

ICS 11.100

CCS C 05

CITS

团 体 标 准

T/CITS 257—2025

微生物快速鉴定 质谱法

Rapid identification of microorganisms—Mass spectrometry method

2025-02-17 发布

2025-02-17 实施

中国检验检测学会 发布

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 仪器与试剂	1
5 试验要求	2
6 结果报告	3
7 质量控制	4
8 操作安全	4
9 数据库更新	4
附录 A（资料性） MS 鉴定结果报告类型	6
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。

本文件由北京市朝阳区疾病预防控制中心和国军标（北京）标准化技术研究院提出。

本文件由中国检验检测学会归口。

本文件起草单位：北京市朝阳区疾病预防控制中心、国军标（北京）标准化技术研究院、北京实安科技有限公司、中日友好医院、北京大学人民医院、解放军总医院第一医学中心、北京医学检验学会、北京中检体外诊断工程技术研究中心、海口佳新益科技有限公司、海南医学院海南省创伤与灾难救援研究重点实验室、湖北省临床检验中心、上海健康医学院、威海市立医院、通标伟业（北京）标准化技术研究院。

本文件主要起草人：孙灵利、刘洁、刘万阳、李娜、戴其全、马亮、华文浩、段晋燕、陈刚、穆红、王超、于法标、郭小曼、王明义、马淑青、王大利、王燕。

微生物快速鉴定 质谱法

1 范围

本文件规定了采用质谱法进行微生物鉴定的仪器与试剂、试验要求、结果报告、质量控制、操作安全和数据库更新的要求。

本文件适用于公共卫生、临床检验、食品检测、环境检测等领域利用质谱法进行微生物快速鉴定。

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 4789.10—2016 食品安全 国家标准食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18204.3—2013 公共场所卫生检验方法 第3部分：空气微生物

GB 19489 实验室生物安全通用要求

WS/T 807 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性能验证

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

质谱法 mass spectrometry; MS

通过测定带电离子质量/电荷比 (m/z ，简称质荷比) 而进行定性、定量检测的一种现代分析技术。

4 仪器与试剂

4.1 实验室应配备微生物质谱鉴定的仪器设备，包括但不限于：

- a) MALDI-TOF MS 质谱仪；
- b) 离心机；
- c) 恒温培养箱；
- d) 涡旋振荡器；
- e) 移液器；
- f) 生物安全柜；
- g) 接种环；
- h) 靶板；

i) 灭菌设备。

4.2 实验室应配备但不限于以下试剂：

- a) 甲酸 (HCOOH)；
- b) 乙腈 (CH₃CN)；
- c) 乙醇 (CH₃CH₂OH)；
- d) 血琼脂培养基：按照 GB 4789.10—2016 中 A.2 的规定执行；
- e) 沙氏琼脂培养基：按照 GB/T 18204.3—2013 中 4.2.2.1 的规定执行；
- f) 标准菌株：ATCC8739 大肠埃希氏菌 (Escherichiacoli)。

注：除非有特殊说明，试剂配制仅使用色谱纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5 试验要求

5.1 菌株准备

5.1.1 应采用新鲜培养的单个菌落，微生物培养时间见表 1。

表 1 不同类型微生物培养时间

微生物种类	不同微生物培养时间
细菌和酵母菌	需氧革兰阴性 (G ⁻) / 阳性细菌 (G ⁺)：18 h~24 h
	苛养菌及厌氧菌：24 h~72 h
	酵母菌：18 h~24 h
丝状真菌	快生长：2 d~8 d
	慢生长：5 d~25 d
分枝杆菌 (固体培养基)	快生长：3 d~7 d
	慢生长：7 d~28 d
分枝杆菌 (液体培养基)	阳性后继续培养：24 h~72 h
诺卡菌	24 h~72 h

