

Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology

Kyeong Seob Shin^{1,*} and Jonghwa Yum^{2,†,*}

¹Department of Laboratory Medicine, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju 28644, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan 47340, Korea

Over the past few decades, few technologies have had a greater impact on clinical microbiology laboratories than matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The MALDI-TOF MS is a fast, accurate, and low-cost and efficient method of microbial identification. This technology generates characteristic mass spectral fingerprints that is a unique signature for each microorganism, making it an ideal method for accurate identification at the genus and species levels of both bacterial and fastidious microorganism such as anaerobes, mycobacterium and fungi etc. In addition, MALDI-TOF MS has been successfully used in microbial subtyping and susceptibility tests such as determination of resistance genes. In this study, the authors summarized the application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology and clinical research and explored the future of MALDI-TOF MS.

Key Words: MALDI-TOF MS, Clinical microbiology, Application, Identification, Subtyping, Susceptibility

서 론

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)는 각각의 미생물로부터 생긴 독특하고 특징적인 질량 스펙트럼 지문(mass spectra fingerprint)을 이용하여 미생물을 동정할 수 있는 효율적인 방법이다. 이 방법은 빠른 반응시간과 정확한 결과를 보이므로 이상적인 미생물 동정 방법이라 할 수 있으며, 가까운 미래에 미생물의 아형 분류(subtyping)나 내성의 검출에도 많이 이용될 것이다.

질량 분석(Mass spectrometry, MS)은 수십년 전부터 화학 분야에서 사용되어 왔으며, 1975년에 Anhalt and Fenselau (1975)에 의해 서로 다른 종(species)의 세균 추출물에서 독특한 질량 스펙트럼을 보고한 것이 미생물의 특성화에 처음 이용한 것이다. 이후 세균의 프로파일링(profiling)로 부

터 분자 표지자(molecular biomarker)를 이온으로 만들 수 있는 다양한 이온화(ionization) 기술이 개발되었지만 이 시기에는 세균의 지질(lipid)과 같은 분자량이 작은 물질만을 이온화 할 수 있었다. 단백질과 같은 분자량이 큰 생체분자(biomolecule)를 이온화하기 위해서는 높은 에너지가 필요한데, 높은 에너지를 사용하면 생체분자가 온전한 상태(intact)로 유지되지 않고 파괴되어 생체분자의 구성을 예측할 수가 없다. 1980년 후반 Tanaka 및 Fenn (Tanaka et al., 1988; Fenn et al., 1989)에 의해 단백질과 같은 거대 생체분자를 온전한 상태로 유지한 채 이온화 시켜 질량을 측정할 수 있는 MALDI 및 electrospray ionization 와 같은 기화(soft ionization) 기술이 개발되었으며 이후 TOF analyzer와 결합하여 MALDI-TOF가 되었다. 1996년 Holland 등 (Holland et al., 1996)은 MALDI-TOF를 이용하여 세균의 스펙트럼 지문을 처음 보고하였다. 이 시도로 속(genus) 및 종(species) 수준에서 세균을 동정하고자 하

Received: August 24, 2022 / Revised: September 13, 2022 / Accepted: September 14, 2022

*Professor.

†Corresponding author: Jonghwa Yum. Department of Clinical Laboratory Science, Dong-eui University, Busan 47340, Korea.

Tel: +82-51-890-2682, Fax: +82-505-182-6877, e-mail: auxotype@deu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 다양한 시도들(Claydon et al., 1996; Haag et al., 1998)이 있었고 현재는 세균의 동정에 널리 이용되고 있다.

이 연구에서 저자는 MALDI-TOF MS의 기술적 원리와 미생물 분야에서 MALDI-TOF MS가 적용되는 분야에 대해 조사하여 고찰하였다. 특히 세균과 진균의 동정에서 MALDI-TOF MS의 성능을 알아보고, 혈액이나 다양한 임상 검체에서 직접 적용한 예에 대해서도 조사하였다. 그 외 아형의 분류나 항균제 내성 연구에 MALDI-TOF MS의 적용에 대해 알아보고 앞으로 MALDI-TOF MS의 임상미생물 분야에서 발전 방향에 대해 간략히 기술하였다.

본 론

1. MALDI-TOF MS의 원리

1) MALDI-TOF MS의 기술적 이해

질량 분석기(mass spectrometer)는 기능적으로 3가지 부위로 구성되는데, 1) 검체의 분자(sample molecule)를 이온화하고 기체로 만드는 이온 source 부위(ionization: MALDI in MALDI-TOF MS), 2) 질량-전하 비(mass/charge ratio, m/z)에 따라 분자 이온을 분리하는 질량 분석기(mass analyzer: TOF analyzer in MALDI-TOF MS), 3) 분리된 이온을 검출하는 검출기(detector)로 구성된다(mass spectrometry). MALDI는 이온화를 하는 한 가지 방법으로 단백질과 같은 거대한 비휘발성 생체분자를 온전한 상태(intact)로 이온화와 기화(soft ionization)시키는 기술이다(Tanaka et al., 1988; Cherkaoui et al., 2010). MALDI는 대부분 단독으로 전하를 띤 이온을 만들며 MALDI에 의해 많은 수의 단백질 펩크로 구성된 스펙트럼이 생기므로 단백질 분석에 유용하게 이용될 수 있다. MALDI 분석에서 사용되는 매트릭스는 분석물질과 섞여 결정화되고 레이저가 검체에 조사될 때 레이저의 강한 에너지를 흡수하여 검체가 작은 조각으로 깨지지 않고 온전한 상태의 단백질로 존재하도록 하는 역할을 한다(Fig. 1). 매트릭스는 작은 분자량의 산(acid)이며 분석하는 생체분자에 따라 구성이 다른데, 가장 널리 사용되는 매트릭스는 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)와 *a*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid (SA), ferulic acid (FA) 등이며 FA, SA, CHCA가 효과적인 단백질 표지자의 검출에 이용된다(Fenselau and Demirev, 2001; Vaidyanathan et al., 2002; Williams et al., 2003). 실제로 미생물 검체가 매트릭스와 섞여 금속 표면 위에서 결정화되는데, 레이저 조사 후 매트릭스는 레이저 에너지를 강하게 흡수하고 궁극적으로 검체에 이 에너지를 전달하여 이온화

