附件 1：微生物基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定技术指导原则公示稿（第 1 次）

微生物基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定技术指导原则

本指导原则为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术（matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）在微生物菌种快速鉴定领域的应用提供技术指导。

MALDI-TOF MS 是一种基于微生物特征蛋白图谱进行菌种快速鉴定分析方法。MALDI-TOF MS 仪器设备主要由离子源（MALDI）、飞行时间分析器（TOF）和质谱检测器（MS）组成。其基本原理为：待测微生物样本的特征多肽或蛋白质与基质溶液混合形成共轭结晶，在脉冲激光作用下基质吸收激光能量并传递到样本分子，使其电离和气化，离子在加速电场作用下获得初始动能，进入真空飞行时间管，根据不同质荷比（m/z, 其中 m 表示待测蛋白离子质量，z 表示所带电荷数）的离子飞行时间差异，获得待测微生物样本的特征蛋白图谱，通过将图谱与仪器制造商配套特征蛋白图谱数据库或其他公共可用数据库进行比对分析，利用评分系统获得微生物鉴定结果。MALDI-TOF MS 鉴定微生物主要针对微生物胞内稳定表达的高丰度核糖体蛋白（分子量范围 2000 Da ~ 20000 Da）进行检测和分析。

本指导原则包括实验室与仪器设备的一般要求、微生物质谱鉴定方法流程、主要影响因素、方法确认、质量控制及自建图谱数据库的要求等。

实验室与仪器设备的一般要求

实验环境

MALDI-TOF MS 仪器应在适宜的环境温度和湿度下运行，并远离粉尘、电磁干扰和振动源。微生物培养物以及相关实验材料均应符合相应生物安全等级的管理要求。

主要性能指标

MALDI-TOF MS 微生物鉴定系统主要性能指标包括质量检测范围、鉴定准确率、分辨率、灵敏度、精密度与重复性等，仪器运行时各项性能指标应满足鉴定分析要求。除仪器硬件外，鉴定系统还应配备特征蛋白图谱数据采集、分析软件以及经验证确认的微生物鉴定特征蛋白图谱比对数据库。

主要试剂

常用试剂包括α-氰基-4-羟基肉桂酸（α-cyano-4-hydroxycinnamic acid，CHCA）、甲酸、乙腈、乙醇、三氟乙酸和商品化质控品等。一般应使用色谱纯试剂及去离子水配制溶液，也可采用经确认的商品化试剂或试剂盒。甲酸、乙腈和三氟乙酸等有机试剂应在通风柜中操作。

微生物质谱鉴定方法流程

微生物的分离与纯化

一般可使用非选择性固体培养基对待测微生物样本进行分离与纯化，以获得单一的纯菌落进行鉴定。通常细菌在30~35℃培养18~24小时，酵母菌在20~25℃培养18~72小时，可获得用于质谱鉴定的新鲜培养物。丝状真菌可培养2~7天至长出明显菌丝，以未产孢或刚产孢时为最佳采样时机，避免难以破壁的孢子或色素对图谱质量产生干扰。培养条件的微小差异一般不会导致质谱鉴定结果的明显变化。

样本前处理

样本前处理是通过破坏微生物细胞结构，实现灭活微生物样本并释放胞内蛋白的关键步骤。根据不同微生物细胞壁结构和成分差异，以及图谱质量要求，可将样本前处理方法分为直接涂抹法、原位裂解法和蛋白提取法三种，其主要操作步骤及不同种类微生物适用范围见表 1。

