和患者的隐私信息进行相关处理,如使用样本库编号,去除捐赠者和患者的其他个人身份信息。尽量避免将数据存放在移动存储设备中,必须通过U盘、移动硬盘或邮件传递时,需对数据进行加密处理,防止移动存储设备丢失或数据被截获造成的伦理风险。

5 伦理审批与知情同意

5.1 伦理审批 研究方案、样本采集方案、知情同意书等材料应经本单位伦理委员会批准同意后使用。此外,任何研究方案等文件的修改均须再次获得伦理委员会批准才能实施,同时按照我国相关法规和伦理委员会的要求及时递交其他跟踪审查文件。伦理委员会有权利全程监督和跟踪审查样本采集、储存、管理、分享、结果发布的全过程。

5.2 知情同意 人类消化道微生态样本库的工作人员应提前对风险与收益进行有效评估,确保样本参与者或其近亲属对项目信息充分知情、理解相关风险、形成全面和准确的认识,自愿作出是否同意的决定,然后签署知情同意书^[4-5]。另需明确告知样本提供者有拒绝的权利,不参与捐献样本不会影响其接受常规的医疗服务^[4-5]。

5.3 隐私保护措施 研究人员、医务人员应对样本

参与者的个人信息采取匿名化或编码处理,确保参与者的个人信息不被泄露。若有充分理由要求参与者提供个人信息,需提请伦理委员会批准。违反法律规定导致隐私信息泄露,应依法追究民事责任、行政责任和刑事责任。

5.4 安全保护 研究人员或相关医务人员在获取样本的过程中应尽量做到风险最小化,不增加样本参与者的额外风险,避免为获取样本而置样本参与者于危险之中。如样本参与者发生不良反应,应采取紧急处理措施对其进行救治。

6 消化道微生态样本库样本采集和管理

6.1 样本采集前处理 由于存在诸多宿主和环境因素会影响微生物群^[6],微生物组研究设计应考虑相关临床数据的收集^[7-8]。这些因素包括个人基本信息(性别、年龄、出生日期、居住地、居住环境、职业等)、医疗相关信息(既往史、抗菌药物、化疗药物和其他相关药物使用史、手术史、个人史等)、消化道微生态相关信息(饮食习惯、益生菌/益生元、食物补充剂、排便习惯、排便时间等)^[9]。应根据研究目标设计实用、高效的临床数据收集项目。

①对于已知危害的样本,根据世界卫生组织《实验室生物安全手册》的规定,做好相应级别生物安全水平的个体防护,严格按照操作规范进行操作。

②对于未知危害、被认为存在潜在感染性的样本,样本采集工作人员应根据可能的感染风险做好相应的防护措施。

③应根据样本类型和要求,尽可能提供洁净无菌的环境用于样本采集,避免样本污染。

④样本采集完成后应记录样本基本信息。样本基本信息主要包括:样本类型、采样量、样本编号等;黏膜组织样本采集时应按照《临床技术规范:病理学分册》对样本进行详细、清晰的描述。应记录样本捐赠者的个人基本信息、临床信息、随访信息等。个人基本信息主要包括:性别、年龄、身份证、居住地等;临床信息主要包括:捐赠者基本健康信息、既往史、家族史等;对于遗传疾病样本,还应记录捐赠者的家系信息如家族成员及其疾病史、成员婚配情况等。此外,对捐赠者的饮食习惯、生活环境状况等也需采集。

⑤采集工作人员应对整个采集过程进行记录,其中包括但不限于知情同意书、调查问卷以及容器编号、采集地点、采集方法、采集日期、样本采集各个步骤的时间和人员信息。

⑥样本相关信息的记录可以使用信息系统自带的记录功能,也可由工作人员填写表格进行记录。

⑦需考虑到生物样本和相关资料将用于基因组学、代谢组学、蛋白质组学等研究,其特殊性和可操作性都要兼顾。

6.2 消化道微生物样本采集和保存

6.2.1 粪便样本采集和保存

6.2.1.1 粪便样本的采集 采集容器需满足无菌、密封要求。建议采用专用采集装置^[8]。采集过程中应避免尿液等污染。

6.2.1.2 粪便样本的运输 粪便标本应立即冻存于 -80°C ,此为新鲜粪便样本保存的“金标准”^[10-12]。粪便保存装置内应保持厌氧环境^[13-14],厌氧环境装置不与粪便样本直接接触^[3]。为保证检测结果的准确性,建议采集后15 min内快速冻存或置于含保存液的密封容器内^[15]。应尽量缩短粪便标本排出体外后暴露于室温空气中至冻存的时间,有研究提示不应超过2 h^[3],但根据研究目的不同,2 h也可能会影响某些研究结果。