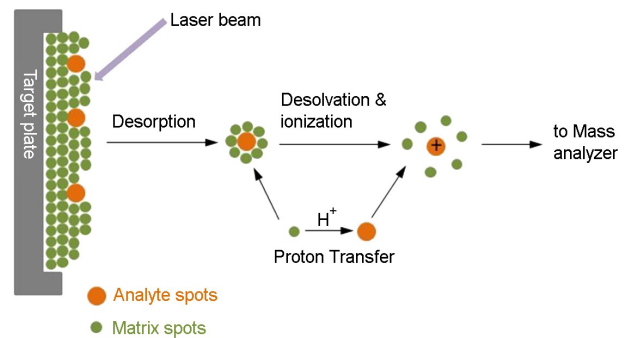


Fig. 1. Ionization of analytes by MALDI. After irradiation by laser beam, analytes & matrix were desorption and ionization with intact form (soft ionization) from target plate (from Creative Proteomics: <https://www.creative-proteomics.com>).

됨으로써 분석물질(analyte)을 탈착(desorption)과 이온화를 시키는 역할을 한다(Fig. 1). 분석하려는 물질(analytes)은 MALDI에 의해 대부분 단독으로 전하를 띤 이온이 되며 이온화된 분석물을 전기장에서 증폭(acceleration)시킨 후 진공관(무전기장)으로 보내면 질량 검출기(mass detector)에 도달할 때까지 비행하게 된다. 이때 단백질 조각들의 m/z 에 의해 분자량이 작은 순서대로(time of flight, TOF) 질량 검출기에 도달하고 미생물에 따라 특이한 스펙트럼이 생성된다. 검출기에 도착하는데 걸리는 시간(TOF)은 생체 분석물질(bioanalyte)의 질량(mass)과 전하(charge, z)에 좌우되는데 m/z 의 제곱근에 비례한다. m/z 와 이온의 강도에 의해 질량의 스펙트럼이 발생하여 이 스펙트럼은 미생물 마다 특이하여 기준 미생물의 데이터베이스와 비교하게 되면 미생물을 정확하게 동정할 수 있게 된다(Fig. 2). 통상적으로 1,000에서 20,000 m/z 사이의 스펙트럼을 분석하게 된다(Croxatto et al., 2012).

2) 미생물의 동정과 바이오 마커에 대한 데이터 분석

온전한(intact) 세균에서 MALDI-TOF 스펙트럼에서 검출된 바이오 마커는 대부분 분자량이 15 kDa 이하인 중간 소수성 단백질로 세포 내에서 풍부하며 절반이 리보솜(ribosomal) 단백질(Arnold et al., 1999)이다. 리보솜 단백질은 풍부하고(세포 총 단백질의 20% 이상) 매우 기본적인 단백질로 MALDI 과정에서 효과적으로 이온화될 수 있다(Krause et al., 1999). *Escherichia coli*에서 시행한 리보솜 단백질 이외의 단백질에는 핵산과 결합된 풍부한 단백질(DbhA and DbhB)이나 cold-shock protein (CspA, CspC, CspE) 등이 있다(Ryzhov and Fenselau 2001). 살모넬라의 MALDI-TOF

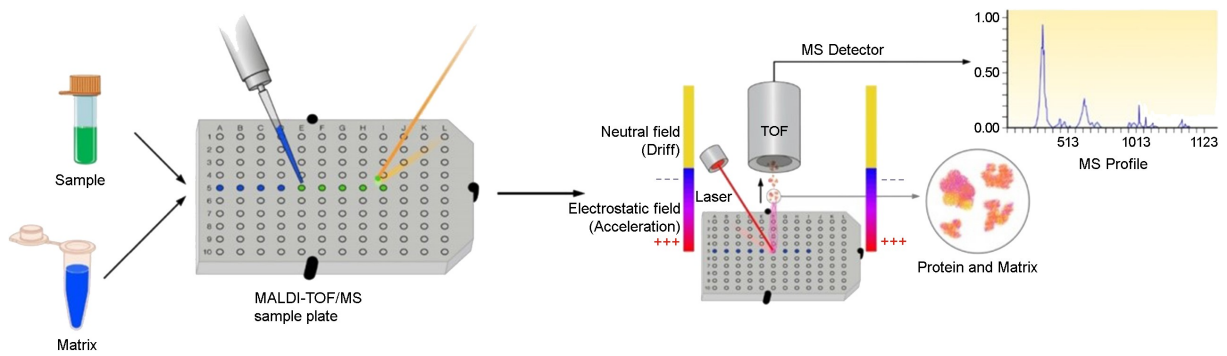


Fig. 2. General schematics for MALDI-TOF MS analysis of microbiological isolates. Samples are added to the MALDI plate, overlaid with matrix, and dried. After the sample is bombarded by the laser, the sample and matrix were desorption and ionization. The generated ions are separated based on their mass-to-charge ration via a TOF tube, and spectra of these ions is generated and analyzed by the MS software. This profile is subsequently compared to a database of reference MS spectra (Clark et al., 2013, Clin Microbiol Rev).

MS 분석에서 얻은 바이오 마커에 의하면 대부분은 리보솜 단백을 포함하는 기본적인 단백질이나, DNA 또는 RNA와 결합되어 있는 등전점(isoelectric point)이 9 이상인 단백질이었다. 한편 세균의 일반적인 동정에 적절한 단백질의 MALDI-TOF 스펙트럼은 외부환경에 의해 미세한 영향을 받는 하우스 키핑(house-keeping) 기능을 갖는 보존(conserved) 단백질에 의해 구성된다.