表 1 不同样本前处理方法及主要适用范围

处理方法	操作步骤	适用范围
直接涂抹法	取适量纯培养物，涂抹至靶板样本孔位，形成均匀薄层；吸取基质溶液 1μl，覆盖至样本上，自然晾干至形成细小均匀的基质结晶	革兰阴性菌及部分革兰阳性菌
原位裂解法	取适量纯培养物，涂抹至靶板样本孔位，形成均匀薄层；吸取甲酸裂解液 1μl，覆盖至样本上，自然晾干；吸取基质溶液 1μl，覆盖至样本上，自然晾干至形成细小均匀的基质结晶	革兰阳性菌、酵母菌及少部分丝状真菌等
蛋白提取法	吸取适量体积无水乙醇至离心管中，取适量纯培养物充分混匀，12 000g 离心 2 分钟，弃上清液，加入适量体积甲酸裂解液，混匀（必要时选择物理研磨，加强破壁效果），添加等量体积乙腈提取蛋白，12 000g 离心 2 分钟，取 1μl 蛋白上清液至靶板样本孔位，自然晾干；吸取基质溶液 1μl，覆盖至样本上，自然晾干至形成细小均匀的基质结晶	丝状真菌、厚壁菌、自建数据库微生物等

对未知样本进行质谱鉴定时，可根据微生物的分类或革兰染色结果选择适宜的前处理方法，逐步优化直至获得高置信水平的鉴定结果。

图谱数据采集

上机鉴定分析前，应确认仪器已完成必要的校准和性能验证。待测样本与基质溶液在靶板上自然晾干形成共结晶后，将靶板加载到仪器中，设置合适的激光能量、质谱扫描范围等参数上机检测。一般可按仪器供应商提供的标准操作规范自动采集数据。若选择手动采集，应确保图谱数据符合微生物鉴定分析的要求。

图谱数据比对

将采集的特征蛋白图谱数据自动/手动导入比对数据库，经比对分析，可直接获得待测微生物样本的鉴定结果及其置信水平。

结果判定和报告

结果阈值的判定方法可分为置信度法和阈值法两种，可按仪器设备商建议的判定原则进行分析。一般以置信度或阈值为主，辅以结果重现性，共同作为判定依据。

鉴定结果通常可以分为以下类型：高置信度单一鉴定结果，经审核后可直接报告；高置信度多个鉴定结果，需排查近缘菌种或交叉污染的可能性，确认后报告；低置信度单一鉴定结果，检查样本前处理和图谱采集状态，可选择蛋白提取法重试；低置信度多个鉴定结果，检查样本制备方法，排查交叉污染后重试；多次重试后，置信度较低、无鉴定结果或图谱无峰时，应选择其他适宜方法（如基因型鉴定方法）进一步鉴定。

主要影响因素

待测微生物样本

MALDI-TOF MS 鉴定分析样本应为纯化的微生物菌落，通常需要 10^5~10^7 cfu 的菌量。当微生物样本不纯或其涂抹量不足，可能导致无法得到可靠的鉴定结果。受损微生物宜经多次传代复苏，使其处于稳定代谢状态，以提高鉴定置信水平。对于细菌，使用新鲜培养物可提高鉴定成功率；对于丝状真菌，鉴定成功率与培养物菌龄、样本制备方法、生物量和所用数据库密切相关。

样本前处理

微生物细胞壁的结构和组分是影响前处理效果的重要因素。样本的破壁效果是决定鉴定能否成功的关键。使用直接涂抹法时，应注意菌量适当、涂抹厚度均

匀，避免带入培养基成分。对细胞结构复杂的微生物（如丝状真菌），应使用蛋白提取法或其他适宜的前处理方法，以确保充分破壁。样本制备完成后一般应在 24 h 内尽快测定。靶板点样时应避免样本或溶液溢出，防止交叉污染。

设备性能

设备性能状态会影响微生物蛋白图谱的采集质量，进而干扰比对鉴定结果。若短期内出现大量图谱少峰或无峰、分辨率下降、过饱和峰过多等低质量鉴定结果，应及时排查设备性能和状态并进行必要的维护校准。

比对数据库

微生物鉴定数据库是 MALDI-TOF MS 技术的核心部分，待测微生物只有与数据库中已有图谱高度匹配才能得到准确鉴定结果。数据库中微生物的种类、数量及来源的多样性对鉴定成功率影响较大。若数据库中未收录目标菌种的特征图谱，将无法准确给出鉴定结果或给出错误的鉴定结果。

