

国家标准《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》
(征求意见稿)

编制说明

《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》标准起草组

2024 年 8 月

(一) 工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等；

1、任务来源

本标准根据国标委公布的2023年第一批国家标准计划项目（国标委综合号），本项目计划编号为20233862-T-469，名称为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。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准由河北省食品检验研究院等联合起草。

2、目的和意义

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（以下简称MALDI-TOF MS）是近年来发展的一种新型的分析技术，可以实现对未知微生物的快速鉴定、分型、溯源等，广泛的用于食品、药品、医疗、农业等各个微生物鉴定领域。

微生物快速、可靠地鉴定是加强各项产品质量安全和管理的关键步骤。样品的不同的处理方法、可疑菌落的选择、仪器参数设置、同批校准质控的设置、结果的判定标准对检测结果具有一定的影响。同时，MALDI-TOF MS使用过程中质控菌株存在对进口菌株的依赖，会给实际使用带来困扰。所以对上述参数优化，完善基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法就成为了必要解决的任务。

通过研究数据结合相关标准、文献报道，规范利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法，为微生物快速鉴定提供技术保障。通过本项目的实施能够解决MALDI-TOF MS在我国微生物检验领域应用少、缺乏具体操作参数的问题，进而提高微生物鉴定的准确性，促进我国微生物质谱检测技术的发展。

3、协作单位

无

4、标准编制过程和主要工作过程

(1) 2024年1月收到全国生化检测标准化技术委员会生检标[2023]41号文件以及该标委会转发的国标委发[2023]64号《国家标准委关于下达2023年国家标准复审修订计划的通知》立项文件，计划编号：20233862-T-469。

(2) 2024年1月至2024年8月，进行《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》标准的起草研制工作。完成了《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》标准的编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《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》标准（草案）进一步完善和修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《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》标准（征求意见稿）和编制说明。

（二）国家标准编制原则和确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的论据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，应增列新旧国家标准水平的对比；

1、标准编制原则

本标准的编制依据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》，并参照GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分 总则与定义》和GB/T 6379.2-2004《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》。

2、确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的论据（包括试验、统计数据）

本标准规定了基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物的方法通则。

本标准适用于各类从事微生物相关检验工作实验室对样品中的微生物进行快速鉴定以及研究，可鉴定微生物种属。

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

1 实验材料及仪器

1.1 试剂

甲酸（HCOOH）、乙腈（CH₃CN）、乙醇（CH₃CH₂OH）、三氟乙酸（CF₃COOH）、 α -氰基-4-羟基肉桂酸（C₁₀H₇NO₃），光谱纯、2, 5-二羟基苯甲酸（C₇H₆O₄），光谱纯、血琼脂培养基、沙氏琼脂培养基。

1.2 溶液

磷酸盐缓冲液

1.3 仪器

MALDI-TOF 质谱仪、MALDI-TOF-TOF 质谱仪、二级生物安全柜、恒温培养箱：36℃±1℃、25℃±1℃、离心机：12000 r/min、旋涡混合器、显微镜、微量移液器及枪头、

一次性或重复使用靶板、1 μL 接种环。

2 实验方法

2.1 微生物的前处理

2.1.1 样品处理

痰、血、体液、拭子等临床样本经采集后直接接种。其他固体样品需粉碎，加入无菌磷酸盐稀释液溶解，液体样品可不经溶解。

2.1.2 样品培养方式

根据不同的微生物特性，划线培养于血琼脂培养基上，36℃培养24±2h，或参照对应标准进行培养。

2.1.3 可疑菌落的选择

根据对应的检验标准，挑选出具有可疑特征的菌落进行培养。至少应挑取5个可疑菌落，若少于5个则全部挑取。

2.1.4 微生物培养

一般细菌划线接种血琼脂培养基，36℃±1℃培养24h±2h；酵母划线接种沙氏琼脂培养基，25℃±1℃培养2d~3d；其它类型微生物，如霉菌、分枝杆菌和诺卡氏菌等，可参照相关标准中规定的培养基和培养方法执行。

2.2 样品上机（点靶）

2.2.1 一般细菌

直接涂抹法：鉴定细菌时，直接使用1 μL 接种环挑取单个菌落，点在样品靶板孔中，涂抹均匀并在室温自然晾干。

2.2.2 酵母样真菌

原位甲酸提取法：鉴定酵母时，直接涂抹后用相应浓度的FA溶液处理，再用微量移液器吸取1 μL 基质溶液，与样品混合，自然晾干，形成结晶。或先用微量移液器移取相应浓度的FA溶液（破坏细胞壁，使蛋白溶出），再添加基质液。不同型号仪器系统使用的甲酸浓度需遵照说明书信息。

2.2.3 丝状真菌

乙醇灭活+甲酸、乙腈提取法：将无菌棉拭子在去离子水中沾湿后，从培养基上刮取1 cm^2 ~ 2 cm^2 丝状真菌菌落，转移至装有300 μL 超纯水的2 mL离心管中。向离心管中加入900 μL 乙醇，用漩涡混合器混匀3s ~ 5s。混合后用离心机在10000 r/min下离心2 min后去除上清液，置于室温干燥。加入40 μL 70%甲酸漩涡混合3s ~ 5s，之

后再加入 40 μL 乙腈漩涡混合 3s \sim 5s, 用离心机在 10000 r/min离心 2 min 后, 用微量移液器吸取 1 μL 样品加在样品靶板孔中, 待室温干燥后再加入 1 μL 基质溶液, 在室温下自然晾干。