미생물을 특성화 할 수 있는 MALDI-TOF MS의 방법에는 일반적으로 2가지가 있는데 하나는 질량 스펙트럼을 지문(fingerprints) 데이터베이스와 비교하는 것이고 또 하나는 프로테옴(proteome) 데이터베이스와 표지자의 질량(biomarker mass)의 일치 정도를 비교하는 것이다. 첫 번째 방법은 온전한 세포에서 얻은 독특한 스펙트럼을 기준에 있는 지문 라이브러리(fingerprint libraries)와 비교하는 것이다. 이 방법은 빠르고 간단하며 진단검사에서 쉽게 적용이 가능하고 미생물의 동정에 사용하는 독특하고 보존적인 피크로 구성되는 데이터베이스를 만들기 편리하여 상품화되어 이용될 수 있다(Carbonnelle et al., 2007). 두 번째 방법은 유전자 순서가 분석되어 분자량이 예측되는 단백질 질과 스펙트럼에 있는 단백질분자의 질량을 비교하여 미지의 미생물을 동정하는 방법(Demirev et al., 1999)으로 주로 연구용으로 이용될 수 있다.

2. 임상미생물 분야에서 MALDI-TOF MS 적용

1) 세균의 동정

현재 대부분의 임상 검사실에서 미생물의 동정은 생화학적 반응과 표현형 특성, 배지에서 자라는 성장, 그람염색, 균집락의 모양에 따라 동정하는 것이 일반적이다. 이

들 방법은 대부분의 감염을 일으키는 균을 정확하게 동정할 수 있지만 이를 위해서는 상당한 시간 그리고 비용이 필요하며 숙련된 검사인력이 필요하다. MALDI-TOF 기술이 균의 동정에 이용되면 엄청난 정도의 동정시간을 단축할 수 있어 대량 검사가 가능할 뿐만 아니라 매우 정확한 동정이 가능하게 되었다. 게다가 균의 표현학적 특징이 적어 분자유전학적 방법으로만 진단되었던 세균의 동정도 가능하게 되었다(Bizzini et al., 2011).

현재 MALDI-TOF MS를 이용한 세균 동정기가 상품화되어 이용되고 있는데, 그 과정을 간략히 보면 일반적으로 고체배지에서 자란 신선한 집락을 금속 플레이트에 바른 후에 기기회사에서 추천한 매트릭스(1.5 μ L CHCA in 50% acetonitrile/2/5% trifluoroacetic acid for Bruker instrument; our laboratory)를 플레이트 위에 첨가한다. 이때 세균의 동정율을 높이기 위해 개미산(formic acid)를 첨가하기도 한다. 검체와 매트릭스의 혼합물을 플레이트에서 건조한 후 MALDI-TOF MS 기기에 장착하고 작동하면 균마다 특징적인 스펙트럼이 발생하고 컴퓨터에 있는 데이터베이스와 비교하여 세균을 동정하게 된다. 세균의 동정에 이용되고 있는 상품화된 MALDI-TOF MS 기기와 참고 방법들과 비교한 다양한 연구 결과가 있는데 이들을 Table 1에 정리하였다. 현재 Bruker system (biotyper)와 VITEK MS system이 가장 널리 사용되고 있다. 980개의 임상에서 분리된 균을 이용하여 Bruker system을 검증한 연구 결과(van Veen et al., 2010)에서 MALDI-TOF MS는 세균과 진균의 92.2%를 정확하게 동정하여 통상적인 생화학적 동정 시스템의 83.1%보다 의미 있게 우수하였다(Table 1). 균종별로 보면 장내 세균의 97.7%를 species(종) 수준에서

Table 1. Performance of routine identification of bacteria and yeasts by MALDI-TOF MS

Reference	N	Classification	Genus level (%)	Species level (%)	MsId (%)	NoId (%)	Comments
van Veen et al. (2010)	980	Total	98.8	92	1.7	1.1	*
	311	<i>Enterobacteriaceae</i>	100	97.7	1.7	1.1	
	88	Non-fermentative GN	94.3	92	1.1	4.6	
	261	GP cocci in cluster	100	94.3	0.4	0	
	165	GP cocci in chains	98.8	84.8	7.3	1.2	
		Enterococci	100	98.4	0	0	
		Hemolytic Streptococci	100	100	0	0	
		<i>S. milleri</i>	100	77.8	0	0	
		<i>S. pneumoniae</i>	100	86.4	0	0	**
		Viridans Streptococci	90.5	9.5	57.1	9.5	**
Seng et al. (2009)	94	HACCEK	96.8	84	0	3.2	
	61	Yeasts	96.7	85.2	3.3	3.2	
	1,660	Total	95.4	85.2	1.7	2.8	
Cherkaoui et al. (2010)		Gram Positive			0.8	2.0	
		Gram negative			0.9	0.7	
	720	Total	100	94	0.9		
	416	<i>Enterobacteriaceae</i>		99.8	0		
	80	Aerobic GN		97.5	1.25		
Lee et al. (2015)	111	Staphylococci		98.2	0.9		
	87	Aerobic GP		73.6	3.4		Poor yield for
	249	Total	91.1	83.9	0.4	8.4	Streptococcal species
	157	Anaerobic GNR	98.1	94.9	0.6	1.3	
	56	Anaerobic GPR	78.6	76.8	0	21.4	
Lee et al. (2017)	26	Anaerobic GPC	76.9	65.4	0	23.1	
	10	Anaerobic GNC	90	0	0	10	
	309	Total	88	87.4	0.6	11.3	
	158	Common <i>Candida</i>	100	100	0	0	
	23	<i>C. neoformans</i>	8.7/100*	8.7/100	0	91.3/0	FA/ACN additive
	128	Uncommon yeasts	75.8	74.2	0.8	23.4	

Abbreviations: N, sample number; MsId, misidentification; NoId, not identification; GNR, gram negative rod; GPR, gram positive rod; GPC, gram positive cocci; GNC, gram negative cocci; HACCEK, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, and *Kingella*; FA, formic acid; ACN, Acetonitrile

*Most case of misidentification either did not have reference spectra in the database or was related to mislabeling of specimen

**Most of misidentification case was viridans Streptococci or *Streptococcus pneumoniae*

정확히 동정할 수 있었고, 포도당 비발효 그람음성간균의 92%, Staphylococci의 94.3%, Streptococci의 84.8%, HACCEK group (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, and *Kingella*)의 84%, yeast의 85.2%를 정확히 동정하였다. 한편 Seng 등 (Seng et al., 2009)은 Bruker system으로 1,660개의 세균을 통상적인 표현학적 동정 방법과 비교하였을 때 95.4%를 속(genus) 수준

