

Original Article

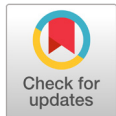
새로운 말디토프 질량 분석 장비인 ASTA MicroIDSys의 임상 균주를 이용한 균종 동정 성능 평가

유창승^{1*}, 이은정^{2*}, 김도균¹, 정석훈¹¹연세대학교 의과대학 진단검사의학교실 및 세균내성연구소, ²상지대학교 임상병리학과

Evaluation of the Performance of ASTA MicroIDSys, a Novel Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System, in Identification of Bacterial Clinical Isolates

Changseung Liu^{1*}, Eunjung Lee^{2*}, Dokyun Kim¹, Seok Hoon Jeong¹¹Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, ²Department of Clinical Pathology, Sangji University College of Science, Wonju, Korea

*These authors contributed equally to this work.

**OPEN ACCESS**pISSN : 2288-0585
eISSN : 2288-6850Ann Clin Microbiol 2020 September, 23(3): 135-148
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.3.3>**Corresponding author****Dokyun Kim**E-mail: kyunsky@yuhs.ac

Tel: +82-2-2019-2776

Fax: +82-2-2057-8926

Received: January 31, 2020**Revised:** April 10, 2020**Accepted:** April 10, 2020

© 2020 Korean Society of Clinical Microbiology.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Background: We evaluated the performance of ASTA MicroIDSys (ASTA, Korea) and Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) systems in the identification of bacterial isolates from clinical microbiology laboratory specimens during the study period. In addition, species for which the identification accuracy using MALDI-TOF MS systems was previously reported to be poor were also identified by comparing the MS results with those obtained using molecular identification.

Methods: A total of 889 non-duplicated clinical isolates were included in this study. The results of ASTA MicroIDSys were compared with those of Bruker Biotyper; 16S rRNA sequencing was performed for the species for which results obtained using the two systems did not match. The sequences of *rpoB*, *hisA*, and/or *recA* for the clinical isolates of *Acinetobacter* species, *Klebsiella* species, and *Burkholderia cepacia* complex were analyzed and used as reference identifications.

Results: The concordance rates for bacterial identification using ASTA MicroIDSys and Bruker Biotyper were 100% at the genus level and 98.3% at the species level for isolates belonging to the order *Enterobacterales*. Similarly, the concordance rates at the genus and species levels were 98.8% and 91.0% for glucose non-fermenting bacilli, 100% and 100% for gram-positive cocci, and 98.9% and 98.9% for other isolates, respectively. ASTA MicroIDSys was expected to correctly identify 97.9% of the 108,251 isolates identified in our clinical microbiology laboratory over the past 5 years.

Conclusion: ASTA MicroIDSys showed excellent performance in bacterial identification for most of the clinically relevant species. Further extension of the database could improve the identification accuracy of ASTA MicroIDSys.

Keywords: Bacterial identification, Bruker Biotyper, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, MicroIDSys

INTRODUCTION

정확하고 신속한 원인균의 동정은 감염증의 진단과 치료에 필수적이며 환자의 생존과 예후에 영향을 미치는 중요한 인자이다[1]. 임상미생물 검사실에서 통상적으로 시행되는 균종 동정법은 그람 염색성과 형태와 생화학적 반응을 확인하는 시험법이다. 이러한 균종 동정 시험법은 시간이 오래 걸리고, 검사자의 높은 전문성이 요구된다. 또한, 노령 환자와 면역억제환자의 증가로 감염병에서 분리되는 균종이 다양해져 정확한 균종 동정이 더욱 어려워지고 있다[2-4]. 전통적인 방법을 통해 정확한 균종 동정에 실패한 경우 분자진단검사를 시행할 수 있으나[5], 검사 과정에 노력과 비용이 많이 들며, 균종간 염기서열의 차이가 적은 경우 균종별 표적유전자로 추가적인 분석을 해야하는 경우가 있어 임상미생물 검사실에서 일상적으로 시행하기에는 적합하지 않다 [6,7].

말디토프 질량분석기(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)는 이온화된 검체가 진공관을 통과하여 검출기에 도달하는 시간을 측정하여 구성 단백질의 질량을 분석하는 방법이다[8]. MALDI-TOF MS는 세균의 단백질 발현에 대한 스펙트럼 프로파일을 만들 수 있으며, 세균의 단백질 정보를 바탕으로 한 데이터베이스와 비교하여 균종을 동정한다. 기존 연구에 의하면 전통적인 생화학적 자동화 장비가 균종 동정에 걸리는 시간은 약 300-480분이었던 반면에 MALDI-TOF MS는 6분 이내에 균종 동정 결과를 보고할 수 있었고, 비용도 22-32%에 불과하였다[9,10]. 또한 *Streptococcus* 균속과 *Enterobacter* 균속, *Burkholderia cepacia* complex (BCC)를 비롯한 일부 포도당 비발효 그람음성 막대균들은 세균의 단백질 정보의 부족, 또는 균종간 단백질 성분의 유사성으로 정확한 균종 동정이 어렵다고 하였으나[11-14], 최근에는 장비의 해상도와 데이터베이스가 개선되어 대부분의 균속에 대해 균종 수준까지의 정확한 동정이 가능하다고 보고되었다[15]. 따라서, MALDI-TOF MS는 생화학적 성상을 기반으로 하는 전통적 동정법과 일치율이 높고, 술식이 간단하고 신속한 균종 동정이 가능하여 임상미생물 검사실에서 유용하게 사용될 것으로 기대되고 있다[16].

