



REVIEW ARTICLE

Application of Matrix-assisted Laser
Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

Pil Seung KWON

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight
Mass Spectrometry의 활용

권필승

원광보건대학교 임상병리과

ARTICLE INFO

Received November 6, 2023
Revised November 17, 2023
Accepted November 21, 2023

Key words

Direct method
Matrix assisted laser desorption/ionization
time-of-flight mass spectrometry
Pathogenic microorganism identification

ABSTRACT

The timeliness and accuracy of test results are crucial factors for clinicians to decide and promptly administer effective and targeted antimicrobial therapy, especially in life-threatening infections or when vital organs and functions, such as sight, are at risk. Further research is needed to refine and optimize matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based assays to obtain accurate and reliable results in the shortest time possible. MALDI-TOF MS-based bacterial identification focuses primarily on techniques for isolating and purifying pathogens from clinical samples, the expansion of spectral libraries, and the upgrading of software. As technology advances, many MALDI-based microbial identification databases and systems have been licensed and put into clinical use. Nevertheless, it is still necessary to develop MALDI-TOF MS-based antimicrobial-resistance analysis for comprehensive clinical microbiology characterization. The important applications of MALDI-TOF MS in clinical research include specific application categories, common analytes, main methods, limitations, and solutions. In order to utilize clinical microbiology laboratories, it is essential to secure expertise through education and training of clinical laboratory scientists, and database construction and experience must be maximized. In the future, MALDI-TOF mass spectrometry is expected to be applied in various fields through the use of more powerful databases.

Copyright © 2023 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

서론

MALDI-TOF 질량분석기(matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)는 유럽의 임상미생물 분야에서 시작하여 다양한 응용 분야가 있지만, 세균 단백질의 대량 분포에 대한 자동화, 대용량

처리 분석을 기반으로 세균과 곰팡이를 식별하는데 빠르고 광범위한 일반 세균과 복잡한 세균 및 곰팡이에 적용 가능한 방법이다. 해당 기술은 임상미생물 검사실의 최신 응용 분야로 세균, 결핵균 및 진균의 동정과 다양한 검체별 검사에 활용되는 MALDI-TOF MS에 대해 장점과 한계에 대해 알아보하고자 한다. MALDI-TOF MS는 세균의 리보솜 단백질의 질량 대 전하 비율(mass to charge ratio, m/z)의 검출에 의존하며, 이는 짧은 시간 내에 세균의 고유한 질량 스펙트럼을 제공하게 된다[1].

현재 국내에 소개된 장비로는 MALDI Biotyper[®] [MBT] sirius IVD System (Bruker Corp.), VITEK[®] MS (BioMérieux

Corresponding author: Pil Seung KWON

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University,
514 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

E-mail: pskwon@wu.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9808-4200>

Inc.), MicroIDSys LT (ASTA Corp.)가 있다.

VITEK[®] MS와 MBT CA System (Bruker Corp.)의 2가지 시스템이 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration, FDA)의 배양균 동정 승인을 받았으며 최근 Bruker Corp. 및 BioMérieux Inc.의 질량분석기는 데스크탑 장비로 업그레이드 된 모델이다. 또한, FDA가 승인한 유기체 목록은 제한적이지만 라이브러리(예: Research Use Only [RUO] MBT Reference Library v3.3.1.2, Security Relevant library v1.0; MBT Compass Reference library with China Centre of Industrial Culture Collection)를 사용한다[2]. 이 기술은 스펙트럼에서 검출되는 바이오마커의 이온 피크별 분포를 고려하지 않고 세균의 “지문”을 나타내는 일련의 이온 피크에 의해 획득된 특징적인 질량 프로파일에 의해 결정된다[3]. 가장 가까운 일치치를 기반으로 스펙트럼을 참조 균주의 스펙트럼과 비교하여 가장 근접하는 일치율에 따라 동정된다[4]. 또한, 핵산, 유기 분자, 단백질 및 미생물 세포와 같은 다양한 유형의 유기 분자를 분석하는 데 사용할 수 있으나 단백질과 미생물학 응용 분야에 가장 광범위하게 활용된다[5].

세균의 식별을 위한 가장 신뢰할 수 있는 바이오마커는 단백질, 특히 리보솜 단백질이다. 리보솜 단백질의 특징은 풍부함과 일부 소수성을 포함하는 효율적인 이온화가 특징이다[6]. 따라서, 대략 2,000~20,000 Da의 리보솜 단백질 펩타이드에 대한 적절한 양이 안정적인 질량 신호를 얻을 수 있다. 질량 신호는 속, 종, 심지어 아종 수준까지 보존되는 일련의 피크로 구성된 프로파일 스펙트럼을 통해 동정된다[7].

MALDI-TOF MS는 임상 미생물 검사분야에서 배양된 세균과 곰팡이를 빠르고 정확하게 동정하기 위한 도구로 자동화되고 처리량이 높고 광범위한 일반 세균과 동정이 어려운 세균 및 곰팡이에 적용된다. 액체 검체에서 미생물을 직접 확인할 수 있어 신속하며 환자 예후를 개선하고 입원 기간을 단축시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 또한 임상미생물 검사실에서 필수적인 도구로 간주되며 임상 적용 범위가 확장되어 유세포 분석과 같은 다른 기술들과 결합되고 있다.

최근 발전된 기술로는 미생물 동정을 넘어 기존 MBT 소프트웨어, 라이브러리 및 소모품과 완벽하게 호환되는 새로운 Bruker MBT Sirius가 시판되고 있다. 양이온 모드에서 사용되는 MALDI-TOF MS는 일상적인 미생물 동정을 허용하는 반면, 음이온 모드는 지질 분석과 같은 미생물 연구 응용 분야로 확대되었다. 지질체학(lipidomics)은 콜리스팅 내성 박테리아에서 지질 A에 대한 콜리스팅 내성 관련 변형과 같은 내성 메커니즘의 신속한 식별을 제공하는 새로운 오믹스(omics) 분야이다. 이후

로는 번역 후 변형(translation modification), 단백질 또는 대사산물을 탐지하는 새로운 라이브러리를 구축하여 감염 진단에 활용할 것으로 보인다.