에서, 84.1%는 종 수준에서 정확히 동정하였다. 2010년 Cherkaoui (Cherkaoui et al., 2010)는 720 임상 검체를 평가하였을 때 94.4%를 정확히 동정할 수 있었는데, Streptococci와 혐기성 균에서만 성능이 의미 있게 낮았고 나머지 통상적인 균은 매우 정확하게 동정이 되었다. 2015년 Lee 등 (Lee et al., 2015)은 249개의 혐기성 임상 균주를 VITEK MS system으로 동정하였을 때 속 수준에서 91.1%,

Table 2. Common problems in routine identification of microorganism by MALDI-TOF MS

Problems	Examples
Limit of resolution of the MALDI-TOF MS Similarities of spectra present in database Absence or insufficient reference spectra in the database	Viridans streptococci and <i>S. pneumoniae</i> <i>Shigella</i> spp. identified as <i>E. coli</i> <i>Propionibacterium acnes</i> as <i>Eubacterium brachy</i> closed related bacteria: <i>S. pneumoniae</i> and <i>S. parasanguinis</i>
Difficult to lyse cell wall structure	Yeasts require protein extraction procedure <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i> possess a capsule which prevent efficient lysis
Insufficient protein signal	<i>Actinomyces</i> , <i>Gemella</i> , <i>Nocardia</i> and <i>Streptomyces</i> species usually display weak protein signal
Small amount of material sample	Better signal for <i>Enterobacteriaceae</i> grown on blood agar vs MacConkey agar
Taxonomical discordances	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> as <i>Pseudomonas hibiscicola</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> is synonymous of <i>Rhizobium rhizogenes</i>

(Croxatto et al., 2012, FEMS Microbiol Rev)

중 수준에서 83.9%를 정확하게 동정할 수 있었음을 보고 하였다. 결론적으로 현재에서 MALDI-TOF MS의 데이터 베이스가 업그레이드되어 이전보다 정확하게 동정할 수 있지만 아직까지 *Streptococcus* 및 HACCEK group 그리고 혐기성 균의 중 수준에서 동정의 정확성은 다소 떨어질 수 있다.

MALDI-TOF MS를 이용한 세균의 동정에서 흔히 문제가 되는 균은 viridans Streptococci group, *S. pneumoniae* 그리고 혐기성 세균이 대부분이며(Seng et al., 2009; Cherkaoui et al., 2010; Blondiaux et al., 2010), 일반적으로 문제가 될 수 있는 경우를 Table 2에 정리하였다(Croxatto et al., 2012). 특히 viridans Streptococci (*S. parasanguinis*, *S. mitis*)와 *S. pneumoniae*는 밀접 관련 균(closed related group)으로 이들 균의 참조 스펙트럼을 포함하는 데이터베이스가 부족하여 흔히 다른 균으로 동정이 될 수 있다. *Shigella*의 스펙트럼도 *E. coli*와 유사하여 잘못 동정이 될 가능성이 높다(Seng et al., 2009). 한편 세포벽 구조를 깨기 어려운 단백질의 신호가 불충한 경우가 있는데, 효모(yeast)를 깨기 위해서는 추가적인 단백 추출 과정이 필요하다. 그리고 *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*에서 캡슐이 존재하여 효과적으로 분해되지 않으므로 스펙트럼의 질이 나빠 잘못 동정이 될 가능성이 높다. *Actinomyces*, *Gemella*, *Nocardia*, *Streptomyces* 등은 일반적으로 단백질의 스펙트럼 신호가 약하다.

2) 진균의 동정

MALDI-TOF MS에 의한 진균의 동정은 효모형 진균과

사상형 진균(filamentous fungi)에서 차이가 있다. 효모형 진균은 단백질 추출 과정만 추가하면 우수한 성적을 보이나 사상형 진균은 아직 표준화된 추출 과정이나 참고 스펙트럼이 부족한 실정이어서 아직까지 표현학적 특성에 의해 동정을 많이 하고 있다. Marklein 등 (Marklein et al., 2009)의 보고에 의하면 267예의 임상에서 분리된 효모형 진균 중 92.5%가 속 수준에서 정확하게 동정되었으며, van Veen 등 (2010)이 보고에서는 85%의 효모형 진균이 정확히 동정되었다(Table 1). 한편 Lee 등 (Lee et al., 2017)의 보고에 의하면 309개의 균주 중 *Candida* 및 *Cryptococcus neoformans*와 같은 흔히 분리되는 효모는 모두에서 정확히 동정이 되었고 흔하지 않은 경우에는 75.8%가 중 수준에서 동정이 되었다(Table 1). 그리고 모든 효모의 동정에서는 단백질 추출 단계를 추가해야 정확한 동정이 가능하였다.

3) 임상 검체로 부터 세균의 직접 동정

MALDI-TOF MS에 의한 균의 동정 과정에 다양한 임상 검체와 외부의 영향을 받지 않고 표준화하기 위해서는 검증된 배지에 배양된 집락을 이용하여야 한다(CLSI 2018). 그러나 미생물에 의한 배양시간을 줄이기 위해 임상 검체로부터 직접 균의 동정하려는 시도가 이루어지고 있다. 이들 검체 종류에는 혈액, 소변, 뇌척수액 및 흉수 등이 있으며 이들의 임상 검체를 직접 검사할 때의 단점은 검체에서 균의 농도(수)가 적다는 것이다. 따라서 이 단점을 극복하기 위해 많은 양의 검체가 필요한데, 여기서는 혈액과 소변에 대한 연구들에 대해 알아보겠다.