5.1.2 细菌宜选用血琼脂平板培养基，真菌宜选用沙氏培养基。

5.1.3 宜使用固体培养基；如果使用液体培养基，应在分析前进行富集及洗涤操作，用纯培养物进行检测。

5.1.4 冻存菌株应传代 2 次后使用。

5.1.5 微生物前处理方法见表 2。在各个 MALDI-TOF MS 上的微生物前处理方法应由生产商进行验证并提供。

表 2 不同微生物适用的前处理方法

细菌类型	处理方法	流程
G ⁻ 细菌	直接涂抹法	涂菌后直接覆盖基质溶液
G ⁺ 细菌	直接涂抹法	涂菌后直接覆盖基质溶液 (部分细菌)
	原位甲酸取法	涂菌后用相应浓度的甲酸处理，再覆盖基质液
酵母样真菌	原位甲酸提取法	使用相应浓度的甲酸处理后再添加基质液，不同型号仪器系统使用的甲酸浓度可能不同，具体需遵照说明书信息

表 2 不同微生物适用的前处理方法（续）

细菌类型	处理方法	流程
丝状真菌	乙醇灭活+甲酸, 乙腈提取	先用乙醇灭活后再分别使用 70%甲酸和 100%乙腈进行提取, 离心, 取上清液涂肥板后, 要盖基质液
分枝杆菌/诺卡菌	硅珠破壁+甲酸、乙腈提取	用乙醇辅以 0.5 mm 直径的硅珠震荡破壁, 再分别使用 70%甲酸和 100%乙腈进行提取、离心, 取上清液涂板后, 覆盖基质液
分枝杆菌（液体培养）	液体培养直接提取	液体培养报阳后, 继续培养 24 h~72 h, 经离心去上清后, 对沉淀物使用硅珠破壁+甲酸乙提取的方法

5.2 靶点点样

5.2.1 应先将质控菌株/蛋白标准品点在靶板相应孔位, 再点处理好的待测菌落。应使用一次性接种环或无菌竹签轻轻涂抹, 使菌苔在靶点上形成一层均匀的薄膜。

注: 涂抹的菌量太少, 可造成分析信号不足, 导致鉴定失败; 涂抹菌量过多或涂布不均匀, 也可导致无法鉴定。在涂布时宜覆盖整个靶点区域, 超出靶点区域易造成交叉污染。

5.2.2 点样后加入基质液, 应完全干燥形成结晶后再进行检测。

5.2.3 靶板准备完成后, 如为细菌或酵母菌, 应在 48 h 内完成检测; 如为分枝杆菌, 应在 4 h 内完成检测; 如曲霉菌等丝状真菌, 应 5min 内完成检测。

5.2.4 菌株处理时耗材应洁净无污染, 用于涂布靶板的一次性接种环等工具不应重复使用, 滴加基质液的移液器吸头在每涂完一个靶点后应进行更换。

5.3 试验流程

5.3.1 定标校准

5.3.1.1 每批次检测前, 应先使用定标品将关键的仪器参数调整到最佳检测状态。

5.3.1.2 可选以下定标品, 或选用制造商建议的标准菌株:

- a) ATCC 标准菌株 (如大肠埃希菌 ATCC8739);
- b) 细菌检测标准品 (bacteria test standard, BTS)。

5.3.2 靶板载入

应待靶板完全干燥后将靶板载入真空仓, 装载或取出靶板的过程中应戴无粉乳胶手套。

5.3.3 图谱获取

5.3.3.1 将样品靶板放入仪器内, 设定合适的激光能量, 质谱扫描范围等参数, 开始质谱数据采集。

5.3.3.2 图谱的获取由系统按照标准采集路径进行, 如果使用手工采集, 应获取足够多的数据后再进行分析。

6 结果报告

6.1 MS 鉴定结果在报告之前, 应由微生物专业人员进行审核, 审核过程中可结合样本来源、染色结果、形态学、培养条件等特征对结果的准确性进行评判。

6.2 MS 检测可得到以下几种鉴定结果:

- a) 高置信的鉴定结果;
 - b) 多个鉴定结果, 且每个结果的置信度相似;
 - c) 无鉴定结果。
- 6.3 根据具体情况, 应鉴定到微生物的属、种或亚种水平, 并标注置信度等。
- 6.4 不同 MS 系统结果的判读方式应参考制造商的说明, 参见附录 A。