MALDI-TOF MS는 임상미생물학 실험실에서 적극 활용되어 확산되는 추세이고 현재 데이터베이스에는 일반적인 유기체에 대한 적용 범위가 부족하지만 지속적으로 정보 축적이 요구된다. 이 논문에서는 신기술에 대한 임상미생물 검사실의 최신 활용 분야 및 다양한 분야에서의 활용측면에 대해 알아보고 장점과 한계점에 대해 다루고자 한다.

본 론

1. 임상미생물 검사실에서 활용

세균과 진균을 동정하는 것은 배지에서 자란 집락을 그림염색, 수동 또는 자동화 생화학 검사와 부가적인 검사를 통해 이루어졌으나 MALDI-TOF MS를 사용하면 복잡하거나 난이도 있는 기술을 요구하지 않고 소량의 집락으로 몇 분 안에 콜로니를 신속하게 동정 감별할 수 있다. 이에 따라 그림염색의 정보가 항상 필요하지 않다. 그리고, 16S rRNA 유전자 염기서열분석의 비용이 절감되고, 폐기물 처리가 감소하며 검사실내의 교육과 노동력이 수월하게 되었다. MALDI-TOF MS는 고전적인 방법(conventional phenotypic identification)과 유전자 염기서열 분석에 비해 시간이 55~169배가 줄고, 비용이 5~96배로 감소하였다고 보고하고 있다[8].

MALDI-TOF MS는 인간 감염병과 관련된 희귀한 세균의 동정에 강력한 기술로 임상 진단측면에서 분자진단의 대안과 연구용으로 감시활동을 하는데 도움을 줄 것이다. 그리고 점진적인 데이터베이스의 축적을 통해 비용의 감소, 종 감별의 소요시간의 단축, 검사자들의 작업 횟수 감소가 되었다. 피부사상균 동정을 위한 MALDI-TOF MS의 수행은 공급 비용은 연간 \$20,020에서 \$2,340로 감소, 소요 시간은 1.5일 이상이 단축되었다. MALDI-TOF MS는 정확한 종 수준, 뿐만 아니라 아종, 형질을 동정하는데 활용되고 있으며 *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* 등이 대표적이다.

MALDI-TOF MS (MBT)를 이용한 동정 과정은 (1) 집락을 검체 플레이트로 옮겨지고 레이저 조사에 노출된다. 매트릭스가 첨가되고 건조되면, 플레이트는 장비에 장착된다. (2) 플레이트는 레이저에 조사되고, 세균내의 단백질(주로 리보솜 단백질)은 이온화되고 이온화된 단백질이 질량 대 전하비(m/z)를 결정하고 검출기에서 측정된 신호의 세기는 질량 스펙트럼(pattern)에 제공된다. (3) 검출된 질량 스펙트럼은 세균을 감별하기 위해

참조 데이터베이스에 있는 스펙트럼과 비교되어 측정된다. 참고로 이때 사용되는 매트릭스는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid는 레이저의 에너지를 효율적으로 흡수하고, 양성자를 제공하여 시료의 이온화를 촉진시키며 시료가 분해되는 것을 방지하는 역할을 수행한다.

대장균의 MALDI 질량 피크의 약 50%는 리보솜 단백질(번역 후 수정된 일부 포함)이고, 다른 피크는 DNA 결합 단백질과 cold shock 단백질이다. 이처럼 세균의 종 특이적 단백질이 공통적 단백질의 피크가 존재하게 되어 동정하게 된다. 이처럼 알려진 수천 개의 표준 균주의 도식화된 질량 스펙트럼 패턴인 주요 스펙트럼 프로파일(major spectrum profile)은 데이터베이스에 등록되어 감별 동정하게 되며 16S rRNA 염기서열 분석 결과와 일치하는 것을 기반으로 하고 있다[9].

직접 도말법을 이용하면 장내세균 및 기타 그람음성막대균은 정밀도 좋게 동정되지만, 포도알균, 장알균 등 그람양성균 또는 효모를 정확하게 동정하는 것은 아직 다소 제한적이라고 할 수 있다. 이는 세포벽 구조의 차이 때문으로 추정된다. 이에 검사실에서는 세균 세포로부터 단백질을 제대로 추출하지 못하면 필요한 스펙트럼 정보를 얻을 수 없게 된다. 따라서 시료 플레이트에 집락을 도포한 후 세포벽 파괴를 촉진하기 위해 포름산 추출(on-plate) 방법을 적용하여 정확한 동정의 확률을 높게 된다[10, 11]. 동정을 위한 score가 부족한 경우, 온 플레이트(on-plate) 방법을 사용하여 충분한 질량 스펙트럼을 얻지 못한 것으로 검체에서 추출되는 단백질의 양이 적기 때문이다. 이 경우는 에탄올-포름산 추출법이 효과적이며 에탄올 처리 후 단백질 추출과 포름산(formic acid) 및 아세토니트릴(acetonitril)의 조합에 더 효율적이다[12, 13].

또한, 특정한 경우에는 세포벽의 물리적 파괴를 막기 위해 에탄올-포름산 추출 및 실리카 비드나 MycoLyser (silica/zirconia beads; BioSpec Products)를 추가하여 활용하게 된다. 이는 그람양성 세균의 강한 포자와 세포벽까지도 물리적으로 더 효율적으로 분해하여 세균 단백질을 추출하는 것을 향상시킨다. 이 실리카 비드는 항산균 단백질을 추출하기 위한 효과적인 도구로 활용된다[14, 15]. 또한, Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) 가이드라인(M58)에는 언급되지만 환자에게서 직접 미생물을 동정하는 것과 관련된 지침을 제공하기 위한 것은 아니며 MALDI-TOF MS를 사용한 항균제 감수성 검사는 다루지 않는다. 여러 연구에서 MALDI-TOF MS가 이러한 목적으로 적용될 수 있음이 입증되었지만 진단 실험실 환경에서의 유용성은 아직 정의되지 않았다.