ASTA MicroIDSys (ASTA, Suwon, Korea)는 최근에 새로 개발된 미생물 균종 동정용 MALDI-TOF MS장비이다. 2,000에서 20,000 m/z의 분석 범위를 갖는 선형 MALDI-TOF MS 장비와 2,537종의 균종 및 8,600개의 스펙트럼 정보가 포함된 데이터베이스(버전 1.26.02 기준), 정확도를 높이기 위해 균종의 피크 수를 자동으로 선택하는 알고리즘이 적용된 분석 소프트웨어가 일체형으로 구성되어 있고, 다양한 규격의 플레이트를 사용하여 한번에 96에서 384개의 시료를 빠르게 분석할 수 있는 것으로 알려져 있다. 기존에 임상미생물 검사실에서 가장 널리 사용되는 Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)와 비교하였을 때, 산소성 세균과 진균 및 무산소성 세균에 대해서도 높은 동정 일치율이 보고된 바 있다[17-19]. 본 연구에서는 연구 기간 동안 임

상미생물 검사실에서 실제 분리되는 세균을 대상으로 ASTA MicroIDSys와 Bruker Biotyper의 균종 동정 정확도를 평가하였다. 또한, MALDI-TOF MS의 균종 동정 결과가 부정확한 것으로 알려진 균속에 대한 균종 동정 정확도를 평가하였다. 마지막으로, 일반적인 검사실 환경에서 ASTA MicroIDSys의 유용성과 한계를 평가하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

대상 균주

2019년 7월부터 9월까지 국내의 한 대학병원에서 분리된 임상분리주 전수를 연구에 포함하였다. 해당 균주는 *Escherichia coli* 159주와 *Klebsiella* 균속 136주, *Staphylococcus* 균속 130주, *Acinetobacter* 균속 119주, *Enterobacter* 균속 84주, *Enterococcus* 균속 69주, *Candida* 균속 44주를 포함한 889주였으며, 각 균주를 네 그룹(장내세균(*Enterobacteriales*), 포도당 비발효 그람음성 막대균, 그람양성 알균, 기타)으로 분류하였다.

MALDI-TOF MS 균종 동정

순수 배양된 세균 집락을 이용하여 ASTA MicroIDSys와 Bruker Biotyper를 통해 균종을 동정하였으며, 직접 도말법으로 동일하게 시험하였다. 즉, 혈액 한천 배지에 18시간 배양한 세균 집락을 나무 막대를 이용하여 metal plate에 직접 도말하고 말린 후, 70% formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1.5 µL를 점적하여 상온 건조시켰다. 매트릭스 용액(50% acetonitrile, 2.5% trifluoroacetic acid에 포화된 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) 1.5 µL를 떨어뜨리고 말린 후 장비에 장착하여 검사를 시행하였다. ASTA MicroIDSys는 데이터베이스 버전 1.26.02를 이용하여 분석하였고, Bruker Biotyper는 Biotyper 3 소프트웨어와 라이브러리 버전 6903을 사용하였다. MALDI-TOF MS의 미생물 동정 결과는 장비에 수록된 데이터베이스의 표준 질량스펙트럼과 시료인 세균 단백질의 질량스펙트럼을 비교한 값인 동정 스코어(ID score)로서 표현된다. ASTA MicroIDSys의 경우 동정 스코어 140 이상은 동정 결과의 신뢰도가 높음을, 130 미만은 동정 결과의 신뢰도가 낮음을 의미하며, 그 사이의 스코어는 균종 및 균속 동정 결과에 대한 확인이 필요함을 의미한다. 마찬가지로 Bruker Biotyper에서는 동정 스코어가 2.30 이상일 경우 확실한 균종 동정 결과, 1.70 미만일 경우 신뢰할 수 없는 동정 결과로 정의되어있다. 본 연구에서 균종 동정 결과는 동일한 조건 하에서의 분석 결과를 비교하기 위해 두 장비 모두 최초 검사 결과를 보고하였다. 따라서 해당 장비가 보고하는 균종 결과에 대해 동정 스코어를 확인하여 ASTA MicroIDSys 기준 130이상, Bruker Biotyper 1.70 이상인 경우에는 장비의 결과를 그대로 보고하였고, 동정 스코어가 이보다 낮은 경우에도 재검을 시행하지는 않았다.

분자진단검사를 통한 균종 동정

ASTA MicroIDSys의 결과와 Bruker Biotyper의 결과가 일치하지 않은 균주 및 임상적으로 흔하지 않은 균종에 대하여 16S rRNA 염기서열 분석을 시행하여 균종을 확정하였다. 또한, 정확한 균종 확인을 위해, *Acinetobacter* 균속 및 *Klebsiella* 균속은 *ipoB* 유전자, BCC 균주는 *hisA*와 *recA* 유

전자에 대한 염기서열 분석을 추가적으로 시행하였다. 염기서열 분석 대상 균주의 DNA는 Cica geneus DNA extraction reagent ST (Kanto chemical, Tokyo, Japan)를 사용하여 추출하였다. 16S rRNA는 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'), *tpoB* 유전자는 Ac696F(5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3')와 Ac1093R(5'-CMACACCCYTTGTTMCRTGA-3'), *hisA* 유전자는 A-442F(5'-AGGACCCGGCGGCGAT-3')와 A-442R(5'-TGCAGCATCCCCTCGCG-3'), *recA*는 BCRI(5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3')과 BCR2(5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3')를 시발체(primer)로 사용하였다[20-22]. 중합효소연쇄반응(PCR)은 C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 수행하였으며, 95°C로 2분동안 DNA를 변성시키고, 95°C 30초, 67°C 45초, 72°C 1분 1회로 하여 30회 시발체와 결합시킨 후, 72°C에서 10분간 증폭시켰다. 합성된 유전자의 염기서열은 ABI 3730xL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 해독하였으며, 분석된 염기서열은 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>)의 type strain database 및 Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)과 대조하여 동정 결과를 확인하였다[23].