Table 3. Performance of MALDI-TOF MS identification directly obtained from positive blood culture bottles

Reference study	Sample (n)	Blood culture system	Concordant identification level (%)		Species of difficult identification
			Species	Genus	
Prod'hom et al. (2010)	126	Bactec	78%	79%	<i>S. mitis</i> Group
			GN:89%	GN:89%	<i>Staphylococcus</i> spp.
			GP:72%	GP:73%	
La Scola and Raoult (2009)	599	Bactec	66%	66%	<i>Streptococcus</i> spp.
			GN:91%		Polymicrobial samples
			GP:49%		
Ferreira et al. (2010)	300	Bactec	43%	72%	<i>S. mutans</i>
			GN:83%	GN:97%	<i>Staphylococcus</i> spp.
			GP:32%	GP:66%	
Jo et al. (2016)	208	Bactec	77.2%	81.8%	<i>Streptococcus</i> spp.
			GN: 92.6%		CoNS
			GP:73.9%		

Abbreviations: GN, gram negative; GP, gram positive; G, group; CoNS, coagulase negative Staphylococci

(1) 혈액배양

혈류감염 동안 세균의 양은 밀리리터(mL)당 1~10 CFU 정도이기 때문에 혈액을 직접 이용할 수는 없지만 자동 혈액배양기에서 양성 신호를 보낸 혈액 병에는 밀리리터 당 $10^6 \sim 10^8$ CFU이 존재하므로 이들 검체를 이용하면 MALDI-TOF MS로 균의 직접 동정이 가능하다. 그러나 혈액배양 병에는 다양한 물질들이 있으므로 특별한 검체의 전 처리가 필요하다. 직접 혈액배양 병 검사의 전 처리(pretreatment)는 3단계로 이루어지는데, 1) 혈액세포를 분리시키는 원심분리 단계, 2) 적혈구 용혈 단계 그리고 3) 세척 단계가 포함된다(Croxatto et al., 2012). 최근에 연구된 혈액배양 양성 검체에서 직접 동정한 성적을 표에 정리하였다(Table 3). 종 수준에서 일치도를 보면 그람음성 균에서는 83~92.6% 정도로 우수하였으나, 그람양성 균에서는 32~78%까지 다양하였다. 특히 Streptococci, coagulase negative Staphylococci 등의 일치율이 낮았다. 기타 혈액을 순수 배양하지 않고 직접 동정하게 되면 여러 가지 균이 감염되었을 경우는 동정이 되지 않는 가능성이 높다.

(2) 소변 배양

비뇨기계 감염(urinary tract infection)을 갖는 환자는 소변 1 mL당 10^5 CFU의 균이 존재하는 경우가 많으므로 MALDI-TOF MS로 소변을 직접 검사하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 그리고 소변을 직접 검사한 연구에서

MALDI-TOF MS의 분석관에는 1~2 μ L만 사용되며, 소변 내에 있는 백혈구나 적혈구와 같은 세포의 전 처리 과정의 문제로 인하여 균의 분리 성적은 낮았다. 그렇지만 Croxatto 등 (2012)은 소변 내 균의 수가 $10^7 \sim 10^8$ /mL 이상이고 적절한 검체의 전 처리 후에는 종(species) 단계에서 정확히 동정하는 정도가 69~70%이었다고 보고하였다.

3. 가까운 미래에 임상미생물 검사실에서 MALDI-TOF MS의 적용

1) 세균의 아형 분류

정확한 세균의 동정과 아형 분류는 감염질환의 감염관리에도 매우 중요하다. 표현형에 의한 아형 분류는 분별력이 떨어지고, 전통적인 분자유전학적 분류(molecular typing)는 비용과 시간을 포함한 많은 제약 요인이 있어 실제로 시행할 수 있는 검사실이 적은 실정이다. MALDI-TOF MS는 단백질의 많은 스펙트럼을 검출하므로 밀접하게 관련된 종을 구별하여 종 수준에서 동정할 수 있을 뿐 아니라 아종(subspecies) 수준에서도 동정이 가능하여 미생물의 아형 분류가 가능하다(Dieckmann et al., 2008; Williamson et al., 2008; Lartigue et al., 2009; Cherkaoui et al., 2010). PFGE (pulse field gel electrophoresis)와 같은 전통적인 아형 분류 방법은 수행에 수일이 걸리며 숙련된 검사자와 경험이 많은 연구자가 필요하다. MALDI-TOF MS는 수시간 내에 분류가 가능하며 재현성과 예민도(sensitivity)도 우수하다. 그렇지만 MALDI-TOF MS에 의한 분류는 세균의 동정과

달리 검체의 준비 및 분석 방법이 달라야 하고 여러 가지 검사 요인(parameter)을 최적화하는 것이 절대적이다. 즉 중 수준에서 동정은 몇 개의 바이오 마커가 이용되나 분류를 위한 아중 수준에서 동정은 보다 많은 재현성 있는 피크뿐만 아니라 스펙트럼을 분석할 수 있는 많은 데이터베이스도 필요하다(Dieckmann et al., 2008; Croxatto et al., 2012). 현재까지 다양한 그람양성 및 음성 세균의 아형 분류에 MALDI-TOF MS를 이용한 연구들이 보고되고 있다. 대표적으로 그람양성 세균에서 메치실린 내성 황색 포도알균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)를 포함한 *S. aureus*의 아형 분류에 성공적으로 적용하였으며(Wolters et al., 2011), 그 외 *Streptococcus pneumoniae* (Williamson et al., 2008), Group B Streptococci (Lartigue et al., 2009), *Streptococcus pyogenes* (Moura et al., 2008) 등에 적용한 보고가 있다. 그람음성 세균에서는 *Salmonella enterica* (Kuhns et al., 2012), *Escherichia coli* (Clark et al., 2013), *Klebsiella pneumoniae* (Berrazeg et al., 2013)에서 적용되었으며, 2015년에는 중환자실에서 창궐하는 주요 원인 균인 *Acinetobacter baumannii*와 *Pseudomonas aeruginosa* (Spinali et al., 2015)에도 적용되었다. 앞으로 보다 많은 적절한 참조 균주의 스펙트럼이 데이터베이스에 추가되고 이들을 해석할 수 있는 소프트웨어가 발전하게 되면 앞으로 미생물의 아형 분류는 MALDI-TOF MS로 대체될 가능성이 매우 높다(Biswas et al., 2016).

2) 항균제 내성의 검출

항균제 내성의 증가는 현재 의료에서 매우 중요한 문제이다. 세균에서 항균제 감수성 또는 내성에 대한 조기 결정이 환자의 치료에 매우 중요하므로 MALDI-TOF MS를 이용한 빠른 내성 검출이 요구되고 있다. MALDI-TOF MS는 미생물의 동정에 매우 유용하여 많은 임상 검사실에 도입되어 사용되고 있는데, 2010년 이후에 항균제 내성의 검출에 MALDI-TOF MS를 적용하는 많은 시도들이 이루어지고 있다. 이 중에서 MALDI-TOF MS의 carbapenemase의 검출은 임상미생물 분야에서 매우 큰 영향을 미치는 예 중 하나로 현재 일부 검사실에서 이용하기도 하고 있다. 기타 MRSA 및 반코마이신 내성 장구균(vancomycin resistant Enterococci, VRE)에서 내성 바이오 마커의 검출에 대한 연구들이 이루어지고 있다(Hrabák et al., 2016).