方法局限性

MALDI-TOF MS 一般能够准确鉴定大多数细菌，与传统表型方法相比具有显著优势，但其分辨率不足以进行菌株分型。该方法可能无法区分亲缘关系较近的微生物，如大肠埃希菌和志贺氏菌等，也可能无法对某些属（如沙门氏菌、气单胞菌属、芽孢杆菌属）的微生物进行准确的种水平鉴定。在某些特定情况下，即便鉴定结果具有较高的置信度，仍可能因不同菌株间特征蛋白图谱相似而导致结果的偏差和错误，必要时应结合染色镜检、形态学特征、血清学、分子生物学等多相鉴定技术进一步确认结果。

方法确认

MALDI-TOF MS 微生物鉴定方法的确认可参照微生物鉴定指导原则（指导

原则 9204）执行。方法确认中使用的试验菌种应尽量覆盖实验室检测范围和比对数据库收载的主要菌种类型。表 2 中列举了药品全生命周期质量控制中可选择的部分代表性微生物菌种。

表 2 MALDI-TOF MS 鉴定方法确认可选择的微生物菌种

菌种类型	菌种名称	相关性
细菌	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	人员常见代表性革兰阳性球菌
	藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*	
	肠炎沙门菌 *Salmonella enteritidis*	人员常见代表性革兰阴性杆菌
	大肠埃希菌 *Escherichia coli*	
	洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia*	制药用水系统代表性革兰阴性杆菌
	少动鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas paucimobilis*	
	铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*	
	枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*	环境常见代表性革兰阳性杆菌
	蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*	
	痤疮丙酸杆菌 *Cutibacterium acnes*	常见代表性厌氧菌
	生孢梭菌 *Clostridium sporogenes*	
真菌	白色念珠菌 *Candida albicans*	环境代表性真菌
	黑曲霉 *Aspergillus niger*	

质量控制

采用 MALDI-TOF MS 进行微生物鉴定时，应对检测全过程进行监测和控制。实验室应建立完善的质量管理体系以确保鉴定结果的准确性和有效性。应定期校准仪器设备，并依据设备性能、使用频率、人员水平和质量风险管理要求等确定实验室内外部质量控制频次。可使用商品化质控品或大肠埃希菌标准菌株进行仪

器校准，商品化质控品的分子量范围应覆盖鉴定检测范围（分子量范围 2000 Da ~ 20000 Da）的 60%以上。进行仪器校准时，校准点应不少于 8 个，被确认的校准峰数量应达到设备制造商预设接受标准，通常应不少于总校准峰的三分之二，且误差在仪器允许的范围之内。

每次试验时，应至少同步设置 1 个阳性对照和 1 个空白对照。阳性对照应选择有代表性的已知菌种，并获得唯一且高置信水平的鉴定结果。空白对照应在空白靶位点加不含微生物的实验试剂（如基质或甲酸裂解液等），除背景噪音外应无任何可检测的波峰。对于可重复使用的靶板，每次鉴定的空白对照可选择不同位点，以证明靶板不同区域清洗彻底、无污染。

自建图谱数据库的要求

自建图谱数据库是指实验室在商业微生物比对数据库基础上，向其中增加新菌种或新菌株特征蛋白图谱的过程。实验室自建图谱数据库可有效扩充商品化数据库微生物种类的多样性，提升鉴定准确率。

微生物 MALDI-TOF MS 鉴定系统一般应具备自建图谱数据库的功能，满足图谱的采集、分析和信息提取等需求。自建库微生物菌株应经表型鉴定或基因型鉴定等方法确认，获得准确可靠的菌种鉴定结果，以确保自建图谱数据库的数据质量。