결과 분석

대상 균주에 대한 비교의 기준이 되는 균종명(reference identification)은 두 장비의 결과가 일치한 경우 그 결과를 기준 균종명으로 하였고, 두 장비의 결과가 불일치할 경우 분자진단검사를 통한 균종 동정을 시행하여 기준 균종명을 구하였다. 본 연구에서는 모든 시험 대상 균주에 대해 다음과 같은 4가지로 결과를 분류 하였다: (1) 균종 일치 (correctly identified - species level), (2) 균속 일치 (correctly identified - genus level), (3) 균속명까지 불일치한 경우: misidentification, (4) 적절한 동정 결과를 보고하지 못한 경우 (ASTA MicroIDSys 균종 동정 점수<130, Bruker Biotyper 균종 동정 점수<1.70): invalid identification. 또한, 균종명이 해당 장비의 데이터베이스에 없는 경우 별도 표시하여 데이터베이스의 충실성을 비교하였다. 마지막으로, 실제 임상미생물 검사실에서 지난 5년간 Bruker Biotyper를 통해 보고된 균종 동정 결과에 ASTA MicroIDSys 데이터베이스의 균종 포함 여부 및 균종별 일치율을 대입하였다. 이를 통해 해당 기간동안 ASTA MicroIDSys를 이용하여 동일한 검사를 시행하였을 경우 동일한 균종 동정 결과가 예상되는 균주의 비율을 분석하였다.

RESULTS

장내세균 균주에서의 ASTA MicroIDSys의 균종 동정 정확도

장내세균은 총 418주였으며, 균속 및 균종 일치율은 ASTA MicroIDSys에서 각각 100% (418/418), 98.3% (411/418), Bruker Biotyper에서는 각각 99.5% (416/418), 98.6% (412/418)였다(Table 1). ASTA MicroIDSys는 misidentification 및 invalid identification은 관찰되지 않았으며, *Klebsiella variicola* 2주와 *Enterobacter asburiae* 2주, *Klebsiella aerogenes* 1주, *Enterobacter hormaechei* 1주, *Raoultella planticola* 1주에서 균속 일치를 보였다. 이 중 *K. aerogenes* 1주를 제외한 나머지 6주는 데이터베이스에 해당 균종 스펙트럼이 존재하지 않았다. Bruker Biotyper 역시 misidentification은 없었으나, *Klebsiella pneumoniae* 1주와 *Proteus mirabilis* 1주에서 invalid identification을 보여주었으며, *K. variicola* 1주, *K. aerogenes* 1주, *E. hormaechei* 1주 및 *R. planticola* 1주에서 균속 일치 결과를 보여주었다.

Table 1. Comparison of bacterial identification between ASTA MicroIDSys and Bruker Biotyper for 418 *Enterobacteriales* isolates

Reference identification (number of isolates)	ASTA MicroIDSys, number of isolates				Bruker Biotyper, number of isolates			
	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID
	Genus level	Species level			Genus level	Species level		
<i>Escherichia</i>								
<i>E. coli</i> (159)	159	159			159	159		
<i>E. hermannii</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Klebsiella</i>								
<i>K. pneumonia</i> (122)	122	122			121	121		1
<i>K. oxytoca</i> (12)	12	12			12	12		
<i>K. variicola</i> (2)	2	0*			2	1		
<i>Enterobacter</i>								
<i>E. cloacae</i> (45)	45	45			45	45		
<i>E. aerogenes</i> (36)	36	35			36	35		
<i>E. asburiae</i> (2)	2	0†			2	2		
<i>E. hormaechei</i> (1)	1	0*			1	0		
<i>Citrobacter</i>								
<i>C. freundii</i> (7)	7	7			7	7		
<i>C. koseri</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Raoultella</i>								
<i>R. ornithinolytica</i> (8)	8	8			8	8		
<i>R. planticola</i> (1)	1	0*			1	0		
<i>Proteus</i>								
<i>P. mirabilis</i> (5)	5	5			4	4		1
<i>P. vulgaris</i> (1)	1	1			1	1		
Other <i>Enterobacteriales</i>								
<i>Serratia marcescens</i> (6)	6	6			6	6		
<i>Salmonella enterica</i> (5)	5	5			5	5		
<i>Providencia stuartii</i> (2)	2	2			2	2		
<i>Cronobacter sakazakii</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Morganella morganii</i> (1)	1	1			1	1		
Total number of isolates (%)	418 (100)	411 (98.3)			416 (99.5)	412 (98.6)		2 (0.5)

*The protein spectra of the species were not included in the database.

†*E. asburiae* were reported as *E. cloacae* complex by ASTA MicroIDSys.

Abbreviation: Mis-ID, misidentification; Invalid-ID, invalid identification.