运输时间在24 h内,可以接受 4°C 冷藏运输,但受温度影响较大的微生物活性会降低甚至死亡,应根据研究目的确定是否采用^[16]。运输时间在24 h至1周内,应采用干冰运输。条件受限不能采用低温运输时,可采用以下室温保存方法临时保存,如:RNAlater 稳定液^[17]、95%乙醇^[17]、粪便隐血检测卡^[17]、无水乙醇^[18]、异硫氰酸胍溶液^[15]、冻干法^[18]。上述室温保存方法在用于测序以外的目的,如培养组学、蛋白质组学、代谢组学,应慎重考量该类保存方法对样本培养与检测结果的影响,权衡利弊后决定是否采用。此外,还可采用商业试剂盒,如OMNIgene·GUT等。

6.2.1.3 粪便样本的分装 粪便样本应等分、足量分装至冻存管等密封容器,超低温(-80°C)保存,避免反复冻融,以免DNA降解^[9]。分装时为避免空气对样本的影响,应尽量选取粪便标本内部未接触空气的部分^[16],每份标本质量不低于200 mg(去除食物残渣后)。标本质量为25 mg时可能不影响DNA提取和测序,但应谨慎采用^[10]。

6.2.2 消化道黏膜内镜活检样本和结肠灌洗样本采集和保存

6.2.2.1 内镜黏膜活检样本 根据研究目的采用选择性活检(最典型部位活检)或定位性活检(固定部位活检)^[19],为避免黏膜出血对活检标本的影响,同一部位需采集多个标本时应更换活检位置。采集时应避免黏膜组织被胃肠道内容物污染,BABD活检钳(Brisbane Aseptic Biopsy Device)能防止交叉污染^[20]。活检标本应及时放入无菌冻存管,转入 -80°C 冻存^[20]。

6.2.2.2 结肠灌洗样本 结肠灌洗标本可以替代结肠内镜活检样本用于消化道微生物研究^[21]。结肠镜检查前应多饮水冲洗肠道,检查前6 h行肠道准备,于乙状结肠处吸取5 mL无粪块污染的灌洗标本放入无菌冻存管,立即置于液氮或 -80°C 冻存。

6.2.2.3 血液样本采集和保存 细菌在人体外周血液各成分中的分布并不均匀^[22],建议选择全血标本。研究特定问题时,可根据研究目的选择合适的标本,包括全血、血沉棕黄层、血清、血浆、血细胞等^[22-23]。红细胞中细菌丰度变化较大,不应弃用^[22]。血液样本中微生物丰度较低,需注意标本采集、核酸提取和扩增、测序的各个步骤均可能造成污染,应予避免。血液标本采集、处理时应严格遵守操作规范,预防污染。标本采集、处理所用物品应采用相应方法(紫外线照射、选择性酶降解等)消除潜在的核酸污染。标本采集、处理步骤中应设置空白对照^[22,24-28]。应通过静脉穿刺采集,推荐使用肘正中静脉等污染率低的部位。建议阴性对照样本同时进行测序^[28]。

标本采集、处理后应直接冻存或加用RNAlater稳定液后转运至 -80°C 保存。为避免试剂、批次等因素对结果的影响,推荐集齐标本后再集中检测^[29],标本处理顺序应随机化。如为提取DNA后保存,应根据研究目的,采用相应的方法提取后,置于 -20°C ^[30]或 -80°C 保存^[23-27]。实验室无相应条件时,不建议进行进一步处理。标本应在解冻后12 h内进行检测,避免反复冻融。

6.2.4 胆道相关样本采集和保存

6.2.4.1 胆道黏膜样本 外科腹腔镜或开腹胆囊切除术后留取胆囊标本,以无菌水冲洗后及时冻存或放入RNAlater稳定液中,转运至 -80°C 冻存;或经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)途径以活检钳取胆管活检3~4块,标准程序获取的组织标本可被胃肠道内容物污染,应予注意,保存方法同前所述。