7 质量控制

- 7.1 应对操作人员进行初次和定期(至少 6 个月一次)培训以及能力考核, 培训的内容包括原理方法、信息技术、仪器维护、结果报告与解释等, 应对培训者进行人员比对和/或考核, 确保不同操作人员鉴定的一致性。
- 7.2 质谱仪应具备稳定的性能, 符合相关认证标准和制造商宣称能达到的指标。在引入新系统时, 应对试剂、数据库、分析软件和硬件等进行全面验证后再使用, 验证方案可依据 WS/T 807。
- 7.3 检测前仪器应进行自身校准, 校准通过后方可进行后续鉴定。
- 7.4 应按照制造商的标准操作程序(standard operating procedure; SOP)文件要求, 在靶板清洗、基质溶液及标准品溶液配制后每次进行阴性及阳性对照的质量控制, 每次病原体鉴定时都应重复相同操作。
- 7.5 阳性质控和阴性质控应与每日检测的标本同时进行, 并将每日的质控结果进行记录。在失控期间, 应暂停使用系统进行常规临床样本的检测, 直至找出问题的原因, 解决后通过质控。
- 7.6 阳性对照应设置有临床代表性的标准菌株, 阳性质控菌株的选择应根据实验室的检测范围进行。
- 7.7 阴性对照应使用空白试剂, 以证明试剂和靶板(若使用重复利用靶板)未发生污染, 有效避免假阳性结果。
- 7.8 当质控结果失控或校准未通过时, 应从各环节分析原因并予以纠正。常见原因包括但不限于:
- a) 质控菌株/蛋白标准品污染;
 - b) 使用错误的质控菌株/蛋白标准品;
 - c) 使用错误的试剂;
 - d) 操作人员的操作失误。
- 7.9 记录分析失控原因并归档。
- 7.10 如果未发现上述明显的原因可重复测定质控菌株/蛋白标准品, 结果在控, 可直接进行后续检测; 若不能纠正, 应联系制造商采取相应的措施。
- 7.11 应定期参加可获取的室间质评活动, 当出现室间质评不符时, 及时找到失控原因并纠正。保存每次室间质评信息, 包括结果反馈、纠正措施等。
- 7.12 无适合的室间质评计划时, 实验室可与其它同类实验室进行室间比对。

8 操作安全

- 8.1 使用 MS 鉴定微生物时, 样本的接收、操作和处理都应符合 GB 19489 的要求。在鉴定高致病性或疑似高致病性病原菌时, 实验室应使用已验证有效的灭活方法, 充分灭活后提取蛋白。
- 8.2 进行样本前处理时涉及到的化学试剂应按实验室操作规程使用和存储, 工作时应佩戴口罩、手套, 穿着工作服, 做好个人防护。

9 数据库更新

宜定期对质谱仪的数据库进行扩展,提升菌种鉴定的种类和准确性。对于数据库中未包含的微生物,可根据实际工作需求自建数据库。



附录 A

(资料性)

MS 鉴定结果报告类型

A.1 鉴定结果为分值和一致性的报告

A.1.1 概述鉴定结果为分值和一致性表示的质谱仪，除单一种水平鉴定结果显示以外，在报告中同时给出株水平 10 个参考结果及其一致性分析（以 A、B、C 表示），其结果可根据表 A.1 中原则进行报告。

表 A.1 鉴定结果为分值和一致性的报告基本分类

分类	分值	一致性	结果解释	报告原则
1	2.000~3.000	A	高置信度、一致性好	制造商审核后直接报告结果
2	2.000~3.000	B	高置信度、一致性差	报告属水平或菌群结果，或进行补充实验
4	1.700~1.999	B	低置信度、一致性差	报告属水平或菌群结果，或进行补充实验
3	2.000~3.000	C	高置信度、无一致性	重新挑取单菌落或分纯后再进行鉴定
5	1.700~1.999	C	低置信度、无一致性	重新挑取单菌落或分纯后再进行鉴定
6	<1.700	N/A	不可靠的鉴定	制造商库内无可靠的匹配结果
7	<0	N/A	未找到峰值	制造商检查样品制备或仪器参数