포도당 비발호 그람음성 막대균에서의 ASTA MicroIDSys의 균종 동정 정확도

ASTA MicroIDSys에서의 균속 및 균종 일치율은 98.8% (165/167), 91.0% (152/167)였으며 invalid identification이 2주(1.2%) 있었고 misidentification은 없었다(Table 2). Bruker Biotyper의 균속 및 균종 일치율은 99.4% (166/167), 88.0% (147/167)였고 invalid identification이 1주(0.6%) 있었으며 misidentification은 없었다. ASTA MicroIDSys는 *Acinetobacter johnsonii* 1주와 *Chryseobacterium massiliae* 1주의 동정 결과를 내지 못하였으며, *Acinetobacter seifertii* 3주와 *Acinetobacter soli* 2주, *Acinetobacter* 14TU 1주, *Acinetobacter grimontii* 1주, *Acinetobacter gyllenbergii* 1주, *Acinetobacter oleivorans* 1주, *Acinetobacter venetianus* 1주, *Burkholderia cepnocepacia* 2주, *Burkholderia cepacia* 1주에서 균속 일치를 보였다. Bruker Biotyper의 경우 *Acinetobacter nosocomialis* 28주 중 1주에서

invalid identification을 보였으며, 5주는 균속 일치율을 보였다. 이외에도 *A. seifertii* 3주, *A. soli* 2주, *A. 14TU* 1주, *A. grimontii* 1주, *A. gyllenbergii* 1주, *A. oleivorans* 1주, *A. venetianus* 1주, *B. cepacia* 2주, *B. cepnocepacia* 1주, *C. massiliae* 1주에서 균속 일치율을 보였다. *Burkholderia* 균속의 경우 두 장비 모두 균속명은 정확히 동정하였으나, 균종 일치율은 62.5% (5/8)에 불과하였다.

Table 2. Comparison of bacterial identification between ASTA MicroIDSys and Bruker Biotyper for 167 glucose non-fermenting bacilli isolates

Reference identification (number of isolates)	ASTA MicroIDSys, number of isolates				Bruker Biotyper, number of isolates			
	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID
	Genus level	Species level			Genus level	Species level		
<i>Acinetobacter</i>								
<i>A. baumannii</i> (47)	47	47			47	47		
<i>A. nosocomialis</i> (28)	28	28			27	22		1
<i>A. pittii</i> (13)	13	13			13	13		
<i>A. bereziniae</i> (8)	8	8			8	8		
<i>A. haemolyticus</i> (4)	4	4			4	4		
<i>A. ursingii</i> (4)	4	4			4	4		
<i>A. seifertii</i> (3)	3	0*			3	0*		
<i>A. radioresistens</i> (2)	2	2			2	2		
<i>A. soli</i> (2)	2	0*			2	0*		
<i>A. 14TU (A. colistiniresistens)</i> (1)	1	0*			1	0*		
<i>A. baylyi</i> (1)	1	1			1	1		
<i>A. grimontii</i> (1)	1	0*			1	0*		
<i>A. gyllenbergii</i> (1)	1	0*			1	0*		
<i>A. johnsonii</i> (1)	0	0		1	1	1		
<i>A. lwoffii</i> (1)	1	1			1	1		
<i>A. oleivorans</i> (1)	1	0			1	0*		
<i>A. venetianus</i> (1)	1	0*			1	0*		
<i>Pseudomonas</i>								
<i>P. aeruginosa</i> (23)	23	23			23	23		
<i>Stenotrophomonas</i>								
<i>S. maltophilia</i> (13)	13	13			13	13		
<i>Burkholderia</i>								
<i>B. cenocepacia</i> (4)	4	2			4	3		
<i>B. cepacia</i> (4)	4	3			4	2		
Other GNFB								
<i>Chryseobacterium massiliae</i> (1)	0	0		1*	1	0*		
<i>Chryseobacterium gleum</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Chryseobacterium indologenes</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Moraxella catarrhalis</i> (1)	1	1			1	1		
Total number of isolates (%)	165 (98.8)	152 (91.0)		2 (1.2)	166 (99.4)	147 (88.0)		1 (0.6)

*The protein spectra of the species were not included in the database.

Abbreviation: Mis-ID, misidentification; Invalid-ID, invalid identification.

그람양성 알균에서의 ASTA MicroIDSys의 균종 동정 정확도

그람양성 알균 216주에 대해 ASTA MicroIDSys는 균속명까지 모두 일치하는 동정 결과를 보였다. Bruker Biotyper는 *Streptococcus pneumoniae* 1주에서 invalid identification을 보여, 균속 및 균종 일치율은 99.5% (216/215)였다(Table 3).

Table 3. Comparison of bacterial identification between ASTA MicroIDSys and Bruker Biotyper for 216 Gram-positive cocci isolates

Reference identification (number of isolates)	ASTA MicroIDSys, number of isolates				Bruker Biotyper, number of isolates			
	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID
	Genus level	Species level			Genus level	Species level		
<i>Staphylococcus</i>								
<i>S. aureus</i> (45)	45	45			45	45		
<i>S. epidermidis</i> (42)	42	42			42	42		
<i>S. capitis</i> (9)	9	9			9	9		
<i>S. haemolyticus</i> (8)	8	8			8	8		
<i>S. lugdunensis</i> (8)	8	8			8	8		
<i>S. caprae</i> (6)	6	6			6	6		
<i>S. hominis</i> (5)	5	5			5	5		
<i>S. pasteurii</i> (3)	3	3			3	3		
<i>S. saprophyticus</i> (2)	2	2			2	2		
<i>S. simulans</i> (1)	1	1			1	1		
<i>S. warneri</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Enterococcus</i>								
<i>E. faecium</i> (45)	45	45			45	45		
<i>E. faecalis</i> (20)	20	20			20	20		
<i>E. avium</i> (1)	1	1			1	1		
<i>E. casseliflavus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>E. gallinarum</i> (1)	1	1			1	1		
<i>E. raffinosus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Streptococcus</i>								
<i>S. agalactiae</i> (5)	5	5			5	5		
<i>S. pneumoniae</i> (3)	3	3			2	2		1
<i>S. anginosus</i> (2)	2	2			2	2		
<i>S. constellatus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>S. dysgalactiae</i> (1)	1	1			1	1		
<i>S. gallolyticus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>S. pyogenes</i> (1)	1	1			1	1		
<i>S. salivarius</i> (1)	1	1			1	1		
Other Gram-positive cocci								
<i>Lactococcus lactis</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Micrococcus luteus</i> (1)	1	1			1	1		
Total number of isolates (%)	216 (100)	216 (100)			215 (99.5)	215 (99.5)		1 (0.5)

Abbreviation: Mis-ID, misidentification; Invalid-ID, invalid identification.