2. 임상 검체에서 직접 검사로 활용

MALDI-TOF MS의 검출 한계가 높기 때문에 임상 검체를 직접 검사하는 것은 일반적으로 어렵지만 임상적으로 감염된 소변에는 세균의 수가 많기 때문에 소변을 직접 검사할 수 있어 선별 검사에도 활용될 수 있다. MALDI-TOF MS를 통한 소변 검체의 분석을 위해서는 양성 검체를 선별하고 검체의 전처리를 해야 한다. 제한점은 복합균 감염에서는 검출할 수 없다는 것과 α -디펜신과 같은 요중 단백질에 의한 검출 장애요인이 있다. 또한, 단백뇨 자체로는 분석이 불가능하고 이를 해결하기 위해서는 단백질의 추출을 위한 기법이 도입되어야 하며 탈염처리에 의한 분리, 농축, 여과 등의 방법이 활용되어야 한다.

소변을 통해 간질환과 용혈성 장애를 선별하게 된다. 이에 소변 검체에서 세균의 수가 일정 수준 이상이면 요로감염(urinary tract infections)의 진단을 위한 세균 동정에도 활용될 수 있으며, 최근에 1시간 안에 짧은 배양으로 소변 fast lipid analysis technique 추출법을 통해 MALDI-TOF MS로 그람음성세균을 동정하게 되어 비뇨생식기 병원체의 동정에 활용된다[16]. 세균성 뇌수막염은 위중한 질환으로 신속한 치료가 필요하며 원인이 되는 병원체를 검출하기 위해 그람염색과 먹물법 등으로 관찰하여 세균의 존재 여부를 판단하여 광범위 항생제 치료를 수행하게 된다. 이에 MALDI-TOF MS를 통해 원인균을 검출할 수 있다면 임상적으로 유의미할 것으로 판단된다. 뇌척수액(cerebral spinal fluid, CSF)과 같은 검체에서도 직접 검사가 가능하여 특정 당구조를 측정하거나 specific N-glycan 측정에서도 활용된다[17]. 그러나 뇌척수액(CSF)에는 다양한 세포 유형이 존재할 수 있으므로 분석 전에 전처리가 중요하다.

3. 혈액 배양에서 전처리 및 활용

MALDI-TOF MS는 혈액 배양병에서 자라는 미생물을 신속하게 식별하는 데 사용할 수 있다. 양성 배양병은 고체배지로 계대배양될 수 있으며 짧은 배양 기간(예: 2~4시간) 후에 MALDI-TOF MS로 검사할 수 있다. 또는 혈액 배양병에서 직접 검사할 수도 있다. 혈액 배양병에 직접 측정은 다양한 거대분자가 포함되어 있기에 적절한 전처리가 요구된다. 처리에는 원심분리, 세척, 혈액 세포의 선택적 용해, 혈청 분리, 여과 등이 수행될 수 있다. MBT Sepsityper[®] IVD Kit (Bruker Corp.)는 그람양성세균의 동정률을 높이기 위해 포름산을 이용한 on-plate법을 활용하여 적절하게 이용하게 되며 주로 그람음성균을 동정하는데 활용된다. VACUETTE[™] Z Serum Sep Clot Activator Tube (Greiner Bio-One)는 그람양성세균 동

정이 어려울 경우 백업용으로 활용된다[18-20].

패혈증은 신속한 진단과 치료가 필요하기에 어떤 특정 장기가 영향을 받는지 불분명한 상황에서 혈액 배양은 정보에 유용하다. 세균을 식별하기 위한 MALDI-TOF MS의 사용은 일정 임계치 이상의 세균의 양적 한계를 요구하므로 혈액 배양이 긍정적으로 판단되는 즉시 배양액을 이용하여 MS 기반 동정을 직접 수행하는 것이 가능하다. 성공적인 동정을 위해 혈구 및 미생물의 단계적 침강, 혈구를 제거하기 위한 저속 원심분리, 용해 과정, 혈청 분리기 튜브를 사용한 혈구 제거, 사포닌 사용이 중요하다. 이를 위한 사용화된 키트는 다음과 같다. MBT Sepsityper[®] IVD Kit는 널리 사용되는 Conformité Européenne In-vitro Diagnostic Medical Device Directive (CE-IVD) 인증 및 FDA 승인 키트이며, 수많은 연구에서 이 키트를 사용하여 성공적인 직접 동정에 사용되고 VITEK[®] MS 혈액 배양 키트 (BioMérieux Inc.)는 또 다른 상용화된 것으로 현재 RUO 라벨이 붙어 있어 이 키트를 사용하면 다양한 미생물을 중 수준에서 정확하게 식별할 수 있는 비율이 높다. Rapid BACpro[®] II (Nittobo Medical Co.)는 비교적 새로운 CE-IVD 인증 키트로, 미생물의 효율적인 분리를 위해 폴리알릴아민-폴리스티렌 공중합체를 사용한다[21].

임상 검체에서 혈액 배양물의 헤모글로빈과 같이 세균으로부터 유래하지 않는 많은 양의 단백질이 존재할 수 있다. 따라서, 세균의 세포를 선택적으로 회수하기 위한 혈구 분리와 같은 전처리 단계가 필요하다. 표준화된 임상전처리 방법이 요구되고 처리 시간이 빠르고 편리하다.

4. 결핵균 동정을 위한 MALDI-TOF MS의 활용

무산소성 세균과 마찬가지로 결핵균의 동정은 어렵기에 다양한 생화학적 동정시험, DNA probe, HPLC/GC, 유전자 염기서열분석을 수행한다. *Cutibacterium* spp., *Fingoldia magna*, *Bacteroides fragilis/fragilis* 그룹 및 *Parvimonas micra* 등 무산소성 세균의 Bruker MBT 시스템 동정은 빠르고 저렴하며 신뢰성이 높아 다양한 무산소성 속과 종의 수가 증가했다. 이에 MALDI-TOF MS는 고전적인 동정방법보다 클러스터 분석을 사용하여 결핵균종간의 신속한 동정에 유용하게 활용된다. 그러나 결핵균의 세포벽에는 지질이 풍부하여 세포파괴를 위한 특별한 처리가 필요하고 단백질을 얻기가 어렵다. 이에 따른 데이터베이스의 개발이 요구되는 점이 있다. Bruker Corp.에서 권장하는 MycoEx와 에탄올로 세포 파괴를 향상시키기 위해 MagNA Lyser 기기를 사용하여 MALDI-TOF MS 결과를 비교한 결과, 결핵균 세포 파괴 및 단백질 추출을 위한 MycoLyser

법이 결핵균 식별을 위한 적절한 것으로 보고하였다[14].