注：N/A 表示不适用

A.1.2 当得到高置信度（ ≥ 2.000 分，B）的鉴定结果时，应注意检查一致性，排除是否存在混合菌的情况，确定是否需要补充或重复实验。

A.1.3 当得到低置信度（1.700 分~1.999 分，B）的鉴定结果时，可综合排名前 10 位参考结果报告菌属结果，如得到种水平准确鉴定结果，应再进行重复或补充实验。

A.1.4 无鉴定结果/图谱无峰时（ < 1.700 分或 < 0 ）应检查图谱质量、样本制备流程及仪器状态，可根据表 A.2 进行问题排查，选择重新测试或选择其他鉴定方法进行鉴定。

表 A.2 常见问题原因及处理方法

异常情况	可能原因	解决方法
多个鉴定结果	样本不纯	挑取纯菌落或重新分纯后进行鉴定
	靶板、试剂导致交叉污染	重新配制试剂；使用标准流程清洗后的靶板进行鉴定
	质谱仪应用局限性	进行补充实验或报告结果
图谱质量差/图谱无峰	未选择合适前处理方法	针对不同微生物类型采用合适的样本前处理方法
	基质未添加或浓度过低	检查基质是否有结晶析出，超声重新溶解或重新配制新基质溶液
	涂菌过厚或过薄	重新制备样品，挑取少量菌落薄膜状涂抹
	黏液型细菌	拂去表面贴液，再挑取下方菌落
	菌种老化或低温保存	重新传代培养新鲜菌种
鉴定分值低	靶板不平或有刮痕	更换靶板或靶位
	质量轴偏移	按照标准流程校准仪器
	未选择正确的比对数据库	按照标准流程选择正确的数据库
	样本不纯或交叉污染	重新分纯或重新配制试剂、清洁靶板
	数据库内无参考株	选择其他微生物鉴定方法；可按照标准流程自建数据库

A.2 鉴定结果为概率的报告

A.2.1 报告分类见表 A.3。

表 A.3 鉴定结果为以概率为报告的基本分类

置信度水平	鉴定选项	概率(%)	解释
良好	1	60.0~99.9	可直接报告
低分辨	2~4	合计为 100	应进一步试验区分
无鉴定	无鉴定选项	不适用	与数据库无匹配选项
无鉴定	>4	总和<100	与数据库无匹配选项

A.2.2 好的单一鉴定结果，可信度 60.0%~99.9%：可直接报告；但对于带有“!”的重要致病菌，应用其他方法确认后才可报告。如：当系统将鉴定结果报告为 *B. anthracis*（炭疽芽孢杆菌）或 *Y. pestis*（鼠疫耶尔森菌）时，应报告疾控部门进行确认。

A.2.3 低分辨结果，报告 2 个~4 个鉴定选项，原因如下：

- a) 假低分辨：建库时 2 种~3 种菌特征太相近，因数据库本身低分辨而无法区别。
- b) 真低分辨：存在混合菌、质谱特异性峰缺失或多余，造成与数据库中多个菌匹配；或数据库中无该菌而匹配上近似菌。

A.2.4 鉴定失败，无鉴定结果，原因如下：

- a) 定标未通过：可能由于校准点位的定标菌株涂布质量不高导致，宜用新鲜的校准菌株(ATCC8739)重新涂靶板，或微调仪器参数；
- b) 图谱获取成功，但可用的波峰数量太少，不足以进行分析运算，宜重新获取图谱；
- c) 待检测菌不在数据库中，宜用其他方法鉴定。

参 考 文 献

- [1] GB/T 33682—2017 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则
- [2] GB/T 42580—2023 智能实验室 微生物质谱鉴定平台
- [3] YY/T 1740.2—2021 医用质谱仪 第2部分：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪
- [4] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42 (4) : 241-249
- [5] 上海市医学会检验分会临床微生物学组, 上海市微生物学会临床微生物专委会, 上海市微生物学会微生物耐药防控专委会. MALDI-TOF MS 病原体鉴定质量保证专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41 (8) : 567-57

