



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Estudios de tipificación con MALDI-TOF

Esther Culebras^{a,*}, Adela Álvarez-Buylla^b, M. José Artacho Reinoso^c y José Antonio Lepe^c

^aServicio de Microbiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

^bPublic Health Laboratory, Birmingham, Reino Unido

^cServicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

RESUMEN

Palabras clave:

MALDI-TOF
Espectrometría de masas
Epidemiología
Tipificación bacteriana

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) se ha convertido rápidamente en una herramienta de indiscutible utilidad para la identificación y caracterización de microorganismos en numerosos laboratorios de microbiología clínica. La técnica es rápida, fiable y económica y ofrece múltiples posibilidades en distintas áreas de la microbiología. En esta revisión se ofrece una visión general de su utilidad para los estudios de tipificación y epidemiología bacteriana detallando las aproximaciones metodológicas que pueden emplearse tanto para su realización como para el análisis de resultados que se obtienen. Por último, se resumen los estudios existentes sobre su uso en la caracterización de distintas especies bacterianas.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Studies of bacterial typing with MALDI-TOF

ABSTRACT

Keywords:

MALDI-TOF
Mass spectrometry
Epidemiology
Bacterial typing

MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) mass spectrometry has emerged as a potential tool for microbial characterization and identification in many microbiology departments. The technology is rapid, sensitive, and relatively inexpensive in terms of both the labour and costs involved. This review provides an overview on its utility for strain typing and epidemiological studies and explains the methodological approaches that can be used both for the performance of the technique and for the analysis of results. Finally, the review summarizes studies on the characterization of distinct bacterial species.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Los sistemas de tipificación bacteriana engloban un conjunto de métodos microbiológicos que permiten diferenciar cepas pertenecientes a una misma especie. El objetivo final de cualquiera de estos métodos es establecer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente. Este tipo de análisis posibilita, entre otros aspectos, el estudio de brotes hospitalarios facilitando tanto su detección precoz como la caracterización de modelos de transmisión de infecciones entre personas y el diseño de medidas de control.

Los métodos de tipificación utilizados en microbiología han evolucionado a lo largo de los años, desde los considerados tradicionales basados en el fenotipo hasta las técnicas actuales de tipificación molecular¹. Todas deben cumplir una serie de requisitos esenciales: pre-

sentar un elevado poder discriminatorio; ser precisas y aplicables a gran variedad de organismos de interés, y ser altamente reproducibles, rápidas, de bajo coste y fáciles de llevar a cabo e interpretar. En el caso de estudios de vigilancia epidemiológica, las técnicas además deben presentar gran estabilidad a lo largo del tiempo para permitir el establecimiento de medidas de control a medio y largo plazo. También son aconsejables métodos de validación que usen controles internos y externos para obtener datos fiables y de gran calidad. El uso de programas informáticos especializados puede ayudar en este último punto pues, además de permitir la realización de controles de calidad de forma automática, utilizan algoritmos de agrupamiento, presentan herramientas que ayudan a la detección de brotes y facilitan el almacenamiento y manejo de datos²⁻⁵.

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas de tipificación molecular. Entre ellas merecen especial mención la electroforesis en campo pulsado (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*) y el *multilocus sequence typing* (MLST). La PFGE se basa en la caracterización de aislados según los patrones de bandas originados tras digestión

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: esther.culebras@salud.madrid.org (E. Culebras).

del ADN genómico con enzimas de restricción. Tiene un gran poder discriminatorio y una gran concordancia epidemiológica, pero es una técnica laboriosa, larga y que precisa de personal entrenado para su realización. Por otro lado, presenta cierta arbitrariedad en los criterios de interpretación y no es posible diferenciar entre bandas de tamaños similares, requiriendo ocasionalmente de un análisis subjetivo si aparecen patrones de bandas complejos. El MLST se basa en el estudio y caracterización mediante secuencia de distintos genes *housekeeping*². La gran ventaja de MLST frente a PFGE es que los datos generados por secuenciación no son ambiguos y se dispone de una nomenclatura estandarizada internacionalmente y de una base de datos central accesible en internet que recoge todas las secuencias alélicas y ST descritos. Las principales desventajas son su precio, su laboriosidad y el tiempo que requiere para su realización, que depende en gran medida del número de *loci* que se estudien. Además, para algunos patógenos tiene un poder discriminatorio insuficiente⁴.