기타 균주에서의 ASTA MicroIDSys의 균종 동정 정확도

Candida 균속을 비롯한 효모형 진균과 *Corynebacterium striatum* 등의 그람양성 막대균, *Bacteroides fragilis* 등의 혐기성 세균이 포함된 기타 균속들의 동정 결과에서는 ASTA MicroIDSys의 균속 및 균종 일치율은 모두 98.9% (87/88)였으며, Bruker Biotyper의 균속 및 균종 일치율은 각각 98.9% (87/88), 97.7% (86/88)였다(Table 4). *Nocardia nova*는 두 장비 모두 invalid identification의 결과를 보여주었으며, Bruker Biotyper는 *Neisseria macacae* 1주에 대하여 균속 일치를 보여주었다.

Table 4. Comparison of bacterial identification between ASTA MicroIDSys and Bruker Biotyper for 88 other isolates

Reference identification (number of isolates)	ASTA MicroIDSys, number of isolates				Bruker Biotyper, number of isolates			
	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID	Correctly identified		Mis-ID	Invalid-ID
	Genus level	Species level			Genus level	Species level		
<i>Candida</i>								
<i>C. albicans</i> (18)	18	18			18	18		
<i>C. tropicalis</i> (16)	16	16			16	16		
<i>C. glabrata</i> (6)	6	6			6	6		
<i>C. krusei</i> (2)	2	2			2	2		
<i>C. parapsilosis</i> (2)	2	2			2	2		
<i>Corynebacterium</i>								
<i>C. striatum</i> (11)	11	11			11	11		
<i>C. tuberculostrictum</i> (2)	2	2			2	2		
<i>C. accolens</i> (1)	1	1			1	1		
Others								
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i> (6)	6	6			6	6		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)	2	2			2	2		
<i>Actinomyces neuii</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Actinomyces odontolyticus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Aeromonas caviae</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Bacillus pumilus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Brevibacterium casei</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Clostridioides difficile</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Clostridium innocuum</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Eggerthella lenta</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Eikenella corrodens</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Fingoldia magna</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Haemophilus influenza</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Leuconostoc lactis</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Neisseria macacae</i> (1)	1	1			1	0		
<i>Nocardia nova</i> (1)	0	0		1*	0	0		1
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Pichia norvegensis</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Prevotella intermedia</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Propionibacterium avidum</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Rothia mucilaginosa</i> (1)	1	1			1	1		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	1	1			1	1		
Total number of isolates (%)	87 (98.9)	87 (98.9)		1 (1.1)	87 (98.9)	86 (97.7)		1 (1.1)

*Strains not in the database of the instrument.

Abbreviation: Mis-ID, misidentification; Invalid-ID, invalid identification.

두 장비 간 불일치가 발생한 균주

총 889주의 균주 중 *Acinetobacter* species에서 17주, *Burkholderia* species에서 6주, *Klebsiella* species에서 4주, *Enterobacter* species에서 3주, 그리고 *Chryseobacterium* species와 *Neisseria* species, *Nocardia* species, *Proteus* species, *Raoultella* species, *Streptococcus* species에서 각각 1주씩의 불일치가 확인되었다(Table 5). ASTA MicroIDSys에서 발생한 불일치 균주는 총 23건이었으며, 이 중 17건(73.9%)은 데이터베이스에 포함되지 않은 균종이었다.

Table 5. List of bacterial identification differences between ASTA MicroIDSys and Bruker Biotyper

