《蚯蚓肠道病毒颗粒富集技术规范》
编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

1. 标准制定情况：本标准由南京农业大学牵头，联合有关科研院所和技术单位开展编制，按照中国土壤学会团体标准制定工作要求组织实施。标准以土壤蚯蚓完整肠道样品为对象，对病毒颗粒洗脱、过滤、富集和质量控制等操作作出统一规定。
2. 提出与归口单位：本标准由中国土壤学会提出并归口管理。
3. 制定依据：蚯蚓是土壤生态系统的重要组成部分，其肠道兼具宿主组织、肠腔内容物和黏液等不同组分，病毒颗粒富集涉及活体样品保存、体表去污、无菌解剖及多步骤前处理。为规范样品处理条件，统一不同实验室在肠道取样、颗粒洗脱、过滤浓缩和质量控制方面的操作要求，结合土壤动物生态学、环境病毒学和病毒组学研究需求，制定本技术规范。

（二）协作 / 起草单位

1. 牵头起草单位：南京农业大学。
2. 参编单位：中国科学院南京土壤研究所、中国科学院城市环境研究所、中国科学院生态环境研究中心、华东师范大学、南京大学、江苏省生态地质调查大队、江苏省海洋地质调查院。

（三）主要工作过程

1. 成立标准编制工作组

2025 年 3 月，由南京农业大学牵头成立《蚯蚓肠道病毒颗粒富集技术规范》标准编制工作组。编制组结合蚯蚓肠道病毒研究的技术需求，明确标准制定的主要任务、技术内容及人员分工，制定标准编制工作计划，并组织开展相关研究和技术资料收集工作。

2. 样品采集与肠道前处理方法研究

2025 年 9 月—11 月，南京农业大学土壤生态实验室在江西省不同地市的多种生境中开展蚯蚓样品采集工作，采集不同种类的活体蚯蚓，并将样品寄送至实

验室进行后续处理。针对不同来源的蚯蚓样品，开展体表清洗消毒、无菌解剖及完整肠道获取等工作，结合蚯蚓样品运输后的个体状态、肠道完整性及样品获取情况，对采集运输、体表处理和肠道获取等关键操作环节进行梳理，形成蚯蚓活体样品处理与完整肠道获取的基本技术流程，为标准中蚯蚓采集、保存运输及肠道样品前处理等技术要求的制定提供依据。

2025 年 12 月—2026 年 6 月，以威廉环毛蚓、赤子爱胜蚓的完整肠道样品为试验材料，围绕病毒颗粒洗脱、离心澄清、膜过滤和富集等关键步骤开展方法研究。通过比较不同的洗脱条件、过滤孔径及富集方法，结合病毒样颗粒计数、外源模式病毒加标回收及非病毒核酸背景检测等评价结果，分析不同处理条件对病毒颗粒回收与杂质去除效果的影响，确定关键技术参数，形成蚯蚓肠道病毒颗粒洗脱与富集的基本技术流程。

3. 标准起草与立项

2026 年 10 月初，标准编制组根据前期技术研究成果，结合相关文献及实验室操作经验，研究确定标准的基本框架、主要内容和关键技术要求，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》的要求编写形成标准草案及编制说明，并按照中国土壤学会团体标准制定程序提交立项申请。2026 年 10 月 22 日，根据立项函评专家评审同意立项，标准编制工作启动。

4. 征求意见与完善

标准立项后，编制组根据立项函评专家意见修改完善标准草案，完成征求意见初稿。2026 年 10 月 25 日，向 11 家单位专家征集意见，共收到反馈意见 44 项，其中采纳 41 项、部分采纳 3 项、未采纳 0 项。2026 年 11 月 5 日，编制组根据征集意见对标准文本逐条修订，完成征求意见稿和编制说明，提交中国土壤学会。

（四）起草组成员及其所做的主要工作

1. 孙明明：负责标准总体技术方案、章节框架与编写工作的组织协调，统筹研究对象、技术路线、质量控制要求及各轮修改稿的整合。
2. 范为宝、刘鹏、付玉豪、：负责蚯蚓采样点位与平行样方设置、活体个体筛选、低温运输、暂存和样品交接等内容，整理采集与运输记录要求。