2.2.4 分枝杆菌/诺卡菌

硅珠破壁+甲酸、乙腈提取法: 将无菌棉拭子在去离子水中沾湿后, 从培养基上刮取 1 $\text{cm}^2 \sim 2\text{cm}^2$ 丝状真菌分枝杆菌/诺卡菌菌落, 转移至装有 300 μL 超纯水的 2 mL 离心管中。向离心管中加入 900 μL 乙醇并辅以0.5mm直径的硅珠震荡破壁。用离心机在 10000 r/min 下离心 2 min 后去除上清液, 置于室温干燥。加入 40 μL 70% 甲酸漩涡混合 3s \sim 5s, 之后再加入 40 μL 乙腈漩涡混合 3s \sim 5s, 用离心机在 10000 r/min离心 2 min 后, 用微量移液器吸取 1 μL 样品加在样品靶板孔中, 待室温干燥后再加入 1 μL 基质溶液, 在室温下自然晾干。

2.2.5 分枝杆菌(液体培养)

液体培养直接提取法: 液体培养报阳后, 继续培养24~72h, 经离心后去上清, 对沉淀物使用硅珠破壁+甲酸乙腈提取法进行提取。

2.3 仪器条件

2.3.1 仪器设置

MALDI-TOF MS: 线性操作模式, 正离子模式; 检测范围: 2000Da-20000Da, 激光点击数: 每图谱40次(6次激光累积); 激光频率: 60.0Hz; 离子源加速电压: 20kV。

MALDI-TOF-TOF MS: 固态 UV 激光光源, 检测范围为0~3000Da, 激光点击数: 每图谱100次(100次激光累积), 最大激光重复频率 2000Hz。

2.3.2 激光能量

每激光束能量100 μJ , 激光能量可从0 % \sim 100 % 范围调节。

2.4 微生物蛋白指纹图谱数据库建库原则与方法

自建库每株菌需由不少于10株菌种进行构建, 经图谱数据采集、聚类分析、矩阵挖掘特征谱峰等步骤, 构建自建库。

2.4.1 自建库原则: 每株菌需由不少于10株菌种进行构建; 优先挑选标准菌株, 如ATCC、CICC、CMCC菌株; 优先挑选遗传背景清晰(如已有基因组测序数据)的菌株; 优先挑选血清型明确的菌株; 优先挑选实验室确定的、来源明确的菌株。

2.4.2 自建库方法: ①挑取新鲜二代培养物, 经过适当处理后作为样品; ②在靶板上加BTS或标准物质对质谱仪进行峰的校准; ③建立程序, 点靶板, 采集峰图; ④分析峰图, 严格

按照公式 $(M_{\text{右}} - M_{\text{左}}) / M_{\text{标}} \leq 500\text{ppm}$ 分析每一个峰，其中 $M_{\text{左}}$ 和 $M_{\text{右}}$ 为蛋白谱图中每一个有峰处最左侧峰和最右侧峰的峰值， $M_{\text{标}}$ 为峰处的中间峰值，且对于不满足公式的峰图进行删除，并且删除的峰图 ≤ 4 ，否则从4重新开始；⑤对于满足 $(M_{\text{右}} - M_{\text{左}}) / M_{\text{标}} \leq 500\text{ppm}$ 且有效峰图 ≥ 20 张的菌株，建立MSP，进行编辑汇总，整合到一个项目文件下。

2.4.3数据库比对：利用系统数据库或自建数据库进行样品比对。

3、经济与社会效益

飞行质谱具有快速、便捷、价格低廉受到广泛应用，已成为微生物学和分类学的重要工具。如今，MALDI-TOF-MS已被成功用于鉴定完整的细菌、酵母菌和真菌等。由于酵母菌和真菌常规鉴定方法耗时较长，MALDI-TOF MS也开始被用于替代检测方法的研究。它可弥补常规实验室条件下无法靠形态学标准鉴定菌株的劣势。通过本项目的实施能够解决MALDI-TOF MS在我国微生物检验领域应用少、缺乏具体操作参数的问题，进而提高微生物鉴定的准确性，促进我国微生物质谱检测技术的发展。

本标准可以进一步缩短可疑菌种的检测周期，提高检测效率，检测结果将更加准确、全面。实现了对于不同菌属的快速鉴定，大大节约了检测时间，减少了各种细菌鉴定试剂以及试剂盒的使用，节约了检测成本。

（四）采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况；

目前关于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物暂无国外标准，国内有SN/T5228出口食品中病原微生物快速筛选方法MALDI-TOF MS系列，还有《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》于2017年实施，其中GB/T 33682-2017包含的样品处理方法较为简单，经前期实验研究和部分文献可知，上样处理方法对实验结果准确性有较大的影响，且对于可疑上样数目、每批次质控设置阳性样品的判定方法没有具体要求，与实际检验需要有所偏离，本此修订对上述条件进行优化，更满足实际检验需求。

（五）与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系；

本标准不得与现有法律、法规和强制性国家标准相抵触

（六）重大分歧意见的处理经过和依据；

（七）国家标准作为强制性国家标准或推荐性国家标准的建议；

（八）贯彻国家标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）；

（九）废止现行有关标准的建议；

本标准将代替 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》。建议标准实施之日，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》废止。

（十）其他应予说明的事项。

无