Dentro de las técnicas de tipificación basadas en PCR destacan también MLVA (*multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) y rep-PCR (*repetitive sequence-based polymerase chain reaction*). Todas se pueden utilizar en el estudio de brotes y de rutas de transmisión entre pacientes y hospitales, ofreciendo resultados de forma rápida y con un buen nivel discriminatorio^{3,6-8}.

Las nuevas metodologías de secuenciación WGS (*whole genome sequencing*) o NGS (*next generation sequencing*) aparecen como herramientas potentes y atractivas para la detección de variaciones en el genoma bacteriano y las investigaciones epidemiológicas. Mediante estas técnicas se crean millones de lecturas de secuencias cortas en una sola carrera que son posteriormente ensambladas creando una secuencia nucleotídica completa del genoma que puede ser comparada con genomas de referencia previamente secuenciados. Sin embargo —aunque estos sistemas de secuenciación de segunda generación ofrecen un amplio abanico de posibilidades— en el momento actual su utilidad es limitada, ya que precisan importantes recursos informáticos para el análisis de datos junto con personal especializado y bien entrenado. Además, su precio es elevado y requiere de un tiempo de realización largo, por lo que en la actualidad su uso se encuentra limitado a ciertos centros de investigación o centros especializados^{3,4}.

En general, aunque todas las técnicas moleculares descritas han probado su utilidad a lo largo de los años, resultan en su mayoría excesivamente laboriosas, caras y con tiempos de realización largos, lo que limita su utilidad en aplicaciones a tiempo real. Es en este contexto donde, gracias a su rapidez, bajo coste y simplicidad en su realización, la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) aparece como una alternativa prometedora para el estudio epidemiológico de las bacterias de interés clínico. Sin embargo, a día de hoy, esta aplicación aún está poco desarrollada y carece de protocolos estandarizados y de guías que ayuden a la interpretación de los datos obtenidos^{9,10}.

Aspectos metodológicos

El análisis epidemiológico mediante EM se puede llevar a cabo con 2 enfoques diferentes: mediante el uso de librerías espectrales y/o por aproximaciones informáticas.

Los análisis basados en librerías implican la construcción de espectros de referencia con subespecies cuya identidad esté bien contrastada por métodos fenotípicos o genotípicos. La comparación de estos espectros de referencia debe realizarse con algoritmos que permitan la exclusión de los picos comunes (aquellos que se utilizan para la identificación a nivel de especie) y que, por contrapartida, potencien aquellos que se asocian a subespecies concretas.

Las aproximaciones bioinformáticas se basan en identificar picos característicos (biomarcadores) dentro de un espectro y valorar tanto su presencia como la deriva que puedan sufrir como resultado de

mutaciones en los genes que los codifican o bien por modificaciones postraduccionales. En general, estos picos significativos presentan una intensidad por encima de 1.000 unidades arbitrarias y una relación señal-ruido > 10. Las isoformas de una proteína pueden ser identificadas por cambios de masa entre 5-50 m/z¹¹.

Sea cual sea el enfoque que se utilice, es un hecho contrastado que los métodos de subtipado y agrupamiento (*clustering*) son muy sensibles a las condiciones de crecimiento bacteriano, a la intensidad de los picos y a la calidad del espectro de masas utilizado, por lo que, para conseguir repetitividad en los ensayos, es muy importante intentar normalizar en lo posible una serie de puntos críticos que abarcan todas las fases del proceso: desde el cultivo bacteriano y la preparación de la muestra hasta la adquisición y posterior análisis de los espectros⁹. A continuación se ofrecen unas recomendaciones generales que pueden ayudar a la estandarización de todo el proceso.

Condiciones de cultivo y preparación de las muestras

Conviene utilizar medios de cultivo no selectivos como el Luria-Bertani, el BHI (Brain Heart Infusion) o el agar sangre con base Columbia. Estos medios pueden ser líquidos o sólidos, si bien se ha comprobado que el cultivo en caldo tiende a producir poblaciones bacterianas más homogéneas al proporcionar un crecimiento más sincronizado¹². Además, a nivel de subespecie, es muy importante que siempre se comparen espectros de masas de bacterias en similares condiciones de crecimiento, preferiblemente en fase logarítmica o estacionaria¹³.