비결핵항산균(non-tuberculosis *Mycobacterium*, NTM)으로 인한 감염을 성공적으로 진단, 치료 및 관리하려면 정확하고 신속한 결핵균 동정이 필요하다. 이에 계대배양된 결핵균을 효과적으로 동정하기 위해 MGIT 배양액으로 NTM을 MALDI-TOF MS로 빠르고 정확하게 동정하는 것이 효과적으로 보고하였다[22].

MALDI-TOF MS에 의한 NTM 동정의 주요 과제는 단백질 추출 프로토콜과 NTM 데이터베이스의 업데이트이다. MBT Mycobacteria Library v6.0 (Bruker Corp.)에서 높은 신뢰도 점수 ≥ 1.80 으로 동정되어 NTM의 MALDI-TOF MS 동정이 중요함을 시사하였다[23].

5. 진균 동정을 위한 MALDI-TOF MS의 활용

MALDI-TOF MS는 효모 등 진균을 식별하는데 세균과 동일한 포름산(formic acid)을 통해 사용한다. MALDI Biotyper의 효모 4종의 동정(*Candida parapsilosis*, *C. Tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*)의 민감도는 98.7%인 반면, VITEK MS의 효모 동정 민감도는 96.8%로 보고하였으나[24], 최근에는 위 4종에 대해서는 100% 동정된다. 그리고 *Meyerozyma caribbica*, *Cyberlindnera fabianii*, *C. dubliniensis*가 추가된 19종의 효모 동정에서는 MBT의 경우 96.7%, VITEK[®] MS의 경우 91.7%로 나타나 차이를 보였다. 짧은 시간 내에 90% 이상의 효모 분리균을 동정하였으나 시스템의 단점은 일부 종은 데이터베이스에 존재하지 않으며 밀접하게 관련된 종을 구별할 수 없다는 것이다. MALDI-TOF MS 시스템의 감도는 희귀한 임상 효모 종식별을 위한 분류학적 개발과 병행하여 데이터베이스 확장을 지속적으로 수행해야 할 것이다[24].

MALDI-TOF MS를 사용하여 사상균에 대해 정확한 동정을 향상시키기 위해 ID-fungi plates[®] (IDFP) (Conidia Laboratory) 배지가 MALDI-TOF MS 플레이트에 쉽게 부착할 수 있어 고전적인 Sabouraud dextrose medium 배지보다 유용한 것으로 보고하고 있다. IDFP 배지는 *Aspergillus* 및 이외 진균이나 피부 사상균에 대해 72시간 이내에 만족스러운 동정을 수행할 수 있다. 느리게 자라는 진균에서는 신뢰할 수 있는 동정결과를 얻을 수 있어 업무의 효율성이 증가되었다. MS identification (MSI) 데이터베이스(Bruker 2.0 filamentous fungi database)는 *Aspergillus* 및 non-*Aspergillus* 진균에 유용한 것으로 보이지만 피부사상균은 여전히 개선이 필요하다. 또한, 손톱, 모발 및 피부 검체의 직접 배양을 고려해야 하는 부분이 필요하다[25].

MALDI-TOF MS에 의해 2008년부터 2015년 사이에 발표된 10개 연구에서는 정확도가 피부사상균에 대해 13.5%~100% 사이로 다양하게 나타났다[26]. 그리고 이러한 변동성은 부분적으로 일상적인 임상검사실의 과정에서 일어나는 불일치로 인해 발생하거나 정확한 종 동정을 위해서는 완전한 포름산-아세트니트릴 단백질 추출 단계와 시판된 라이브러리를 모두 사용하는 것이 필수적으로 인식되었다. 이는 거시적 및 미시적 형태로 오랜 시간이 걸리고 작업 수행력에 몰두해야 하는 피부사상균 동정에 대한 대안으로 활용될 수 있다[26]. 액상 MALDI-TOF MS 실험과정은 표준화된 처리과정이 중요하기에 두부백선 감염에서 분리된 피부사상균을 동정하는데 만족스럽지 못한 결과를 보인다. 액체배지에서 육안으로 확인되지 않은 진균의 경우는 고체배지보다 시간이 더 소요되어 빠른 동정에 어려움이 있다. 균주는 액체 또는 고체 배지에서 다르게 성장하기에 서로 다른 단백질 패턴을 초래할 수 있다. 이에 따라 배지성상에 따른 단백질 발현은 MALDI-TOF MS 분석에 특별한 영향을 미치게 된다. 특히, 검체의 직접 접종을 통한 *Trichophyton* 종 동정이 어렵다.

또한, 균종마다 성장조건이 다르기에 *Microsporum canis*와 같은 종은 솜털형 집락(fluffy colony)으로 높은 정확한 동정률(rates of correct identifications, RCI [%], in %)로 정확하게 동정된다. 그러나 *T. soudanense*, *T. violaceum*, *M. audouinii*와 같은 *Trichophyton* 종은 일반적으로 고체 배지에 더 잘 증식한다. 이에 따라 *T. tonsurans* 계통은 종종 *T. interdigitale*로 잘못 동정되는 교차동정이 이루어지는데 이는 주요 피크가 겹치거나 스펙트럼의 강도와 피크가 다르기 때문으로 판단된다. 정확한 동정을 위해서도 데이터베이스가 중요한 점이다. Bruker 3.0 사상균 데이터베이스에는 *M. audouinii* 및 *T. soudanense*와 같은 두부백선의 참조 스펙트럼이 부족하여 동정이 어렵다. Bruker 데이터베이스에는 액체 배양에서 유래한 참조 스펙트럼이기에 고체배지에서 유래된 MSI 2.0 데이터베이스와는 차이가 있다. 따라서 *Trichophyton* 종에서 *T. soudanense*를 동정하는 것이 신중하다.