Group	Reference identification	ASTA MicroIDSys		Bruker Biotyper	
		Results	ID score	Results	ID score
Enterobacterales	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>[†]	220	<i>Enterobacter asburiae</i>	1.771
	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>[†]	172	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.109
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>[*]	146	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.193
	<i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	213	<i>Klebsiella variicola</i>	2.238
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	258	Invalid Identification	1.663
	<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>[*]	223	<i>Klebsiella variicola</i>	2.138
	<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>[*]	211	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.879
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	236	Invalid Identification	1.270
	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>[*]	214	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2.331
	Glucose non-fermenting bacilli	<i>Acinetobacter</i> 14TU (<i>A. colistiniresistens</i>)	<i>Acinetobacter junii</i>[*]	188	<i>Acinetobacter parvus</i>[*]
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)	155	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.049
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)	226	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.718
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)	198	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.985
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)	174	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.911
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)	164	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.027
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)	159	Invalid Identification	1.667
<i>Acinetobacter grimontii</i>		<i>Acinetobacter junii</i>[*]	253	<i>Acinetobacter junii</i>[*]	2.166
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>		<i>Acinetobacter junii</i>[*]	181	<i>Acinetobacter junii</i>[*]	1.851
<i>Acinetobacter johnsonii</i>		Invalid Identification	-	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2.265
<i>Acinetobacter oleivorans</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>pittii</i>)	145	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>[*]	1.833
<i>Acinetobacter seifertii</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>pittii</i>)[*]	133	<i>Acinetobacter pittii</i>[*]	1.941
<i>Acinetobacter seifertii</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (<i>nosocomialis</i>)[*]	161	<i>Acinetobacter baumannii</i>[*]	1.994
<i>Acinetobacter seifertii</i>		<i>Acinetobacter nosocomialis</i>[*]	144	<i>Acinetobacter pittii</i>[*]	1.888
<i>Acinetobacter soli</i>		<i>Acinetobacter baylyi</i>[*]	176	Invalid Identification[‡]	1.670
<i>Acinetobacter soli</i>		<i>Acinetobacter baylyi</i>[*]	195	<i>Acinetobacter baylyi</i>[*]	1.821
<i>Acinetobacter venetianus</i>		<i>Acinetobacter haemolyticus</i>[*]	189	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>[*]	2.190
<i>Burkholderia cepacia</i>		<i>Burkholderia cepacia</i>	215	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	1.880
<i>Burkholderia cenocepacia</i>		<i>Burkholderia cepacia</i>	184	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	2.115
<i>Burkholderia cenocepacia</i>		<i>Burkholderia ambifaria</i>	182	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	2.106
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	201	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.232	
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	194	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.169	
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	199	<i>Burkholderia seminalis</i>	2.102	
<i>Chryseobacterium massiliae</i>	Invalid Identification[*]	-	<i>Chryseobacterium species</i>[*]	1.997	
Gram-positive cocci	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	182	Invalid Identification	1.670
Others	<i>Neisseria macacae</i>	<i>Neisseria macacae</i>	184	<i>Neisseria mucosa</i>	2.052
	<i>Nocardia nova</i>	Invalid Identification[*]	-	Invalid Identification	1.696

The isolates which was not correctly identified at the species level were indicated in bold.

^{*}The protein spectra of the species were not included in the database.

[†]*E. asburiae* were reported as *E. cloacae* complex by ASTA MicroIDSys.

Abbreviation: ID, identification.

임상미생물 검사실에서 5년간 보고된 균동정 결과와의 비교

1개 종합병원의 임상미생물 검사실에서 2014년 9월부터 2019년 9월까지 5년간 세균배양 검사에서 균종 동정 후 보고한 총 108,251건의 결과를 ASTA MicroIDSys 데이터베이스의 균주 목록과 비교하였다. 검사실에서 보고된 균속은 총 133속이었으며 균종은 총 401종이었는데, 이중 ASTA MicroIDSys의 데이터베이스에 포함된 균속은 120속(90.2%), 균종은 349종(87.0%)이었다. 그러나 5년간의 검사실에서 보고된 전체 동정 결과에서 데이터베이스에 포함되지 않는 균주의 비율은 균속 수준에서는 0.3% (373/108,251), 균종 수준에서는 1.4% (1,523/108,251)에 불과하였다. 본 연구에서 확인된 ASTA MicroIDSys의 동정 일치율을 대입할 경우, 기존 보고 결과에 대해 균속 수준에서는 99.7%, 균종 수준에서는 97.9%의 일치도를 보일 것으로 예측되었다(Table 6).

Table 6. Estimated identification results of ASTA MicroIDSys compared to the strains reported by Bruker Biotyper over the past five years

Year	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total
Reported strains	18,117	19,617	18,328	18,684	20,406	13,099	108,251
Estimated number of matched report (%)							
Genus level	18,107 (99.9)	19,608 (100.0)	18,251 (99.6)	18,532 (99.2)	20,316 (99.6)	13,064 (99.7)	107,878 (99.7)
Species level	17,845 (98.5)	19,309 (98.4)	18,011 (98.3)	18,272 (97.8)	19,809 (97.1)	12,773 (97.5)	106,018 (97.9)

DISCUSSION

장내세균은 대부분 생화학적 분석 방법을 이용하는 자동화장비나 MALDI-TOF MS를 통해 비교적 정확하게 균종 동정이 가능하나[24], *Enterobacter* 균속 등 일부 균종에서는 MALDI-TOF MS의 균종 동정력에 한계가 있음이 보고된 바 있다[11-14]. 특히 *E. cloacae*의 경우에는 *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* 등과 단백질 구성 성분이 유사하여 MALDI-TOF MS 장비로 정확하게 구별되지 않는다고 알려져 있다[12]. 본 연구에서도 *K. aerogenes*나 *K. variicola*, *E. hormaechei*, *R. planticola* 등의 균종에서 두 장비 모두 소수의 균주이지만 동정 불일치가 발생하였다. 장내세균에 대한 ASTA MicroIDSys의 균종 동정 일치율은 98.3% (411/418), Bruker Biotyper는 98.6% (412/418)였으며, ASTA MicroIDSys에서 균종 동정 결과가 일치하지 않았던 7 균주 중 6균주는 데이터베이스에 포함되어 있지 않았거나(4주), *E. cloacae* complex로 통합하여 보고하는 경우(2주)였다. *Enterobacter* 균속에 대해서 *E. cloacae*와 *E. kobei*, *E. asburiae*를 *E. cloacae* complex로 통합하여 보고하고 있었으며, *E. hormaechei*는 데이터베이스에 없었다. 추후 지속적인 데이터베이스의 보강을 통하여 균종 동정 정확도를 향상시켜야 될 것으로 판단된다.