3. 姜夏烨、王丹蕊、何尔凯：负责蚯蚓体表清洗与消毒、解剖器具灭菌、完整消化道分离、肠道样品称量及异常样品处理等条款，完善无菌解剖记录。
4. 范为宝、王超、陈林、徐明钻：负责病毒颗粒洗脱、肠道样品剪切与匀浆、离心澄清和分级过滤等技术内容，核对柠檬酸钾洗脱液使用条件及不同过滤路线的衔接。
5. 朱冬、李弘哲：负责超滤离心、切向流过滤、PEG 沉淀、膜组件预处理、核酸酶处理及富集液保存的技术条款，整理关键运行参数与过程记录要求。
6. 张宴、胡建：负责体表清洗空白、解剖空白、过程空白、独立平行样和外源模式病毒加标等质量控制内容，整理病毒回收率、VLP 计数、细菌及宿主核酸控制和实验室间验证要求。
7. 张文、吴世茂：负责相关标准及文献资料整理、术语和规范性引用文件校核、数据记录与结果报告条款编写，汇总专家意见并核对正文、附录及计量单位。

上述人员分工根据章节编写内容归纳，具体职责由起草组核定。

二、标准编制原则及主要内容确定依据

（一）编制原则

1. 规范编制原则：按照 GB/T 1.1—2020 规定的结构和起草规则组织标准内容，结合团体标准管理要求，规范术语、条款层次、引用文件及附录设置。
2. 科学性原则：以蚯蚓完整肠道样品中的病毒颗粒洗脱、除细胞、浓缩和游离核酸去除为技术主线，统筹考虑样品完整性、病毒颗粒回收和非病毒背景控制等因素。
3. 针对性原则：针对活体蚯蚓易受运输、排空和解剖操作影响的特点，规定低温运输、不排空处理、体表清洗消毒、完整肠道获取及各阶段样品独立处理的要求。
4. 实用性原则：选用体视显微镜、冷冻离心机、聚醚砜滤膜、超滤装置、切向流过滤系统及聚乙二醇沉淀等实验室常用条件，明确样品体积和处理量与富集路线的对应关系。
5. 全过程质量控制原则：设置体表清洗空白、解剖空白、过程空白、平行样和基体加标样，结合病毒回收率、病毒样颗粒计数及非病毒核酸检测，形

成覆盖样品采集至结果报告的质量控制体系。

6. 协调衔接原则：与 GB/T 6682、GB 19489、GB/T 27403 和 GB/T 6379.2 等文件相衔接，合理安排实验用水、生物安全、质量管理和实验室间验证等通用要求。

（二）标准核心内容及确定依据

本标准围绕“活体蚯蚓—完整肠道样品—病毒颗粒洗脱液—病毒样颗粒富集物”的操作过程，规定采集、运输、清洗、解剖、洗脱、过滤、富集、质量控制及记录报告要求。标准正文共十章，并设置四个附录。各章节主要内容如下：

1. 范围（第 1 章）

规定蚯蚓采集、保存、运输、体表清洗、解剖、肠道样品获取、病毒颗粒洗脱、富集、质量控制、数据记录和结果报告要求。适用于农田、森林、草地、湿地、污染场地及实验室培养蚯蚓的肠道病毒颗粒富集与样品制备。标准以完整消化道为基本处理对象，可供蚯蚓肠道病毒生态研究及后续病毒组分析的样品前处理使用。

2. 规范性引用文件（第 2 章）

引用 GB/T 6379.2《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》、GB/T 6682《分析实验室用水》、GB 19489《实验室生物安全通用要求》和 GB/T 27403《实验室质量控制规范》，作为方法评价、实验用水、生物安全和实验室质量控制的基础。