검사실에서 사용되는 배양 배지, 배양 시간, MS 분석장비, 참조 스펙트럼 데이터베이스의 품질에 크게 영향을 받는다. 배양에서도 계대배양보다 1차배양 후 분리된 균주 사용도 고려해야 할 것이다. 또한, 액체 배양 기반의 데이터베이스를 사용해도 동정 값은 크게 변화가 없다. 환자에게 신속하고 정확한 치료를 위해 검사 시간 단축이 중요하고 손톱, 모발 및 피부 샘플의 직접 접종을 위해 개발된 Conidia Laboratory의 ID-fungi plates plus 배지(IDFPC, 사이클로헥시미드를 함유)를 권장하지만 좀

더 높은 동정률을 보이기 위해서는 IDFPC에서 성장한 참조 균주를 기반으로 한 데이터베이스가 필요할 것으로 보인다. 따라서 액체 MALDI-TOF MS 진행과정은 피부사상균의 분리에 빠르고 정확하게 식별하기 위한 표준 프로토콜에 대한 부적합한 대안이며 하위 배양 단계의 필요성이 강조된다. 또한, Bruker 3.0 사상균 데이터베이스나 MRI 2.0 데이터베이스를 사용해도 처리 시간이나 RCI는 개선되지 않아 MALDI-TOF MS를 수행할 때 참조 데이터베이스가 중요함을 보인다[25].

6. MALDI-TOF MS를 사용한 항균제 감수성 검사

항균제 감수성은 동정과 동일한 전략으로 진행되지 못하고 특정 종의 고유한 항균 저항 특성(또는 국소 항생물질을 기반으로 동정된 종의 일반적인 감수성)에 의한 신속한 동정은 치료의 지침이 될 수 있다. 일부 내성 관련 인자(예: β -lactamase)는 단백질이고 MALDI-TOF MS에 의해 단백질이 검출되기 때문에 항균제 내성 관련 단백질을 직접 검출될 것이라고 직관할 수 있지만 이는 어려운 일이다. 예를 들어, β -lactamase는 활성이 높지만 낮은 농도로 발현되어 분자량이 다른 세균 단백질과 유사하여 비슷한 질량을 갖는 수백 가지 유형의 β -lactamase가 있다. MALDI-TOF MS는 균주 분류에 대한 가능하지만 일부 균주는 특정 항균제에 내성을 갖기 때문에 균 분류와 항균제 내성의 연관성에는 차이가 있다. MALDI-TOF MS는 β -lactamase에 의한 베타락탐계 항균제를 측정하기에 분석 일부가 적용된다. 이때 측정물질은 단백질이 아니라 항균 화합물과 화학적으로 변형된 반응물이며 배양된 집락의 항균제 분해와 관련된 저항성 기전에만 국한된다.

또 다른 측정방법은 항균제와 동위원소가 표지된 아미노산이 있는 상태에서 짧은 시간(예: 3시간 이하) 동안 배양하여 항균제에 내성이 있는 경우, 동위원소로 표지된 아미노산을 포함한 단백질 질량을 증가시켜 해당 피크의 질량을 측정하는 방식이다. MBT-항균제 감수성 검사 신속 분석(MBT-antibiotic susceptibility test rapid assay, MBT-ASTRA)은 항균제에 노출되거나 노출되지 않은 세균의 스펙트럼의 곡선 아래 면적(area under the curves, AUC)을 계산하고 비교하는 MALDI-TOF MS 소프트웨어 도구를 기반으로 항균제 내성을 검출하는 신속한 방법이다. 측정된 세균의 AUC를 비교하여 세균의 성장을 평가한다. 미생물 균주가 감수성인 경우, 항균제가 포함된 세균 현탁액의 AUC는 항균제가 포함되지 않은 것과 비교하여 감소되는 반면, 내성 균주의 경우 항균제가 있거나 없는 AUC는 비슷하게 된다[27].

지난 20년 동안 임상미생물학 검사실은 차세대 염기서열 분석(NGS) 및 MALDI-TOF MS와 같은 새로운 기술의 도입으로

인해 급격한 변화를 겪고 있다. 이에 항균제 내성 미생물의 출현은 사망률 증가와 의료 직간접 비용 증가의 원인이 되는 현재 의학의 세계적인 위협을 나타낸다. 또한, OXA-48 카바페넴분해효소(carbapenemase)를 생성하는 장내세균과 같은 항생제 내성 미생물의 동정은 임상미생물학 검사실의 큰 변화를 가져왔다. 특히 항균제 내성 검출 및 감시에 사용되는 이러한 기술의 적용과 미생물 관련 감염 조사를 위한 MALDI-TOF MS와 차세대 염기서열분석법의 결합 접근법이 대두되고 있다[28]. BD Phoenix M50™ 시스템(BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)은 임상 미생물 검사실의 항균제 감수성 검사와 그람 음성 임상 분리주에서 카바페넴 및 콜리스틴 내성 검출에 대해 신뢰할 수 있는 결과를 보여주고 있다[29].

7. MALDI-TOF MS를 통한 암 진단 활용도구

암세포와 주변 미세환경은 암이 발생하는 동안 정상 세포와는 다른 형태와 다양한 단백질의 농도로 펩타이드를 생성한다. 이러한 환경에서 조직 내 단백질의 비정상적인 분포는 영상 기반 질량 분석법으로 분석할 수 있다. 질량 분석법(MS)은 암 단백질체학에서 중요한 검출 방법이며 MALDI-TOF MS는 염분과 불순물에 대한 높은 내성과 감도로 인해 다른 MS 기술보다 우수하다[30]. 이 방법에 지연된 추출 기술과 반사성이 도입된 후, 분해능이 크게 증가하여 ~2 kDa의 소분자 펩타이드를 검출하는데 10 ppm 이하에 도달했다[31]. MALDI-TOF peptide mass fingerprinting은 단백질체를 감별하기 위해 가장 빠르고 저렴한 방법이며 암 관련 생체액의 진단 및 예후에 대한 정보를 제공한다[32]. 주요 장점으로 분석 속도, 낮은 시료량 사용, 높은 감도, 사용 용이성, 저렴한 소모품 및 넓은 질량 범위 적용 등이 있으며, 많은 시료 수의 스크리닝에 적용할 수 있다. 이 방법은 암 발생과 관련된 새로운 대사산물, 펩타이드, 단백질 및 핵산을 동정하는 강력한 도구로 활용된다.