6.2.4.2 胆结石样本 经外科手术、ERCP等途径获取胆结石标本,以无菌水反复冲洗表面胆汁等附着物,自然风干后置入无菌瓶内, -80°C 冻存。

6.2.4.3 胆汁样本 经ERCP胆总管插管成功后,建议更换造影管,使用新的造影管接近十二指肠乳头开口,以无菌水冲洗(或以无菌水冲洗乳头切开刀)后插入胆道,采用无菌空注射器抽吸胆汁5~10 mL;或胆系疾病在外科手术中以无菌注射针穿刺抽取胆汁。吸取的样本立即放入无菌冻存管中,转入 -80°C 冻存。

6.2.5 口腔微生物样本采集和保存 应完整、详细

地记录口腔病史和诊疗、检查情况。取样前 30 min 以清水将口腔内杂物洗漱干净,勿再进食、饮水、吸烟等。

6.2.5.1 唾液样本 清水漱口后静坐 10 min。使用 50 mL 无菌离心管收集非刺激性唾液,唾液含于口中至少 1 min,然后吐到无菌离心管或含 DNA 稳定剂的样品保存管中,此过程可重复多次,最后收集 2~5 mL 样本。建议采用非刺激性唾液采集法,如采集有困难,可考虑采用刺激性唾液采集法^[31]。采集完成后将样本置于冰上,2 h 内转运至 -80 °C 冻存。含 DNA 稳定剂的样品短期内可常温保存。

6.2.5.2 口腔拭子样本 采用以无菌 0.9% NaCl 溶液或磷酸缓冲盐溶液润湿的无菌拭子取样。舌背部、腭扁桃体、咽喉部刮取 5 s,口腔黏膜、上颚、角质化牙龈刮取 10 s,避免触碰其他部位。样本刮取后立即封存于无菌冻存管置于冰上,2 h 内转运至 -80 °C 冻存或置于含 DNA 稳定剂的样品保存管内保存。

6.2.5.3 牙菌斑样本 分别记录取样部位:牙齿龈上或龈下牙菌斑。取样前干燥取样部位,使用口腔 Gracey 刮匙尽可能多地刮取牙菌斑(避免出血样本),将刮匙浸入含缓冲液的无菌离心管中 5 s,离心管置于冰上,2 h 内转运至 -80 °C 冻存。

7 消化道微生物样本编码

(1)使用标签、二维码或条形码的样本编码信息可包含样本编号、疾病和样本类型、采样部位、采样日期等。

(2)样本应有唯一的编号,但不能透露捐赠者信息。

(3)样本的储存信息、研究数据等应能通过唯一的样本编号关联到同一个样本上。

8 消化道微生物临床数据库与信息管理系统

(1)样本库应有统一、完整的信息系统或数据库,用于样本信息的记录和储存。

(2)所有样本信息(采集、处理、储存、使用信息、捐赠者相关信息)和临床信息均应记录于信息系统。临床资料应基于规范化的临床诊疗。临床治疗过程记录和随访资料应完整。

(3)样本库信息管理系统宜与其他相关数据系统(如样本采集医院的临床数据管理系统、其他样本库信息管理系统)兼容或关联,以便共享样本信息和数据。

(4)样本库数据管理系统应根据不同工作人员的职责设置不同管理和访问权限,以确保信息安全。

(5)样本库信息管理系统应满足样本追踪和检

索的需求。

(6)样本库信息管理系统应建立安全保障,防止黑客入侵、计算机病毒传播、数据损坏等意外情况。

(7)应根据实际需求制订备份周期,按周期对样本信息和数据进行备份,以应对信息和数据的意外损坏,并及时进行异地备份和历史备份。

执笔者:史以超,王子恺,杨云生

专家组单位和成员(按单位和姓氏拼音排序)

北京大学口腔医学院中心实验室(陈峰)

北京诺禾致源科技股份有限公司(李旭欢,刘文彬,麦茵)

大连医科大学微生态教研室(袁杰力)

河北医科大学第三医院儿科(张琳)

南方医科大学南方医院消化内科(陈焯)

上海嘉会国际医院消化内科(夏璐)

上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科(房静远)

上海芯超生物科技有限公司(华友佳)

上海张江生物银行(张可浩)

深圳华大生命科学研究院(李晓平,肖亮,邹远强)

深圳谱元科技有限公司(李少川,覃俊杰,杨仁涛)

生物芯片上海国家工程研究中心(郜恒骏)

同济大学医学院消化疾病研究所(何承志)

厦门大学医学院生命伦理研究中心(马永慧)

香港 Asia Microbiota Bank(Jon Chang 张建诚)

中国人民解放军军事医学科学院生物流行病学研究所(杨瑞馥)

中国人民解放军总医院临床生物样本库(赵秀梅)

中国人民解放军总医院消化内科(彭丽华,史以超,王子恺,杨云生)

郑州大学第五附属医院消化内科(郑鹏远)

【参考文献】

- [1] Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1449-1458.
- [2] 杨云生. 消化道微生物研究聚焦与展望 [J]. *中华内科杂志*, 2015, 54(5): 396-398.
- [3] Guo Y, Li SH, Kuang YS, et al. Effect of short-term room temperature storage on the microbial community in infant fecal samples [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26648.