3. 术语、定义和缩略语（第 3 章）

设置土壤蚯蚓、蚯蚓肠道样品、病毒样颗粒、病毒颗粒洗脱、病毒颗粒洗脱液、病毒颗粒富集、超滤离心法、切向流过滤、聚乙二醇沉淀、病毒回收率、病毒样颗粒计数、外源模式病毒和病毒样颗粒富集物等术语，并对相关缩略语作统一规定。其中“蚯蚓肠道样品”指连续取出的完整消化道，包括肠壁、肠腔内容物、黏液及紧密结合物质。

4. 试剂与材料（第 4 章）

规定实验用水、预冷无菌水、磷酸盐缓冲液（PBS）、1% 柠檬酸钾洗脱缓冲液、1% BSA 溶液、DNase I、RNase I、EDTA、PEG8000 和 NaCl 等试剂，以及 0.45 μm、0.22 μm PES 滤膜、30 kDa PES 超滤膜和 0.02 μm 氧化铝计

数滤膜等材料。对无菌、低吸附、耐低温及与样品直接接触的耗材性能提出要求，为减少处理过程中的污染与颗粒损失提供条件。

5. 仪器和设备（第 5 章）

规定样方采集器具、体视显微镜、无菌解剖器具、恒温振荡器、组织剪切或匀浆装置、冷冻离心机、过滤系统、超滤装置、切向流过滤系统、荧光显微镜、核酸定量设备及低温保存设备等。设备配置同时考虑蚯蚓活体解剖和病毒颗粒浓缩的连续操作要求，并明确 4 ℃低温处理和关键仪器性能条件。

6. 蚯蚓采集、保存、运输和交接（第 6 章）

规定每个样点设置 3 个独立平行样方，样方规格为 1 m×1 m，采用手拣法采集 0 cm～20 cm 土层中的完整活体蚯蚓。每个样方的样品独立编号和保存；用于后续处理的完整活体蚯蚓不少于 5 条，总鲜重不低于 5.0 g。样品保持通气、避光和低温运输，运输温度为（4±2）℃，到达实验室后及时处理；采用不排空方式保留肠道原有样品组成。

7. 肠道样品获取与病毒颗粒洗脱（第 7 章）

规定蚯蚓体表清洗、消毒、无菌解剖、称样、剪切、洗脱、离心澄清及过滤操作。蚯蚓经冰上制动后，用预冷无菌水漂洗，以 75% 乙醇进行体表消毒，再用预冷无菌水去除残余乙醇。解剖时连续分离咽部后端至肛门端的消化道，并保留肠壁与肠腔内容物。每份样品称取肠道湿重 0.50 g，加入 5.0 mL 1% 柠檬酸钾洗脱缓冲液，经剪切、匀浆、低温振荡和离心澄清后获得过滤前洗脱液。

8. 病毒颗粒富集（第 8 章）

规定超滤离心、切向流过滤和聚乙二醇沉淀三种富集方法。常规超滤离心使用 30 kDa PES 膜组件，适用于过滤后体积小于 100 mL 的样品；同一独立平行样品扩大处理量后，过滤后体积达到 100 mL 及以上时，可采用切向流过滤；聚乙二醇沉淀用于经方法学确认适用的样品。富集后根据相应方法调整终体积，继续完成游离核酸去除及低温保存。方法选择与运行条件在表 1 中统一列示。

9. 质量控制（第 9 章）

规定体表清洗空白、解剖空白和过程空白设置；平行样品从体表清洗开始

独立处理；以完整外源模式病毒开展加标回收评价，并在使用前进行肠道基体适用性确认。质量控制内容包括外源模式病毒回收率、总 VLP 富集效果、细菌 16S rRNA 基因、宿主 COI 基因及游离核酸控制。通过方法学验证确定接受限，结合各项检测结果开展综合判定，并设置实验室间验证要求。

10. 数据记录与结果报告（第 10 章）

规定从采样、运输、解剖、洗脱、过滤、富集到保存的全过程记录要求，建立样品编号、平行样方、肠道样品、处理批次与保存位置之间的对应关系。结果报告包括样品信息、处理方法、关键操作参数、质量控制、异常情况和结果判定，统一采用蚯蚓肠道病毒样颗粒富集物等结果名称，便于样品管理与跨实验室交流。