(1) β -lactamase의 검출

β -lactamase는 β -lactam 항생제의 아미드 결합(amide bond)를 가수분해하면 18 Da의 분자량이 증가하게 되고, 가수분해된 후 부산물이 decarboxylation 되며 분자량이 44 Da 감소하게 되어 최종적으로 26 Da이 감소한 최종 산물(decarboxylated degradation product)이 생기게 된다. β -lactam 항생제의 특이한 스펙트럼을 MALDI-TOF MS로 측정할 수 있으므로, 항생제와 미생물을 동시에 배양한 후에 측정하게 되면 β -lactamase의 존재 여부를 알 수 있게 된다(Sparbier et al., 2012). 즉 β -lactamase가 존재하면 β -lactam 항생제의 독특한 피크가 26 Da이 감소한 위치에서 검출할 수 있는 원리이다(Fig. 3: Hrabák et al., 2012). 이 원리를 이용하여 carbapenem을 가수분해하는 carbapenemase를 검출하는 방법이 보고되어 검사실에서 이용되기도 한다(Burckhardt et al., 2011; Hrabák et al., 2012). 특히 DHB 매트릭스를 사용한 MALDI-TOF MS로 meropenem을 가수분해하는 carbapenemase를 검출하는 방법이 보고되었다(Hrabák et al., 2014). 게다가 β -lactamase 억제제를 이용하면 β -lactamase의 종류도 구별할 수 있는데, clavulanic acid나 tazobactam을 이용하여 ESBL (extended-spectrum β -lactamase)을 구분할 수 있으며 EDTA 및 phenylboronic acid의 사용으로 carbapenemase를 구분할 수도 있다. Carbapenemase를 MALDI-TOF MS로 검출하는 것은 임상에 매우 큰 영향을 줄 수 있는데, 아직까지 스펙트럼의 해석을 수기법으로 하기 때문에 일부 검사실에서만 진행하고 있다. 현재 소프트웨어가 개발 중이긴 하지만 자동해석 소프트웨어[예; Bruker, MBT STAR-BL]가 개발되면 carbapenemase의 검출이 상용화 될 수 있을 것이다.

(2) MRSA 및 VRE의 내성 검출

MSSA (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*)와 MRSA를 MALDI-TOF MS로 빠르게 구별하는 것은 임상 미생물 검사실에서 매우 유용한 일이다. 이들을 구별하기 위해 MRSA에 대한 독특한 피크가 개발되어 감별에 이용된 연구(Edwards-Jones et al., 2000; Du et al., 2002)들이 보고되었지만 아직까지 MRSA에 특징적인 PBP2a를 검출하는 것은 보고되지 않았다. VRE를 검출하려는 MALDI-TOF MS의 시도도 이루어지고 있으며, Griffin 등 (2012)은 vanB VRE를 검출하였다. 그러나 아직까지 VRE의 대부분을 차지하는 vanA VRE를 검출한 보고는 없었다. 앞으로 MRSA와 VRE와 같이 단일 유전자로 내성기전을 나타내