8. 환경미생물의 동정을 위한 MALDI-TOF MS의 활용

환경에 존재하는 미생물은 작은 크기의 살아있는 유기체로 물, 공기, 토양 등 모든 환경 기질에 존재한다. 이들은 항상 다양한 생물학적 네트워크를 통해 서로 상호 작용하고 제한된 영양분을 위해 살아간다[33]. 다양한 환경 시료(물, 토양, 식물 등), 해양 해면[34], 바이오에어로졸 입자[35], 식품 및 표면을 모니터링하는 것은 미생물 구성과 다양성을 조사하는 것은 병원성 세균의 확산을 모니터링하거나 오염의 원인을 추적하는 측면에서 중요하다. 이런 측면에서 MALDI-TOF MS는 모니터링, 세균의 군집 구성 및 다양성에 대한 동정을 통해 유용한 정보를 제

공하는 데 활용된다[36]. 또한, 최근 *Shewanella haliotis*를 MALDI-TOF Biotyper를 기반으로 동정하는 것은 환경측면에서 내분비계 교란물질인 bisphenol A의 분해활성을 예측하는데 활용되고 있다[37].

9. 식품미생물에서의 활용

음식은 식중독과 같은 다양한 질병 발생의 원인이 될 수 있지만 효소와 유기산 등의 발효성 기능성식품들의 발전으로 식품 미생물학은 많은 주목을 받았다. MALDI-TOF MS 기술은 다양한 식인성 병원성 박테리아, 유산균 및 기타 발효 박테리아를 식별하고 구별함으로써 식품 미생물학 분야에서 역할을 수행한다. *Brochothrix thermosphata*의 다양성에 있어서 고기와 해산물의 부패와 관련된 주요 박테리아 중 하나이다. MALDI-TOF MS 및 기타 기술을 특징으로 한다[38]. 프로바이오틱스는 건강을 개선하고 건강에 긍정적인 영향을 미치며 다양한 질병을 치료하기 위한 보충제로 사용된다. 프로바이오틱스 특성을 갖고 있는 것으로 이미 알려진 다양한 식품에서 새로운 프로바이오틱스 박테리아를 분리하기 위한 연구가 수행되었다[39].

*Bacillus cereus*종에 속하는 일부 균주에 의해 생성된 열에 안정적인 순환형 통시펩티드 구토형독소(cereulide)에 의한 식품(예: 쌀, 파스타, 허브, 우유 및 유제품)의 오염은 인간에게 구토성 식중독을 유발한다[40]. MALDI-TOF 기술과 PCR 방법 및 생물검정(HEp-2 세포독성검사)을 사용하여 구토성 및 비감염성 세균 균주를 확인했다[41]. 또한, MALDI-TOF 기술이 히스타민을 생산하는 장내 세균과 해양 세균을 신속하게 식별하는데 적합하다는 사실도 확인했다. *Staphylococcus xylosum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Lactobacillus* sp.와 같이 히스티딘 탈탄산효소 활동을 수행할 수 있는 박테리아가 포함된 생선 또는 해산물, 치즈, 와인 및 기타 식품 섭취시에 히스타민 중독을 유발한다. 따라서 MALDI-TOF MS는 맥주, 와인, 사과주, 꿀, 파스타, 쌀, 허브, 우유 및 유제품, 돼지고기 및 생선 또는 다른 해산물 같은 다양한 유형의 식품에서 미생물을 식별하고 대사산물을 검출하는데 성공적으로 사용될 수 있다. 더 많은 미생물 종과 계통으로 기존 데이터베이스를 확장하면 향후 식품에 존재하는 미생물을 포함하여 훨씬 더 광범위한 미생물 그룹을 식별할 수 있다.

김치의 발효 과정에서는 미생물 군집 내에서 복잡한 상호 작용이 일어난다. 대량 신속처리 염기서열분석법(high-throughput sequencing)은 김치 발효에 중요한 역할을 하는 *Lactilactobacillus Saulo*, *L. curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum* 및 *Weissella cibaria*를 속 수준에서만 식별할 수

있었기 때문에 정확하게 인식하지 못했다. 반대로, MALDI-TOF MS 분석은 종 수준에서 분리주를 식별할 수 있고, 배양의 존적 방법은 생존 가능한 세포 공동체에서 미세한 종을 식별할 수 있다. 배양의 존적 방법과 배양 비존적 방법은 발효 감치의 미생물 생태에 대한 보다 포괄적인 시각을 제공함으로써 보완적인 정보를 제공했다[42].

10. MALDI-TOF MS의 제한점

MALDI-TOF MS가 모든 미생물 종을 정확하게 식별하는 능력은 향후 중요한 주제이다. MALDI-TOF MS는 GenBank와 같이 공개적으로 사용 가능한 염기서열 데이터베이스와 달리 MALDI-TOF MS 데이터베이스는 독점적으로만 활용된다는 점이 제한점이 될 수 있다. 또한, 일부 미생물 종에 대한 낮은 동정 비율은 종 또는 계통의 질량 스펙트럼 항목을 추가하여 개선될 수 있지만(종 내 변동성 요인) 반복적인 데이터 축적이 필요하다. 또한, 생물학적 표현형에 의한 감별이 어려운 집락이 작거나 점액성인 경우는 동정에 어려움을 갖는다. 작은 집락은 MALDI-TOF MS보다 16S rRNA 유전자 서열 분석을 사용하여 더 빠르게 식별하여야 할 것이며 특정 종의 경우 속 또는 종별 cut off 값이 적절한 기준이 요구된다. 검사를 수행하는 과정에서 발생하는 잘못된 표적 플레이트 위치에 집락 집중, 플레이트에 집중되는 집락의 부적절한 양, 잘 정제되지 못한 집락으로 검사 수행, 지점 간 번짐, 표적 플레이트 청소 실패 또는 검사정보 시스템에서 오류 데이터 입력, 장비의 오류, 균집이 잘 분리되지 않으면 둘 이상의 유기체를 나타낼 수 있는 점 등이 발생할 수 있다. 또한, MALDI-TOF MS의 매트릭스 및 용매 구성, 준비 및 전처리 방법, 교육 및 역량, 배양 조건(배지, 집락 등) 등의 가변성에 대한 원인이 있다. MALDI-TOF MS에 대한 CLSI 가이드라인(M58)에는 검사실 표준화에 도입되지 않았지만, 이 기술의 사용을 통해 임상적으로 동정을 적용하고자 하려는 움직임과 임상사들의 적용 및 부적절한 환자 치료 가능성에 대한 부분에 정립이 요구된다. 또한, 잠재적으로 임상적으로 중요한 결과를 무시하거나 임상적으로 중요하지 않은 결과를 과도하게 치료하게 될 수 있는 측면이 있다. 동시에 MALDI-TOF MS의 사용의 편리성으로 인해 검사자들은 집락을 시각적으로 동정하는 기술을 잃게 될 수 있다.