11. 附录 A～D

附录 A 为资料性附录，提供样品基本信息、采样环境、运输交接、体表清洗、解剖、洗脱离心、过滤、富集、质量控制、异常情况和结果报告等记录表；附录 B 为规范性附录，规定病毒回收率计算方法；附录 C 为规范性附录，给出病毒样颗粒荧光计数方法及计数滤膜适用性确认要求；附录 D 为资料性附录，汇总常规操作参数，便于实施单位查阅。

（三）主要技术参数的论据与设置思路

1. 活体采集与低温运输：采用独立样方采样、活体运输和低温暂存相结合的方式，保留肠道样品的连续性。规定（4±2）℃运输、24 h 内送达实验室和到样后 12 h 内完成清洗解剖，并在交接记录中列明样品状态和运输条件，以保持不同批次处理过程的一致性。
2. 完整肠道与洗脱液料比：以咽部后端至肛门端连续取得的消化道为样品，保留肠壁、肠腔内容物与黏液。常规处理按每 0.50 g 肠道样品加入 5.0 mL 1% 柠檬酸钾缓冲液，相当于 10 mL/g；扩大处理量时仍保持相同液料比，便于记录和比较。
3. 剪切、匀浆与振荡：将肠道样品剪成 2 mm～5 mm 小段，在冰上以 3000 rpm 轻柔匀浆 1 min，再于 4 ℃、400 rpm 振荡 15 min。该操作以适度机械分散促进肠道相关病毒颗粒进入洗脱液，同时兼顾颗粒保留和组织碎片控制。

4. 离心与过滤：洗脱液在 4 ℃、5000×g 条件下离心 10 min，通常连续进行两次；后续通过 0.45 μm 和 0.22 μm PES 滤膜去除细胞及粗颗粒。针对较大粒径病毒颗粒保留需要，设置经 0.45 μm 过滤后进入富集步骤的处理路线，并配套 16S rRNA 和 COI 基因的污染评价。
5. 富集方法选择：超滤离心适于常规小体积洗脱液，切向流过滤适于同一平行样品扩大处理后的较大体积洗脱液，聚乙二醇沉淀用于经适用性确认的样品。三种路线分别规定膜截留、预处理、运行压力、孵育离心及富集后体积，并要求可比样品采用一致的处理条件。
6. 病毒回收率与 VLP 计数：附录 B 采用 $R=(C_2\times V_2)/(C_1\times V_1)\times 100\%$ 的计算方式，外源模式病毒以特异性核酸定量或效价测定评价；总 VLP 采用荧光显微镜计数或经平行校核的流式细胞法评价。两类检测分别提供过程回收和颗粒数量信息，共同用于判断富集效果。
7. 游离核酸去除与样品保存：富集液在病毒颗粒裂解前进行 DNase I、RNase I 联合处理，并以 EDTA 终止反应。处理后的样品按使用量分装，短期于 4 ℃避光保存，长期于−80 ℃保存；保存、分装、冻融和异常情况纳入完整记录。

三、试验验证分析、技术经济论证、预期综合效益

（一）主要试验验证综述报告

本标准采用的采样、解剖、洗脱、过滤和富集方法，具有环境病毒研究和蚯蚓肠道样品前处理的技术基础。方法验证围绕代表性蚯蚓肠道基体、过滤及富集路线、病毒回收率、病毒样颗粒计数和污染控制等内容组织，主要考察关键参数的可操作性、不同批次结果的一致性及各类质量控制样品的适用情况。具体评价内容如下：

1. 代表性样品与取样条件：选取不同采样环境或实验室培养来源的蚯蚓，记录物种、个体数量、体长和鲜重，按独立平行样方进行样品处理。结合到样状态、运输温度与时间，对活体保存、体表清洗和完整肠道解剖条件进行评价。
2. 体表清洗和无菌解剖：设置体表清洗空白与解剖空白，考察预冷无菌水漂洗、乙醇消毒及器具灭菌等操作的污染控制效果；记录肠道完整性、肠腔