Acinetobacter 균속은 가장 중요한 원내 기회 감염균 중 하나로 중환자실에서 폐렴과 패혈증을 흔히 유발하며, 인공 장기 환자의 폐렴과 화상감염에서도 흔히 분리된다. 카바페넴 내성 *Acinetobacter* 균속은 다른 계열의 항생제에도 동시에 내성을 지닌 다제내성균인 경우가 많으며 사망률과 병원 입원기간을 현저히 증가시키는 것으로 알려져 있다[25]. 특히 우리나라에서 *A. baumannii*는 non-*baumannii* *Acinetobacter* 균종에 비해 카바페넴 내성률이 매우 높으므로, 임상미생물 검사실에서는 *Acinetobacter* 균속 중에서도 *A. baumannii*를 정확히 구별해서 보고해야 할 필요가 있다[26]. 본 연구에서 *tpoB* 유전자 염기서열 분석 결과와 ASTA MicroIDSys의 균속 일치율

은 99.2% (118/119), 균종 일치율은 90.8% (108/119)였다. *A. baumannii*는 전체 *Acinetobacter* 균속 중 39.5% (47/119)였는데, 모두 정확하게 균속 동정 하였다. *non-baumannii Acinetobacter*의 경우 균속 일치율은 84.7% (61/72)였고, *A. baumannii*로 잘못 동정된 경우는 없었다. 데이터베이스에 포함되지 않은 균종을 제외하였을 경우, *non-baumannii Acinetobacter*의 균속 일치율은 96.8% (61/63)로 증가하였다. 정 등은 *Acinetobacter* 균속을 대상으로 Bruker Biotyper의 데이터베이스를 개선하여, 균속 동정 일치율을 높일 수 있었다고 보고한 바 있다[27]. 본 연구에서 ASTA MicroIDSys는 *A. baumannii*와 *non-baumannii Acinetobacter* 균종의 구별에 매우 높은 정확도를 보이므로, 임상에서의 요구에 충분히 부합할 수 있을 것으로 생각된다.

*B. cepacia*는 토양, 물, 동식물 등 주위 환경에서 발견되는 그람음성 호기성 막대균이다. 낭포성 섬유증과 만성 육아종성 질환을 가진 환자에서 *Cepacia* 증후군(괴사성 육아종성 폐렴과 이로 인한 균혈증)의 원인균으로 보고된 바 있으며, 카테터나 오염된 수액 또는 약제를 통한 병원 감염 및 병원성 폐렴과도 관련이 있다[28,29]. BCC는 *B. cepacia* genomovar I과 *B. cenocepacia Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia pyrocinia*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*를 포함하는 유전적으로 가까운 9개의 균종으로 구성되어 있으며 이중 *B. cenocepacia*는 *tpoB* 유전자의 다형성을 갖는 4개의 아형이 존재한다[30]. 따라서 BCC는 MALDI-TOF MS나 16s rRNA, *tpoB* 유전자 염기서열 분석만으로는 균종 수준까지의 동정이 어렵고 *hisA* 또는 *recA* 등의 유전자 염기서열 분석을 통해 정확한 균종 동정이 가능한 것으로 알려져 있다[31]. 본 연구에서도 두 MALDI-TOF MS 장비 모두 *Burkholderia species*의 균속명은 정확히 동정하였으나, 균종 일치율은 62.5%로 낮았으며, *B. cepacia*와 *B. cenocepacia*를 정확히 구분하지 못하였다. 따라서 MALDI-TOF MS에서 BCC에 해당하는 균주가 동정된 경우에는 균속까지만 신뢰할 수 있는 동정 결과로 보고해야 하며, 해당 균주에 대한 정확한 균종을 보고하려면 *hisA*나 *recA* 유전자의 염기서열 분석을 추가로 시행해야 할 것으로 판단된다.

Candida 균속과 *Nocardia* 균속은 MALDI-TOF MS를 통해 비교적 정확한 동정이 가능하다고 알려져 있다[32,33]. 본 연구에서도 *Candida* 균속은 두 장비간 동정 결과가 정확히 일치하였으나 *N. nova*는 두 장비 모두 정확한 균종 동정에 실패하였다. 다만, ASTA MicroIDSys는 해당 균종이 데이터베이스에 없었으며, 수집 검체 중에서 *Nocardia* 균속이 1주 밖에 없어서 검체 상태나 균주 준비와 관련된 우연 오차의 가능성도 배제할 수 없었다.

5년간 본원 임상미생물 검사실에서 Bruker Biotyper를 사용하여 보고되었던 총 401종의 균종 중에서 ASTA MicroIDSys의 데이터베이스에 포함되어 있었던 균종은 349종 (87.0%)이었다. 그러나 이 장비를 실제 검사실에서 운영한다고 가정했을 경우 약 10만여 건의 동정 결과에 대해 ASTA MicroIDSys는 대부분의 주요 균종을 포함하여 97.9% (106,018/108,251)까지 동일하게 보고가 가능한 것으로 예상되었다. Bruker Biotyper나 분자진단검사를 통한 균종 동정 결과와 불일치했던 대부분의 균종이 데이터베이스에 없었던 균종들이었고 데이터베이스에 포함된 균종들에 대해서는 비교적 높은 일치율을 보였음을 감안하면, 임상미생물 검사실에서 흔히 보고되는 주요 균종에 대한 분석 정보는 충실하게 반영되어 있는 것으로 판단된다.

결론적으로, 최근 새로 출시된 MALDI-TOF MS 장비인 ASTA MicroIDSys는 환자 검체에서 분리되는 임상적으로 중요한 대부분의 균종에서 높은 동정 일치율을 보여주었으며, 임상미생물 검

사실에서 사용 가능할 것으로 판단된다. 동정에 실패하거나 불일치를 보였던 균종 대부분이 데이터베이스에 없었던 경우였으므로, 데이터베이스의 확장을 통해 더욱 향상된 동정 성능을 갖출 수 있을 것으로 예상된다.