결론

본 논문에서는 임상 미생물학에서의 MALDI-TOF 질량분석기의 장점과 세균의 ID에서 시료 준비를 위해 개발된 다양한 기술 혁신에 대해 알아보았고 MS의 응용은 MALDI-TOF 질량분

석기에만 국한된 것이 아니며, LC-MS/MS 또는 MALDI-TOF 질량분석기가 다른 기술과 결합되어 적용되었다. 이 분야의 발전으로 MS 기술은 언젠가 미생물 유형 연구와 내성균 검출에 지금보다 더 일반적으로 사용될 수 있을 것이다. 현재 임상 미생물의 동정에서 MS 방법이 사용되고 있지만, 임상 검체(객담 등)의 정도 관리, 그람염색 결과 및 집락 성장 관찰과 같은 전통적인 세균학적 방법이 중요하게 남아 있다. 또한, MS를 포함한 분석 방법들이 어떻게 진행되는지에 관계없이, 이러한 방법들은 전통적인 방법들과 병행하여 숙련된 임상 미생물 검사실에서 전문가들에 의해 평가되고 실행되어야 한다. 이러한 점을 고려할 때, 새로운 임상미생물 검사실의 업무 적용 개선과 함께 우수한 전문인력들의 자원의 개발과 교육 및 훈련이 필수적일 것이다. 또한 참고 스펙트럼의 명확성을 위해 데이터베이스의 스펙트럼에 대한 경험치를 최적화되어야 하고 고도로 선별되고 개방적이며 강력한 데이터베이스의 유용성을 통해 다양한 분야에서의 MALDI-TOF 질량분석기를 광범위하게 적용될 것을 기대한다.

요약

검사 결과의 적시성과 정확성은 임상사가 특히 생명을 위협하는 감염이나 시력과 같은 중요한 장기 및 기능이 위험에 처한 경우, 효과적이고 표적화된 항균 요법을 결정하고 즉시 시행하는데 중요한 요소이다. 가능한 한 최단 시간 내에 정확하고 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위해 matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 질량분석기 기반 분석을 개선하고 최적화하기 위한 추가 연구 노력이 이루어져야 할 것이다. MALDI-TOF 질량분석기 기반 세균 식별은 주로 임상 시료에서 병원체를 분리 및 정제하는 기술, 스펙트럼 라이브러리 확장 및 소프트웨어의 업그레이드에 중점을 둔다. 기술이 발전함에 따라 많은 MALDI-TOF 기반 미생물 동정 데이터베이스 및 시스템이 허가되어 임상에 사용되고 있다. 그럼에도 불구하고, 포괄적인 임상미생물의 특성화를 위해서는 MALDI-TOF 질량분석기 기반 항균제 내성 분석을 개발하는 것이 여전히 필요하다. 특정 적용 범주, 일반적인 분석물질, 주요 수행방법, 한계 및 해결점을 포함하여 임상 연구에서 MALDI-TOF의 적용이 중요하다. 임상 미생물 검사실에서 업무 활용을 위해 임상병리사들의 교육 및 훈련을 통한 전문성 확보가 필수적이며, 데이터베이스 구축과 경험을 극대화하여야 할 것이다. 향후 더 강력한 데이터베이스의 활용으로 다양한 분야에서 MALDI-TOF 질량분석기가 적용될 것으로 보인다.

Funding: This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2023.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Kwon PS, Professor.

Author Contributions: The article is prepared by a single author.

Ethics approval

This article does not require IRB approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Pil Seung KWON <https://orcid.org/0000-0002-9808-4200>

REFERENCES

1. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*. 2011; 44:104-109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>
2. Hodille E, Prudhomme C, Dumitrescu O, Benito Y, Dauwalder O, Lina G. Rapid, easy, and reliable identification of *Nocardia* sp. by MALDI-TOF Mass Spectrometry, VITEK[®]-MS IVD V3.2 Database, using direct deposit. *Int J Mol Sci*. 2023;24:5469. <https://doi.org/10.3390/ijms24065469>
3. Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77: 4136-4146. <https://doi.org/10.1128/aem.02418-10>
4. Popović NT, Kazazić SP, Strunjak-Perović I, Čož-Rakovac R. Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environ Res*. 2017;152:7-16. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.020>
5. Carbonnelle E, Nassif X. [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. *Med Sci (Paris)*. 2011;27:882-888. French. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710017>
6. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8:1081-1088. <https://doi.org/10.3855/jidc.3623>
7. Benagli C, Demarta A, Caminada A, Ziegler D, Petrini O, Tonolla M. A rapid MALDI-TOF MS identification database at genus-species level for clinical and environmental *Aeromonas* strains. *PLoS One*. 2012;7:e48441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048441>
8. Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2182-2194. <https://doi.org/10.1128/jcm.00492-13>
9. Dichtl K, Klugherz I, Greimel H, Luxner J, Köberl J, Friedl S, et al. A head-to-head comparison of three MALDI-TOF mass spectrometry systems with 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 2023;61:e0191322. <https://doi.org/10.1128/jcm.01913-22>
10. Peng D, Zhu X, Liu Y, Li X, Chen G, Li Y, et al. Evaluation of formic acid sandwich (FA-sandwich): a pretreatment method for filamentous fungi, for the identification of clinically relevant filamentous fungi by two MALDI-TOF MS systems. *Med Mycol*. 2022;60:myac018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myac018>
11. Idelevich EA, Nedow B, Vollmer M, Becker K. Evaluation of a novel benchtop tool for acceleration of sample preparation for MALDI-TOF mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2023;61:e0021223. <https://doi.org/10.1128/jcm.00212-23>
12. Barcelos MM, Martins L, Grenfell RC, Juliano L, Anderson KL, Dos Santos MV, et al. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. *Braz J Microbiol*. 2019;50:849-857. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>
13. Jeraldine VM, Wim L, Ellen VE. A comparative study for optimization of MALDI-TOF MS identification of filamentous fungi. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2023;42:1153-1161. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04652-3>
14. Bacanelli G, Araujo FR, Verbisck NV. Improved MALDI-TOF MS identification of *Mycobacterium tuberculosis* by use of an enhanced cell disruption protocol. *Microorganisms*. 2023;11:1692. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071692>
15. McTaggart LR, Chen Y, Poopalarajah R, Kus JV. Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-ToF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;92:270-274. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.016>
16. Yang H, Smith RD, Sumner KP, Goodlett DR, Johnson JK, Ernst RK. A matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry direct-from-urine-specimen diagnostic for gram-negative pathogens. *Microbiol Spectr*. 2022;10:e0373022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03730-22>
17. Messina A, Palmigiano A, Bua RO, Romeo DA, Barone R, Sturiale L, et al. CSF N-glycoproteomics using MALDI MS techniques in neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol*. 2019;2044:255-272. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9706-0_16
18. Lin HH, Tseng KH, Tien N, Lin YT, Yu J, Hsueh PR, et al. Evaluation of the Rapid Sepsityper protocol and specific MBT-Sepsityper module for the identification of bacteremia and fungemia using Bruker Biotyper MALDI-TOF MS. *J Microbiol Immunol Infect*. 2022;55(6 Pt 2):1330-1333. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.07.005>
19. Perše G, Samoščanec I, Bošnjak Z, Budimir A, Kuliš T, Mareković I. Sepsityper[®] kit versus in-house method in rapid identification of bacteria from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *Life (Basel)*. 2022;12:1744. <https://doi.org/10.3390/life12111744>
20. Di Gaudio F, Indelicato S, Indelicato S, Tricoli MR, Stampone G, Bongiorno D. Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. *J Microbiol Methods*. 2018;155:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.015>
21. Kayin M, Mert B, Aydemir S, Özenci V. Comparison of rapid BACpro[®] II, Sepsityper[®] kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by