内容物保留情况和实际样品湿重，保证前处理阶段的样品可比性。

3. 洗脱与离心条件：按 0.50 g 肠道样品加入 5.0 mL 柠檬酸钾缓冲液，比较剪切、轻柔匀浆和低温振荡后的病毒颗粒洗脱情况，并结合两次 5000×g 离心澄清后的上清状态、VLP 计数和外源模式病毒回收情况评价洗脱效果。
4. 过滤步骤评价：分别评价 0.45 μm 预过滤与 0.22 μm 终过滤的过滤通畅性、滤膜更换、VLP 保留和细胞背景控制；对采用 0.45 μm 保留路线的样品同步开展细菌 16S rRNA 基因和蚯蚓 COI 基因检测，形成相应的污染控制记录。
5. 超滤离心和切向流过滤评价：围绕 30 kDa PES 膜组件、1% BSA 预处理、低温运行及终体积控制，比较不同样品处理量的回收情况。切向流过滤重点考察 35 kPa～50 kPa 跨膜压力、系统冲洗和保留液回收操作的稳定性，并设置系统空白。
6. 聚乙二醇沉淀法评价：采用 10% PEG8000、0.5 mol/L NaCl 和 4 ℃孵育 16 h 的处理条件，记录离心收集、沉淀重悬及后续超滤换液情况，以富集前后颗粒数量和外源模式病毒回收率评价其在代表性肠道样品中的适用情况。
7. 核酸酶处理与保存评价：采用 DNase I 和 RNase I 联合处理，检测处理前后游离核酸信号变化，并记录外源模式病毒回收情况；结合 4 ℃短期保存、−80 ℃分装保存和一次解冻使用等要求，对富集液保存与样品管理流程进行评价。
8. 质量控制与方法一致性评价：通过体表清洗空白、解剖空白、过程空白、独立平行样品和外源模式病毒加标样品，分析回收率、重复性及非病毒核酸背景。必要时采用统一样品或等效质量控制材料开展实验室间比对，考察方法重复性与再现性。

试验验证记录宜包括样品来源、样本数量、处理批次、平行设置、检测方法、外源模式病毒种类、VLP 计数结果、回收率、相对标准偏差及异常处置情况。有关试验结果、原始记录和统计材料应与标准技术条款相对应，作为方法确认与实施应用的依据。

（二）技术经济论证

1. 技术成本：本标准采用的低温运输、无菌解剖、恒温振荡、冷冻离心、膜过滤和核酸酶处理均为科研实验室较常见的操作。常规小体积样品采用超滤离心，扩大处理量样品可采用切向流过滤，聚乙二醇沉淀作为经方法学确认的富集方式，以满足不同样品处理规模的需要。
2. 试剂与耗材可获得性：PBS、柠檬酸钾、BSA、PEG8000、NaCl、核酸酶、聚醚砜滤膜及低吸附离心管等为常用实验材料。标准以性能和技术参数规定耗材要求，方便实施单位结合实验室条件选用符合要求的产品。
3. 工作效率：样品采集、活体运输、体表清洗和无菌解剖按统一步骤实施，可提高批量样品处理的衔接效率。洗脱液料比、过滤方式和富集终体积的统一设置，有利于减少不同操作者之间的操作差异，便于开展同批平行样和跨批次比对。
4. 技术实施条件：本标准在样品获取阶段强调体视显微镜下的无菌操作，在富集阶段采用可替换的三类技术路线，并配套空白、平行及加标质控。各实施单位可按所采用路线配置相应设备，结合方法学确认记录开展质量管理和人员培训。