요약

배경: 최근 새로 출시된 말디토프 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 장비인 ASTA MicroIDSys (ASTA, Korea)는 기존의 MALDI-TOF MS 장비들과 균종 동정 결과의 일치율이 높은 것으로 보고된 바 있다. 본 연구는 임상미생물 검사실에 의뢰되었던 검체에서 배양된 균주 전수를 대상으로 ASTA MicroIDSys와 Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Germany)의 균종 동정 성능을 비교하였다. 또한 MALDI-TOF MS에서 균종 구별이 잘 되지 않는다고 알려져 있는 균속들에 대한 추가적인 평가를 통해, ASTA MicroIDSys의 유용성과 한계를 평가하고자 하였다.

방법: 총 889주의 임상 분리주를 ASTA MicroIDSys와 Bruker Biotyper로 각각 균종을 동정하여 결과를 비교하였다. 동정된 균종 또는 균속이 일치하지 않는 경우 해당 균주의 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 균종을 확인하였고, *Acinetobacter* 균속과 *Klebsiella* 균속, *Burkholderia cepacia* complex에 해당되는 모든 균주는 *rpoB*와 *hisA*, *recA* 유전자의 염기서열 분석을 통해 균종을 확정하였다.

결과: ASTA MicroIDSys의 균속 및 균종 일치율은 장내세균에서 100%와 98.3%, 포도당 비발효 그람음성 막대균에서 98.8%와 91.0%, 그람양성 알균에서 100%와 100%, 기타 균주에서 98.9%와 98.9%였다. 균종 동정 결과가 일치하지 않았던 균주는 *Acinetobacter* 균속, *Burkholderia* 균속, *Klebsiella* 균속, *Enterobacter* 균속 등이었으며, 총 23건의 불일치 균종 중 17건(73.9%)은 데이터베이스에 포함되지 않은 균종에 기인한 것이었다. 임상미생물 검사실에서 5년간 보고되었던 총 108,251건 중 기존 보고 결과와 일치할 것으로 예측되는 균종 동정 건수는 106,018건(97.9%)이었다.

결론: ASTA MicroIDSys는 환자 검체에서 분리되는 임상적으로 중요한 대부분의 균종을 정확하게 동정하였으며 Bruker Biotyper와도 높은 동정 일치율을 보여 임상미생물 검사실에서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* 2003;115:529-35.
2. Kootallur BN, Thangavelu CP, Mani M. Bacterial identification in the diagnostic laboratory: how much is enough? *Indian J Med Microbiol* 2011;29:336-40.

3. Park Y, Lee Y, Kim M, Choi JY, Yong D, Jeong SH, et al. Recent trends of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens and clinical characteristics of anaerobic bacteremia. *Infect Chemother* 2009;41:216-23.
4. Brook I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 2010;16:183-9.
5. Couzinet S, Jay C, Barras C, Vachon R, Vernet G, Ninet B, et al. High-density DNA probe arrays for identification of staphylococci to the species level. *J Microbiol Methods* 2005;61:201-8.
6. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007;45:2761-4.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. MM18-A. Wayne PA: 2007.
8. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:74-82.
9. 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 time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543-51.
10. 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;44:104-9.
11. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1620-5.
12. Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiol Lett* 2012;328:46-53.
13. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front Microbiol* 2015;6:481.
14. Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, Pereira RH, Gales AC, Marques EA. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:126-8.
15. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 2017;138:20-9.
16. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;93:965-74.
17. Lee Y, Sung JY, Kim H, Yong D, Lee K. Comparison of a new matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry platform, ASTA MicroIDSys, with Bruker Biotyper for species identification. *Ann Lab Med* 2017;37:531-5.
18. Lee H, Park JH, Oh J, Cho S, Koo J, Park IC, et al. Evaluation of a new matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for the identification of yeast isolation. *J Clin Lab Anal* 2019;33:e22685.
19. Kim D, Ji S, Kim JR, Kim M, Byun JH, Yum JH, et al. Performance evaluation of a new matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, ASTA MicroIDSys system, in bacterial identification against clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2020;61:102131.

20. Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 2009;155:2333-41.
21. Papaleo MC, Perrin E, Maida I, Fondi M, Fani R, Vandamme P. Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by sequence analysis of the *hisA* gene. *J Med Microbiol* 2010;59:1163-70.
22. Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, et al. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:3917-27.
23. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:716-21.
24. Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:4705-7.
25. Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF. *Acinetobacter baumannii* 2002-2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. *Microb Drug Resist* 2010;16:209-15.
26. Shim BS, Kim CS, Kim ME, Lee SJ, Lee DS, Choe HS, et al. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections: results from the Korean antimicrobial resistance monitoring system. *J Infect Chemother* 2011;17:440-6.
27. Jeong S, Hong JS, Kim JO, Kim KH, Lee W, Bae IK, et al. Identification of *Acinetobacter* species using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann Lab Med* 2016;36:325-34.
28. Speert DP. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatr Respir Rev* 2002;3:230-5.
29. Marioni G, Rinaldi R, Ottaviano G, Marchese-Ragona R, Savastano M, Staffieri A. Cervical necrotizing fasciitis: a novel clinical presentation of *Burkholderia cepacia* infection. *J Infect* 2006;53:e219-22.
30. Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ, et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.-a new twist to an old story. *Res Microbiol* 2003;154:91-6.
31. Ragupathi NKD and Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2019;18:1-10.
32. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, Francois N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:153-8.
33. Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, et al. Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87:7-10.