Tras el crecimiento, lo más común es realizar una extracción de proteínas mediante etanol-ácido fórmico¹². El empleo de células intactas, aunque *a priori* supone un ahorro de trabajo, conlleva una serie de inconvenientes (no permite una distribución homogénea de la muestra en la matriz, dificulta el empleo de una cantidad adecuada y similar de biomasa) que afectan a la calidad y reproducibilidad de los espectros¹⁴.

Como matriz para el análisis suele emplearse una solución saturada de ácido alpha-ciano-4-hidroxicinámico (α -HCCA) en 50% de acetonitrilo y 2,5% de ácido trifluoroacético. Esta matriz HCCA puede mezclarse con un calibrador interno que proporciona una mayor precisión en la determinación de las masas de los picos. Sin embargo, en el proceso de calibración no debe olvidarse que la calibración externa convencional proporciona una mayor intensidad en los picos del espectro, presumiblemente por una menor competencia de carga entre los péptidos del calibrador y los de la muestra¹⁵.

Adquisición del espectro

Con independencia del espectrómetro de masas utilizado, la forma de adquisición de los picos afecta a la calidad y reproducibilidad del espectro obtenido. Aunque la adquisición automática aumenta la resolución base de los picos, otras medidas de calidad como la relación señal-ruido, abundancia de picos y reproducibilidad se reducen¹⁶. Por este motivo, para el trabajo epidemiológico parece más conveniente una adquisición manual de los espectros o —en caso de optar por la adquisición automática— se debe establecer una cuidadosa configuración de los parámetros de adquisición, según lo descrito por Zhang et al¹⁷. En cualquier caso, y para reducir la variabilidad asociada a las condiciones de cultivo y la preparación de la muestra, es necesario realizar replicados.

Análisis bioinformático

Una vez obtenido el espectro en bruto (*crude spectrum*), este se debe procesar y analizar mediante programas asociados a los espectrómetros de masas (p. ej., Biotyper para sistemas Flex de Bruker Daltonics) o mediante programas externos que aportan una gran variedad de posibilidades de análisis; los más empleados son: ClinPro-

Tools (Bruker Daltonics), MALDIquant (entorno R), MATLAB (MathWorks) o BioNumerics (Applied Maths) (<http://strimmerlab.org/notes/mass-spectrometry.html>).

El análisis bioinformático implica 2 etapas: el preprocesamiento y el procesamiento y análisis de los espectros.

En el preprocesamiento, los espectros sin una manipulación previa se ajustan mediante algoritmos de reducción de ruido, corrección de la línea base y normalización de la intensidad¹⁸.

El procesamiento y posterior análisis de los espectros va a permitir tanto la identificación de subespecies (por las aproximaciones detalladas con anterioridad) como el establecimiento de las relaciones que existen entre ellas.

El método más simple para comparar distintas cepas es el cálculo del índice de determinación (CCI, *composite correlation index*) entre los espectros adquiridos, teniendo en cuenta que un coeficiente > 0,9 indica una fuerte correlación. La composición de las correlaciones puede ser representada mediante matrices de intensidad de color. Otra posibilidad es la construcción de dendrogramas que, mediante niveles de distancia arbitraria, muestran lo relacionados que están entre sí los organismos en estudio. También se pueden emplear otras técnicas de clasificación no basadas en medidas de distancia; la más conocida es el análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*). El objetivo del PCA es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos en el que hay un gran número de variables interrelacionadas (en nuestro caso la intensidad de los picos) al tiempo que conserva su variación. La relación entre cepas se puede observar mediante la representación gráfica en 2 o 3 dimensiones o también mediante dendrogramas.

Tipificación bacteriana y análisis epidemiológico por espectrometría de masas MALDI-TOF

El número de estudios de tipificación bacteriana por EM aumenta de manera constante, si bien es cierto que con resultados a veces dispares. Probablemente sea en la familia Enterobacteriaceae donde se han obtenido conclusiones más satisfactorias con la publicación de trabajos en los que, junto a datos puramente epidemiológicos, aparecen otros relativos a la caracterización de mecanismos de resistencia o incluso al seguimiento no ya de una cepa, sino de un plásmido concreto¹⁹⁻²¹.