（三）预期效益

1. 科学研究效益：统一蚯蚓完整肠道样品的获取和病毒颗粒富集方法，为不同生境、不同蚯蚓类群及实验室培养条件下的肠道病毒研究提供一致的前处理技术基础，有利于病毒组学和土壤动物—微生物相互作用研究。
2. 质量管理效益：通过设置体表清洗空白、解剖空白、过程空白、独立平行样和外源模式病毒加标样品，配合病毒回收率及非病毒核酸控制评价，强化样品处理过程的质量管理与结果追溯。
3. 应用效益：将野外采样、活体运输、无菌解剖、洗脱过滤、富集保存和结果报告纳入统一流程，可为农田、森林、草地、湿地和污染场地的蚯蚓肠道病毒调查及实验室研究提供规范化操作依据。
4. 经济与协作效益：统一试剂材料、关键参数和记录格式，有利于减少重复优化和样品重复处理，提高多单位合作研究的样品可比性，并促进相关实验室在操作规程、人员培训和质量控制方面的协调。

四、与国际、国外同类标准技术内容对比情况

（一）国外相关标准现状

1. 环境样品相关技术文件：国外有关环境微生物与病毒分析的技术文件主要涉及样品前处理、核酸提取及实验室方法评价等内容，对样品管理、污染控制和检测方法确认具有参考价值。
2. 肠道病毒研究方法：国外肠道病毒组和噬菌体组研究中，过滤、超滤、切向流过滤、聚乙二醇沉淀及核酸酶处理等方法已有应用，并采用噬菌体加标或颗粒计数评价处理效果，为本标准有关技术条件的选取提供了方法参考。

（二）技术差异对比

1. 样品对象：本标准以活体蚯蚓为采样对象，采用无菌解剖方式获取完整肠道样品。与直接处理土壤、粪便或水体样品的病毒富集流程相比，增加了蚯蚓状态筛选、体表清洗消毒、肠道解剖和样品湿重控制等操作。
2. 样品前处理：本标准规定每份 0.50 g 肠道样品配用 5.0 mL 柠檬酸钾洗脱缓冲液，采用轻柔匀浆、低温振荡、离心澄清和两级膜过滤，适应蚯蚓肠道组织与内容物共同存在的样品组成。
3. 富集方式：针对常规单份样品和扩大处理量样品，分别规定超滤离心和切向流过滤的适用条件，并设置经方法学确认的聚乙二醇沉淀路线。对膜截留分子量、预处理、终体积和核酸酶处理作出统一规定，便于不同技术路线的操作衔接。
4. 质量控制：本标准将体表清洗空白、解剖空白和过程空白同时纳入质量控制，设置独立平行样品及完整外源模式病毒加标评价，并结合 VLP 计数、16S rRNA 基因、宿主 COI 基因和游离核酸检测，对富集过程进行综合评价。

五、采用国际标准情况及未采用原因说明

1. 本标准为自主制定的中国土壤学会团体标准，未等同采用或修改采用某一项完整国际标准。
2. 现有相关国际技术文件主要面向环境核酸提取、一般微生物分析或其他介质的病毒检测。本标准结合蚯蚓活体取样和完整肠道样品处理的特点，参

考其中适用的技术原则，形成相应的病毒颗粒富集和质量控制要求。

六、与法律法规、现行相关标准的协调关系

（一）与法律法规协调

1. 本标准作为中国土壤学会团体标准，在制定与实施过程中遵循《中华人民共和国标准化法》和团体标准管理的有关规定。
2. 蚯蚓样品采集、实验室操作、个人防护和废弃物处置按照有关管理制度实施，样品处理中的生物安全风险评估、锐器使用和污染物处置与实验室管理要求相衔接。
3. 本标准规定的是蚯蚓肠道病毒颗粒富集及其质量控制技术，可与现行土壤生态调查、科研样品管理和实验室质量体系等要求配合使用。

（二）与国家标准协调

1. GB 19489《实验室生物安全通用要求》：第 7 章关于操作区域、个人防护、器具消毒、样品泄漏及污染废物处理等要求与该标准衔接。
2. GB/T 6682《分析实验室用水》：第 4 章规定实验用水符合相应等级要求，并据此配制无菌水、PBS 和柠檬酸钾洗脱缓冲液等试剂。
3. GB/T 27403《实验室质量控制规范》：第 9 章设置空白、平行、加标回收、污染控制及过程异常处置等要求，开展全过程质量管理。
4. GB/T 6379.2《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》：第 9.8 节采用统一样品或等效质量控制材料开展实验室间验证，评价方法重复性与再现性。