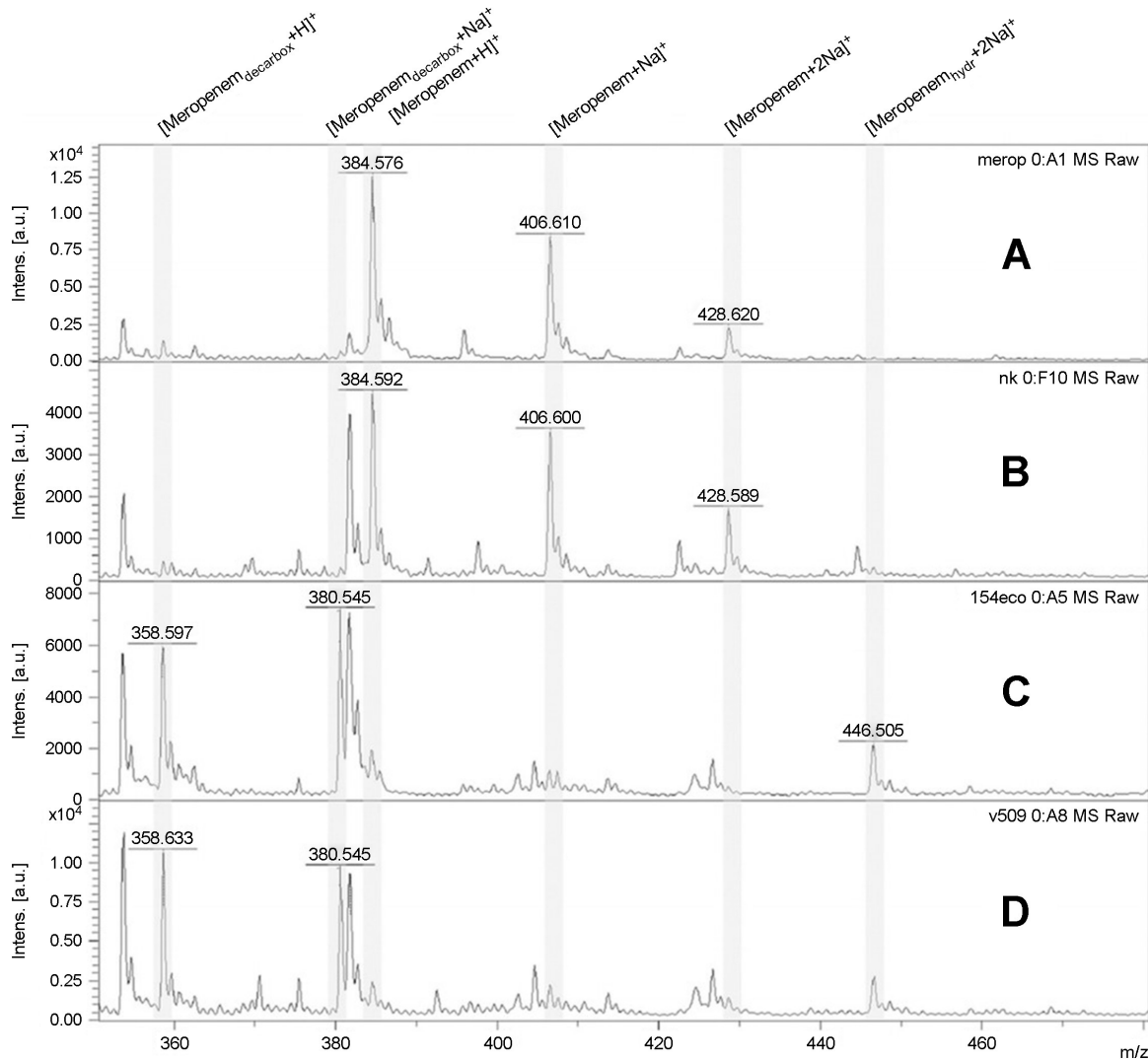


Fig. 3. MALDI-TOF MS spectrum of meropenem, sodium salts of meropenem, and degradation products by carbapenemase. (A) Spectrum of meropenem solution, (B) Non-carbapenemase-producing isolate of *Klebsiella pneumoniae*, (C) carbapenemase (NDM) producing *Escherichia coli*, (D) carbapenemase (NDM) producing *Acinetobacter baumannii*. In C and D (carbapenemase producing), MALDI-TOF MS showed three new peak, which are a peak of hydrolysed meropenem-2Na⁺ (446.5 m/z from 428.6: 18 Da[↑]), two peak of decarboxylated meropenem-H⁺ (358.6 m/z from 384.6: 26 Da[↓]) and meropenem-2Na⁺ (380.5 m/z from 406.2: 26 Da[↓]) (Hrabák et al., 2012, J Clin Microbiol).

는 균을 MALDI-TOF MS로 검출하는 것은 매우 유용하기 때문에 더 많은 연구가 이루어질 것으로 예상된다.

4. 더 먼 미래의 MALDI-TOF MS 적용 기술

MALDI-TOF MS는 빠르고 분석 과정의 비용이 저렴하며, 신뢰할 만한 결과를 보이므로 임상미생물 검사실에서 미생물의 동정의 표준 방법이 될 것이다. 그리고 미생물을 동정할 뿐만 아니라 아형 분류와 내성 검출에 중점적인 연구가 진행될 것이다. 게다가 MALDI-TOF MS의

기기 및 소프트웨어의 발전은 미생물 분야에서 자동화를 가능하게 할 수 있을 것이다(Schubert and Kostrzewa, 2016). 더 먼 미래에는 immunoaffinity와 MALDI-TOF MS를 결합한 immune-MALDI에서도 특이도(specificity)를 한층 높일 수 있을 것이다(Sparbier et al., 2009). Imaging mass spectrometry (IMS)는 자연계에 있는 서로 다른 biomolecule의 분자지도(molecular mapping)도 가능할 것이다(Walch et al., 2008). 따라서 IMS 기술은 어떤 표식도 없이 조직에 있는 단백질, 펩티드, 소분자(small molecule), 세포 반응산

물(cell metabolite), 지질 등 다양한 분석체(analyte)를 분석할 수 있어 다양한 질환 연구에 이용될 수 있을 것이다(M'Koma, 2014). 특히 IMS가 미생물 분야에 적용하게 되면 병원체와 숙주 사이의 상호작용을 연구할 수 있다는 의미로 감염의 잠재적(potential) 표지자를 발견할 수도 있을 것이다(Moore et al., 2014). 게다가 IMS는 균주 내(intra species), 균주 간(inter species) 그리고 서로 다른 균주 간(polymicrobial) 상호작용(interaction)을 조사할 수도 있을 것이다(Yang et al., 2012).

결 론

지난 수십 년 동안 MADI-TOF MS 보다 임상미생물 실험실에 더 큰 영향을 끼친 기술은 거의 없다. MALDI-TOF MS는 빠르고 정확하며 저비용이며 효율적인 미생물 동정 방법이다. 이 기술은 각 미생물의 고유한 신호인 특징적인 질량 스펙트럼 지문을 생성하므로 세균은 물론이고 혐기성 미생물, Mycobacterium 그리고 곰팡이 등 까다로운 미생물의 속과 종 수준에서 정확한 식별에 이상적인 방법이다. 현재까지 MALDI-TOF MS의 성능 평가 결과를 보면 임상적으로 감염을 일으키는 세균의 동정 수준은 참고 방법인 16S rRNA 염기서열 분석을 제외하고 가장 정확한 결과를 나타낸다. MADLI-TOF MS 적용은 순수 집락이 필요하다는 단점이 있기는 하지만 임상미생물에서 가장 중요한 검체인 혈액배양인 경우에는 매우 우수한 결과를 보이므로 세균 감염증 환자를 조기에 진단하는데 매우 도움이 될 것으로 생각된다. 동정이 까다로운 미생물을 빠르고 정확하게 동정할 수 있다는 것도 매우 큰 장점이나 아직까지 드물게 분리되거나 새로운 미생물에 대한 데이터베이스가 없는 경우에는 동정이 되지 않으므로 이들에 대한 데이터베이스의 확장이 필요하다. 한편 균의 동정을 넘어서 쉽고 빠르게 아형 구분이 가능해져 그 동안 어렵고 오랜 시간의 소요로 대부분의 검사실에서 시행하지 않았던 원내감염의 창궐에 대한 역학조사가 실시간으로 가능하게 되어 의료감염관리에서도 강력한 도구가 될 것이다. 게다가 MALDI-TOF MS는 내성 유전자 결정과 같은 감수성 시험에도 성공적으로 사용되고 있다. 현재는 일부 중요한 내성 유전자 결정에만 적용되지만 범위가 확대되면 감염 환자의 치료에 획기적인 전환이 이루어질 것이라 기대된다.