- [4] Ma Y, Chen H, Lan C, et al. Help, hope and hype: ethical considerations of human microbiome research and applications [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(5):404-415.
- [5] Ma YH, Chen H, Lei RP, et al. Biobanking for human microbiome research: promise, risks, and ethics [J]. *Asian Bioeth Rev*, 2017, 9(4):311-324.
- [6] Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(4):279-290.
- [7] Flores R, Shi J, Gail MH, et al. Assessment of the human faecal microbiota: II. Reproducibility and associations of 16S rRNA pyrosequences [J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42(8):855-863.
- [8] Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research [J]. *Nature*, 2012, 486(7402):215-221.
- [9] Wu WK, Chen CC, Panyod S, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study-the journey from bathroom to bench [J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, pii: S0929-6646(17)30857-4. [Epub ahead of print]
- [10] Shaw AG, Sim K, Powell E, et al. Latitude in sample handling and storage for infant faecal microbiota studies: the elephant in the room? [J]. *Microbiome*, 2016, 4(1):40.
- [11] Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, et al. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e46953.
- [12] Fouhy F, Deane J, Rea MC, et al. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0119355.
- [13] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464(7285):59-65.
- [14] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457(7228):480-484.
- [15] Nishimoto Y, Mizutani S, Nakajima T, et al. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy [J]. *Gut*, 2016, 65(9):1574-1575.
- [16] Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10:206.
- [17] Vogtmann E, Chen J, Amir A, et al. Comparison of collection methods for fecal samples in microbiome studies [J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 185(2):115-123.
- [18] Blekhman R, Tang K, Archie EA, et al. Common methods for fecal sample storage in field studies yield consistent signatures of individual identity in microbiome sequencing data [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31519.
- [19] 中华医学会消化内镜学分会病理学协作组. 中国消化内镜活组织检查与病理学检查规范专家共识(草案) [J]. *中华消化杂志*, 2014, 34(9):577-581.
- [20] Shanahan ER, Zhong L, Talley NJ, et al. Characterisation of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota: a novel technique to prevent cross-contamination during endoscopic procedures [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(11):1186-1196.
- [21] Watt E, Gemmell MR, Berry S, et al. Extending colonic mucosal microbiome analysis-assessment of colonic lavage as a proxy for endoscopic colonic biopsies [J]. *Microbiome*, 2016, 4(1):61.
- [22] Païssé S, Valle C, Servant F, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing [J]. *Transfusion*, 2016, 56(5):1138-1147.
- [23] Merlini E, Bellistri GM, Tincati C, et al. Sequencing of bacterial microflora in peripheral blood: our experience with HIV-infected patients [J]. *J Vis Exp*, 2011(52):pii:2830.
- [24] Puri P, Liangpunsakul S, Christensen JE, et al. The circulating microbiome signature and inferred functional metagenomics in alcoholic hepatitis [J]. *Hepatology*, 2018, 67(4):1284-1302.
- [25] Wang L, Llorente C, Hartmann P, et al. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease [J]. *J Immunol Methods*, 2015, 421:44-53.
- [26] Bellot P, García-Pagán JC, Francés R, et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2010, 52(6):2044-2052.
- [27] Jeon SJ, Cunha F, Vieira-Neto A, et al. Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1):109.
- [28] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses [J]. *BMC Biol*, 2014, 12:87.
- [29] Vientós-Plotts AI, Ericsson AC, Rindt H, et al. Dynamic changes of the respiratory microbiota and its relationship to fecal and blood microbiota in healthy young cats [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0173818.
- [30] Mandal RK, Jiang T, Al-Rubaye AA, et al. An investigation into blood microbiota and its potential association with Bacterial Chondronecrosis with Osteomyelitis (BCO) in Broilers [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25882.
- [31] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome [J]. *Nature*, 2012, 486(7402):207-214.