（三）与行业及国际相关文件协调

1. 土壤生态与样品采集相关技术文件：在蚯蚓采集、样方设置、样品编号及环境信息记录方面，借鉴生态调查和环境样品管理的一般原则，并结合活体蚯蚓运输和完整肠道解剖要求作出具体规定。
2. 病毒颗粒富集与核酸检测相关技术文件：在膜过滤、病毒颗粒计数、特异性核酸定量和外源模式病毒加标方面，参考环境病毒分析的方法原则，并按 DNA、RNA 模式病毒的检测特点分别设置核酸定量方式。

本标准通过采样、解剖、洗脱、过滤、富集及质量控制的系统规定，与相关法律法规、国家标准和实验室技术文件形成协调衔接，为蚯蚓肠道病毒样品制备

提供统一的操作依据。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

（一）立项函评与征求意见阶段意见处理

1. 关于样品名称和术语的意见：专家建议统一“肠道样品”“肠道内容物”等表述。起草组对第 3 章术语和正文用语进行了核对，采用“蚯蚓肠道样品”作为完整消化道样品名称，明确其组成，并将相应名称用于采样记录、洗脱处理及结果报告。
2. 关于过滤与富集路线的意见：专家建议结合病毒颗粒粒径和样品特点完善过滤孔径及富集方法选择。起草组在第 7 章规定 0.45 μm 预过滤与 0.22 μm 终过滤，在保留较大颗粒时设置 0.45 μm 过滤路线，并于第 8 章明确三种富集方法的适用条件和相互衔接。
3. 关于样品处理量及工艺参数的意见：专家建议进一步明确不同处理量下的富集条件、膜材料和关键参数。起草组在表 1 和第 8 章中对常规超滤、扩大处理量时的切向流过滤以及聚乙二醇沉淀分别规定技术要求，并对实际参数记录和方法确认作出安排。
4. 关于外源模式病毒的意见：专家建议统一加标样品的术语及检测方式，重视外源病毒在肠道基体中的适用性。起草组在第 3 章设置相关定义，在第 9 章规定完整颗粒加标、基体适用性确认及 RNA、DNA 模式病毒相应的核酸定量方法。
5. 关于质量控制的意见：专家建议完善过程空白、平行样品、病毒回收率和非病毒核酸控制。起草组明确各类空白设置及相应检测方式，规定加标回收、VLP 计数、16S rRNA 基因、COI 基因和游离核酸评价要求，并将接受限与方法学验证相结合。
6. 关于生物安全与样品记录的意见：专家建议补充个人防护、外源污染控制、关键操作参数和全过程记录。起草组在第 7 章增加生物安全防护要求，在第 9 章规定外源污染控制，并完善附录 A 的采样交接、富集保存、质量控制和异常情况记录表。
7. 关于实验室间验证和文本规范的意见：专家建议增加不同实验室之间的方法评价，并统一正文与附录的表述。起草组增列第 9.8 节，明确统一样品

或等效质量控制材料的使用要求；同时对规范性引用文件、结果报告、计量单位、交叉引用和资料性附录进行整理。

（二）当前尚需进一步论证的事项

1. 代表性蚯蚓肠道基体的方法确认：结合不同来源和不同个体条件的肠道样品，开展过滤、超滤离心、切向流过滤及聚乙二醇沉淀等步骤的回收率和重复性评价，积累方法应用资料。
2. 质量控制指标的应用评价：结合外源模式病毒加标、独立平行样品、VLP计数和非病毒核酸检测结果，形成各项质量控制指标的评价记录，并用于确定适宜的接受范围。
3. 实验室间验证与参数应用：利用统一样品或等效质量控制材料，开展不同实验室的处理与检测结果比较，进一步积累重复性、再现性和关键操作参数的应用资料。

（三）总体说明

有关专家意见主要涉及样品对象、术语使用、过滤与富集方式、外源模式病毒、质量控制、生物安全和记录报告等方面。起草组依据意见对有关条款进行了补充和完善，标准技术流程及质量管理要求进一步明确。