결론적으로 MALDI-TOF MS는 대부분의 세균을 빠르고 정확하게 동정할 수 있을 뿐만 아니라 아형을 동정하

고 중요한 항균제 내성 유전자를 진단할 수 있는 힘있는 도구로 임상미생물 검사의 발전에 획기적인 전기가 될 것이 확실하다. 이 연구에서 저자는 임상미생물학 및 미생물 연구에서 MALDI-TOF MS의 적용 및 앞으로 적용될 수 있는 분야에 대해 알아보았으며 임상미생물 검사실에 종사하는 연구자들에 유익한 자료가 될 수 있기를 기대해 본다.

ACKNOWLEDGEMENT

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975. 47: 219-225.
- Arnold RJ, Karty JA, Ellinton AD, Reilly JP. Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells. *Anal Chem.* 1999. 71: 1990-1996.
- Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, et al. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS ONE.* 2013. 8: e61428.
- Biswas S, Gouriet F, et al. Molecular typing of Bacteria/fungi using MALDI-TOF MS. In: Kostrzewa M, Schubert S editors. *MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology.* Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2016. p79-92.
- Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'homa G, Greub G Mtrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2011. 49: 693-696.
- Blondiaux N, Gillot O, Courcol RJ. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in teaching hospital in Lille. *Pathol Biol.* 2010. 58: 55-57.
- Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption /ionization with time-of-flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011. 49: 3321-3324.
- Carbonnelle E, Beretti JL, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, et al. Rapid identification of Staphylococci isolated in

- clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2007. 45: 2156-2161.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010. 48: 1169-1175.
- Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, McCorrister SJ, Chong P, Wylie J, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J Microbiol Methods.* 2013. 94: 180-191.
- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996. 14: 1584-1586.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for the identification of cultured microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: M58-1st ed. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.
- Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012. 36: 380-407.
- Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 1999. 71: 2732-2738.
- Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies level using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74: 7767-7778.
- Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin-resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002. 74: 5487-5491.
- Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2000. 49: 295-300.
- Fenn JB, Mann M, Wong SF, Whithouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. 1989. 6: 64-71.
- Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001. 20: 157-171.
- Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Munoz-Bellido JL, Gonzalez-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacterial in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs extraction method. *Clin Microbiol Infect.* 2010. 17: 1007-1012.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012. 50: 2918-2931.
- Haag AM, Tayler SN, Johnston KH, Cole RB. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1998. 33: 750-756.
- Holland RD, Wilkes JG, Raffi F, Sutherland JB, Person CC, Voorhees KJ, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996. 10: 1227-1232.
- Hrabák J, Chudáková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014. 20: 839-853.
- Hrabák J, Dolejšká M, et al. MALDI-TOF MS for determination of resistance to antibiotics. In: Kostrzewa M, Schubert S editors. MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2016, p93-108.
- Hrabák J, Študentová V, Walková R, Žemlicková H, Jakubu V, Chudáková E, et al., Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemase by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012. 50: 2441-2443.
- Jo SJ, Park KG, Han K, Park DJ, Park YJ. Direct identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry and the Vitek 2 system. *Ann Lab Med.* 2016. 36: 117-123.
- Krause E, Wenschuh H, Jungblut RP. The dominance of arginine-containing peptide in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal Chem.* 1999. 71: 4160-4165.
- Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, et al. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE.* 2012. 7: e40004.

- Lartigue MF, Hery-Arnaud G, Haguenoer E, Domelier AS, Schmit PO, Mee-Marquet N, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2009. 47: 2284-2287.
- La Scola, Raoult D. Direct identification bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE.* 2009. 4: e8041.
- Lee HS, Shin JH, Choi JM, Won EJ, Kee SJ, Kim SH, et al. Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry systems using a formic acid extraction method to identify common and uncommon yeast isolates. *Ann Lab Med.* 2017. 37: 223-230.
- Lee W, Kim M, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS), a matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight MS system for identification of anaerobic bacteria. *Ann Lab Med.* 2015. 35: 69-75.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009. 47: 2912-2917.
- M'Koma AE. Diagnosis of inflammatory bowel disease; potential role of molecular biometrics. *World J Gastrointest Surg.* 2014. 6: 208-219.
- Moore JI, Caprioli RM, Skaar EP. Advanced mass spectrometry technologies for the study of microbial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2014. 19: 45-51.
- Moura H, Woolfitt AR, Carvalho MG, Pavlopoulos A, Teixeira LM, Satten GA, et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008. 53: 333-342.
- Prod'hom G, Bizzin A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* 2010. 48: 1481-1483.
- Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem.* 2001. 73: 746-750.
- Schubert S, Kostrzewa M. Future trends and perspectives of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. In: Kostrzewa M, Schubert S editors. *MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology.* Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2016. p157-160.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009. 49: 543-551.
- Sparbier K, Schbert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012. 50: 927-937.
- Sparbier K, Wenzel T, Dihazi H, Blaschke S, Muller GA, Deelder A, et al. Immuno-MALDI-TOF MS: new perspectives for clinical applications of mass spectrometry. *Proteomics.* 2009. 9: 1442-1450.
- Spinali S, van BA, Goering RV, Girard V, Welker M, Van NM, et al. Microbial typing by MALDI-TOF MS: Do we need guideline for data interpretation? *J Clin Microbiol.* 2015. 53: 760-765.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1988. 2: 151-153.
- Vaidyanathan S, Winder CL, Wade SC, Kell DB, Goodacre R. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. *Commun Mass Spectrom.* 2002. 16: 1276-1286.
- van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010. 48: 900-907.
- Walch A, Rauser S, Deininger SO, Hofler H. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol.* 2008. 130: 421-434.
- Williams TL, Andrzejewski D, Lay JO, Musser SM. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J Am Soc Mass Specrom.* 2003. 14: 342-351.
- Williamson YM, Moura H, Woolfitt AR, Pirkle JL, Barr JR, Carvalho MG, et al. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74: 5891-5897.

Wolters M, Rohde H, Maier T, Balmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2011. 301: 64-68.

Yang JY, Phelan VV, Simkovsky R, Watrous JD, Trial RM, Fleming TC, et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. *J Bacteriol.* 2012. 194: 6023-6028.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.3.145>

Cite this article as: Shin KS, Yum J. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Biomedical Science Letters.* 2022. 28: 145-156.