建库时应考虑不同培养基、培养条件、培养时间等因素的影响，以获得高质量、可重复的特征蛋白图谱。每个菌株应从不同靶位采集多张原始图谱，按照设备制造商自建数据库方法要求选出质量最优的图谱用于建库。建库菌株数量应符合制造商建库算法要求的最低数量，并逐步增加具备差异性的菌株，以提升新建数据库的菌株覆盖率。

自建数据库完成后，应选取经过鉴定确认的代表性菌株对自建数据库的准确性和重现性进行确认。自建库的鉴定符合率应不低于 90 %。

特征蛋白图谱数据的比对算法是 MALDI-TOF MS 微生物鉴定的核心环节。为确保鉴定结果的准确性与可靠性，宜优先采用经充分验证的商业软件配套图谱比对算法。如实验室自建图谱比对算法，则应遵循以下原则性要求：具备统计学聚类分析能力、图谱质量评估功能、多图谱综合判定机制、结果置信度量化指标，并确保核心参数可追溯、可记录等。同时，自建算法应与配套数据库共同完成系统化验证，以保障鉴定结果的可靠性。

自建库操作技术人员应经过专业培训，具备相应的微生物学和质谱技术知识，确保采集分析数据的科学性和可靠性。

起草单位：上海市药品检验研究院　　联系电话：18001677839

参与单位：上海市食品药品包装材料测试所；陕西省食品药品监督检验研究院；安徽省食品药品检验研究院；四川省药品检验研究院；广东省药品检验所；宁夏回族自治区药品检验研究院；辽宁省药品检验检测院；内蒙古自治区药品检验研究院

公示稿

附件 2：微生物基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定技术指导原则起草说明

微生物基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定技术指导原则起草说明

一、制订的目的意义

基质辅助激光解吸飞行时间质谱（简称 MALDI-TOF MS）能够将微生物菌种鉴定时间缩短至数分钟，且仅需极少的菌量，相比其他方法，技术优势突出，已逐渐成为微生物实验室主要技术之一。实现 MALDI-TOF MS 在药品微生物鉴定领域的应用和标准化，能够有效缩短检验周期，促进产业高质量发展。《中国药典》通则 9204 和 USP 1113 等均把 MALDI-TOF MS 列为微生物常用鉴定方法。但 MALDI-TOF MS 技术在药品领域的应用存在以下问题：缺适用于药品微生物 MALDI-TOF MS 鉴定的方法标准，导致无据可依；不同商用质谱系统能够准确鉴定的药品微生物种类，缺乏系统性验证，无法保障结果可靠性；比对数据库中药品污染微生物的特征蛋白标准谱图亟待扩展，导致监管机构和企业应用 MALDI-TOF MS 时无标准可依，难以保证方法规范性和结果可靠性。亟需开展相关研究，建立药品微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定技术指导原则。

二、起草过程

“微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定技术指导原则”依托 2023 年国家药品标准提高课题“微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定技术指导原则的研究（2023Y36），由上海市食品药品检验研究院牵头，辽宁省药品检验检测院、陕西省食品药品检验研究院、安徽省食品药品检验研究院、宁夏回族自治区药品检验研究院、内蒙古自治区药品检验研究院、广东省药品检验所、上海市食品药品包装材料测试所、

四川省药品检验研究院共同起草拟定，课题研究过程中邀请国内外多家仪器设备生产商参与调研。课题组开展了实验研究、广泛的文献及企业调研，并根据专家意见进行多次修改完善，最终形成微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定技术指导原则（草案）。

三、制订的总体思路

课题组针对 MALDI-TOF MS 技术在药品领域应用存在的问题，通过系统科学的研究，建立标准化的药品微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定方法，建立特色的药品微生物 MALDI-TOF MS 特征蛋白图谱比对数据库，制定药品微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定技术指导原则。本指导原则可为制药企业和监管机构提供具体、清晰的微生物 MALDI-TOF MS 菌种鉴定标准方法和技术指导。