La posibilidad de distinguir, dentro de una especie bacteriana, aquellos clones especialmente virulentos o con mayores niveles de resistencia de una manera rápida y sencilla es uno de los retos más atrayentes de la microbiología actual. En este sentido, se ha utilizado la EM MALDI-TOF para detectar complejos clonales de alto riesgo dentro de *Escherichia coli*^{22,23} con resultados muy prometedores. La utilidad de este sistema para la caracterización de distintos tipos o grupos clonales dentro de esta especie bacteriana está refrendada por numerosas publicaciones^{11,24-26}.

Algo similar sucede con *Klebsiella pneumoniae*. Aunque algunos trabajos apuntan a un menor poder discriminatorio que el de otras técnicas más convencionales²⁷, la EM MALDI-TOF se ha empleado con éxito para identificar y tipificar aislados clínicos de esta especie^{28,29}.

Existen también datos relativos a otras especies y géneros dentro de las enterobacterias. La EM ha demostrado su utilidad para distinguir de manera satisfactoria distintas serovariedades de *Salmonella* spp.³⁰⁻³², para caracterizar un brote de *Enterobacter cloacae* resistente³³ y en el biotipado de *Serratia marcescens*³⁴.

Los estudios relativos a los bacilos gramnegativos no fermentadores son, por el contrario, escasos y con resultados poco concluyentes, a veces incluso contradictorios.

Un ejemplo claro de este hecho lo constituye el complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*, para el que no se dispone de un consenso sobre el papel que, en este momento, puede desempeñar la EM. Mientras que algunos autores³⁵ encuentran una buena correlación con las técnicas rep-PCR, otros señalan su insufi-

ciente poder de discriminación para la determinación clonal de *A. baumannii* multirresistentes y su falta de sensibilidad cuando se compara con técnicas de PFGE^{36,37}.

La caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* por EM, aunque con un poder de discriminación menor que el MLST, parece útil para la resolución de grupos y subgrupos^{38,39}, así como para identificar de forma segura los 5 clones de alto riesgo de *P. aeruginosa* (ST111, ST175, ST235, ST253 y ST395)⁴⁰, con las implicaciones que esto conlleva a la hora de implementar de forma rápida medidas de control de la infección.

Los datos de que se dispone para el resto de los bacilos gramnegativos no fermentadores, aunque alentadores, no pueden considerarse concluyentes. No están claras las ventajas que el uso de este método puede tener frente a técnicas moleculares más complejas como el MLST. No obstante, se han publicado trabajos que señalan su capacidad para discriminar especies de *Burkholderia cepacia*⁴¹, para separar aislamientos ambientales y clínicos de *B. pseudomallei*⁴², para caracterizar a nivel de especie y subespecie los integrantes del género *Achromobacter*⁴³ y para la discriminación epidemiológica en grupos de *Stenotrophomonas maltophilia*, aunque en este último caso se requieren aproximaciones bioinformáticas relativamente complejas para poder analizar los espectros de masas que se generan⁵.

Las evidencias de que se dispone sobre la utilidad de la EM MALDI-TOF para la tipificación de microorganismos grampositivos son más numerosas, en especial aquellas que hacen referencia a *Staphylococcus aureus*.

Varios autores han estudiado la utilidad de la EM MALDI-TOF para diferenciar los principales complejos clonales de *S. aureus*, centrándose su mayoría en el análisis de *S. aureus* resistente a metilina (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 y CC398)⁴⁴⁻⁴⁶. En sus ensayos, tratan de identificar picos representativos de cada uno de estos complejos de modo que la técnica pueda ser empleada en los laboratorios de microbiología clínica, donde la rápida identificación de *S. aureus* y sus distintos complejos tiene especial relevancia. Aunque en alguno de estos trabajos sí se ha encontrado asociación entre biomarcadores con valores de m/z definidos y distintos complejos clonales, estos hallazgos necesitan confirmación ya que no se comparten en todos los estudios.

Otro género de interés por su potencial patógeno es *Enterococcus*, especialmente por aquellos aislados que presentan determinantes de resistencia a antibióticos como la vancomicina. El estudio de estos microorganismos también ofrece resultados contradictorios. Mientras algunos autores refieren la capacidad del sistema para identificar picos que se asocian a la presencia de genes *vanA*⁴⁷ y *vanB*⁴⁸, otros apuntan a su baja precisión a la hora de identificar marcadores específicos tanto para los aislados hospitalarios como para los comensales⁴⁵.