八、涉及专利的有关说明

1. 本标准采用的体表清洗、无菌解剖、柠檬酸钾洗脱、膜过滤、超滤离心、切向流过滤、聚乙二醇沉淀、核酸酶处理及病毒样颗粒计数等，均属于环境病毒研究和实验室样品前处理中常见的技术方法。
2. 标准前言按照团体标准编写要求设置专利相关提示，实施中涉及知识产权事项时，依照有关管理规定办理。
3. 标准制定和实施过程中，对相关技术所涉及的专利信息开展必要核查，并结合实际采用的设备、膜组件及试剂产品的使用条件落实知识产权管理要求。
4. 对实施本标准所需使用的专利技术或产品，由实施单位依据有关规定确认使用条件，保证标准应用与现行知识产权管理制度相协调。

九、标准实施要求、组织 / 技术措施及过渡期建议

（一）实施组织措施

1. 标准发布后，建议由中国土壤学会组织科研院所、高等学校和有关检测机构开展标准宣贯，重点介绍蚯蚓活体采集、体表清洗消毒、完整肠道解剖、病毒颗粒富集及质量控制等操作要求。
2. 建议起草单位结合科研和技术服务工作开展操作培训，围绕洗脱、过滤、超滤离心、切向流过滤及聚乙二醇沉淀等环节提供技术交流与方法应用指导。
3. 鼓励具备相关实验基础的单位开展标准试用和方法比对，采用统一样品、外源模式病毒或其他适宜的质量控制材料，积累方法应用与实验室间评价资料。

（二）技术保障措施

1. 配套整理蚯蚓采集交接、体表清洗、无菌解剖、洗脱过滤、富集保存和质量控制等操作记录表，指导实施单位按照附录 A 建立完整的样品处理档案。
2. 建议结合代表性蚯蚓肠道样品开展方法学确认，对外源模式病毒回收、过滤孔径、富集方式、检测限及质量控制接受范围等形成相应的实验室作业文件。
3. 对超滤离心、切向流过滤和聚乙二醇沉淀分别保存设备运行记录，按照第 9 章设置空白、平行和加标回收等质量控制样品，保持样品编号与检验记录的对应关系。

（三）过渡期与实施日期建议

1. 建议标准发布后设置 6 个月过渡期，供实施单位完成仪器状态确认、人员培训、实验室内部方法确认及记录表应用等准备工作。
2. 过渡期内可将实验室原有处理流程与本标准规定的方法开展平行比对，重点比较外源模式病毒回收率、VLP 计数、平行样重复性和非病毒核酸控制等指标。
3. 标准实施日期由中国土壤学会根据团体标准发布安排确定。实施单位可结合科研项目、实验室质量体系和人员培训情况组织应用。

（四）配套实施建议

1. 配套文件：建议提供完整的电子记录表、样品编号与追溯模板、质量控制记录表以及方法学确认报告样式，便于实施单位使用。
2. 能力建设：鼓励相关单位完善体视显微镜、低温操作、冷冻离心、膜过滤、病毒样颗粒计数和核酸定量等基础条件，建立无菌器具管理和过程质量控制制度。

十、其他应予说明的事项

1. 标准属性：本标准属于中国土壤学会推荐性团体标准，适用于科研和相关技术单位开展蚯蚓肠道病毒颗粒富集与样品制备。
2. 附录性质：附录 A“蚯蚓肠道病毒颗粒富集数据记录表”和附录 D“蚯蚓肠道病毒颗粒富集常规操作参数”为资料性附录；附录 B“病毒回收率计算方法”和附录 C“病毒样颗粒计数方法”为规范性附录。
3. 标准复审：建议标准实施后，由中国土壤学会结合方法应用、实验室间验证和有关技术进展，按规定程序适时组织标准复审。
4. 数据和记录管理：样品基本信息、操作记录、质量控制数据及结果报告按照第 10 章归档，并依据科研项目和实施单位的档案管理制度确定保存期限及使用方式。