- MALDI-TOF MS with and without Sepsityper[®] module analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38:2133-2143. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03654-4>
22. Rindi L, Puglisi V, Franconi I, Fais R, Lupetti A. Rapid and accurate identification of nontuberculous mycobacteria directly from positive primary MGIT cultures by MALDI-TOF MS. *Microorganisms.* 2022;10:1447. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071447>
 23. Markanović M, Makek MJ, Glodić G, Kuliš T, Mareković I. Evaluation and clinical impact of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v6.0 for identification of nontuberculous mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2023;58:e4915. <https://doi.org/10.1002/jms.4915>
 24. Teke L, Barış A, Bayraktar B. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for non-albicans *Candida* and uncommon yeast isolates. *J Microbiol Methods.* 2021;185:106232. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106232>
 25. Sacheli R, Henri AS, Seidel L, Ernst M, Darfouf R, Adjetej C, et al. Evaluation of the new Id-Fungi plates from Conidia for MALDI-TOF MS identification of filamentous fungi and comparison with conventional methods as identification tool for dermatophytes from nails, hair and skin samples. *Mycoses.* 2020;63:1115-1127. <https://doi.org/10.1111/myc.13156>
 26. L'Ollivier C, Ranque S. MALDI-TOF-based dermatophyte identification. *Mycopathologia.* 2017;182:183-192. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0080-x>
 27. Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A. Detection of antibiotic-resistance by MALDI-TOF mass spectrometry: an expanding area. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:572909. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572909>
 28. Hrabak J, Bitar I, Papagiannitsis CC. Combination of mass spectrometry and DNA sequencing for detection of antibiotic resistance in diagnostic laboratories. *Folia Microbiol (Praha).* 2020;65:233-243. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00757-5>
 29. Hong JS, Kim D, Kang DY, Park BY, Yang S, Yoon EJ, et al. Evaluation of the BD Phoenix M50 automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing with clinical isolates in Korea. *Microb Drug Resist.* 2019;25:1142-1148. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0370>
 30. Cho A, Normile D. Nobel prize in chemistry. Mastering macromolecules. *Science.* 2002;298:527-528. <https://doi.org/10.1126/science.298.5593.527b>
 31. Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, Chaparro CA, Erdjument-Bromage H, Olshen AB, et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest.* 2006;116:271-284. <https://doi.org/10.1172/jci26022>
 32. Rodrigo MA, Zitka O, Krizkova S, Moullick A, Adam V, Kizek R. MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;95:245-255. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.007>
 33. Braga RM, Dourado MN, Araújo WL. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Braz J Microbiol.* 2016;47(Suppl 1):86-98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
 34. Dieckmann R, Graeber I, Kaesler I, Szewzyk U, von Döhren H. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67:539-548. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1812-2>
 35. Kim JK, Jackson SN, Murray KK. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of collected bioaerosol particles. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19:1725-1729. <https://doi.org/10.1002/rcm.1982>
 36. Ashfaq MY, Da'na DA, Al-Ghouthi MA. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: a review. *J Environ Manage.* 2022;305:114359. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114359>
 37. de Santana FS, Gracioso LH, Karolski B, Dos Passos Galluzzi Baltazar M, Mendes MA, do Nascimento CAO, et al. Isolation of bisphenol A-tolerating/degrading *Shewanella haliotis* strain MH137742 from an estuarine environment. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019;189:103-115. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02989-0>
 38. Illikoud N, Rossero A, Chauvet R, Courcoux P, Pilet MF, Charrier T, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *Food Microbiol.* 2019;81:22-31. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.015>
 39. Mohar Lorbeg P, Golob M, Kramer M, Treven P, Bogovič Matijašić B. Evaluation of dietary supplements containing viable bacteria by cultivation/MALDI-TOF mass spectrometry and PCR identification. *Front Microbiol.* 2021;12:700138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700138>
 40. Ulrich S, Gottschalk C, Dietrich R, Märtlbauer E, Gareis M. Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 2019;82:75-81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.012>
 41. Fernández-No IC, Böhme K, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Cañas B, Calo-Mata P. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis.* 2010;31:1116-1127. <https://doi.org/10.1002/elps.200900591>
 42. Kim E, Cho EJ, Yang SM, Kim MJ, Kim HY. Novel approaches for the identification of microbial communities in kimchi: MALDI-TOF MS analysis and high-throughput sequencing. *Food Microbiol.* 2021;94:103641. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103641>