Las posibilidades de la EM MALDI-TOF para el biotipado de las principales especies de *Streptococcus* ya se han comentado en otras publicaciones⁹. Hay además referencias para un número considerable de microorganismos de interés clínico (*Listeria monocytogenes*⁴⁹, *Yersinia enterocolitica*⁵⁰, *Clostridium difficile*⁵¹, *Propionibacterium acnes*⁵² e incluso *Helicobacter cinaedi*⁵³) y este número continúa en aumento.

Conclusiones

La EM se presenta como una atractiva opción para la tipificación bacteriana por su simplicidad y rapidez. Otro punto a su favor es el uso rutinario en la mayoría de laboratorios de microbiología clínica para la identificación de especies. Esto supone que, con un incremento mínimo de trabajo y costes, los datos generados podrían ser utilizados para estudios epidemiológicos. Sin embargo, en la actualidad existe una gran variación en los resultados obtenidos, probablemente debida a las diferentes condiciones de cultivo y preparación de las muestras y a los distintos enfoques utilizados para el análisis. Cabe

esperar que la estandarización de las condiciones de análisis y la ampliación de las bases de datos permitan el completo desarrollo de esta técnica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggen S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13 Suppl 3:1-46.
- Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, De Ryck R et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1830-7.
- Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Euro Surveill.* 2013;18:20381.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Van Dijk JM, Laurent F, et al; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18:20380.
- Goering RV, Köck R, Grundmann H, Werner G, Friedrich AW; ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). From theory to practice: molecular strain typing for the clinical and public health setting. *Euro Surveill.* 2013;18:20383.
- Gherardi G, Creti R, Pompilio A, Di Bonaventura G. An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;81:219-26.
- Turton JF, Turton SE, Yearwood L, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1111-6.
- Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, D'Arezzo S, Imperi F, Vergnaud G, et al. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *J Clin Microbiol.* 2011;49:539-48.
- Spinali S, Van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol.* 2015;53:760-5.
- Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1626-30.
- Egli A, Tschudin-Sutter S, Oberle M, Goldenberger D, Frei R, Widmer AF. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli*—a novel tool for real-time outbreak investigation. *PLoS One.* 2015;10:e0120624.
- Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev.* 2013;32:188-217.
- Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2009;4:732-42.
- Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Methods.* 2010;2:1941-7.
- Mitchell M, Mali S, King CC, Bark SJ. Enhancing MALDI time-of-flight mass spectrometer performance through spectrum averaging. *PLoS One.* 2015;10:e0120932.
- Schumaker S, Borrer CM, Sandrin TR. Automating data acquisition affects mass spectrum quality and reproducibility during bacterial profiling using an intact cell sample preparation method with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26:243-53.
- Zhang L, Borrer CM, Sandrin TR. A designed experiments approach to optimization of automated data acquisition during characterization of bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2014;9:e92720.
- Fonville JM, Carter C, Cloarec O, Nicholson JK, Lindon JC, et al. Robust data processing and normalization strategy for MALDI mass spectrometric imaging. *Anal Chem.* 2012;84:1310-9.
- Angeletti S, Dicuonzo G, Lo Presti A, Cella E, Crea F, Avola A, et al. MALDI-TOF mass spectrometry and bla_{KPC} gene phylogenetic analysis of an outbreak of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains. *New Microbiol.* 2015;38:541-550.
- Lau AF, Wang H, Weingarten RA, Drake SK, Suffredini AF, Garfield MK, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2804-12.
- Youn JH, Drake SK, Weingarten RA, Frank KM, Dekker JP, Lau AF. Clinical Performance of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for the Detection of Certain bla_{KPC}-containing Plasmids. *J Clin Microbiol.* 2015;54:35-42.
- Novais A, Sousa C, De Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:1391-9.
- Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, et al. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1034-40.
- 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;94:180-91.
- Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, Ichiyama S. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* using VITEK MS Plus matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2015;119:7-9.
- Nakamura A, Komatsu M, Kondo A, Ohno Y, Kohno H, Nakamura F, et al. Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry: discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83:237-44.
- Sachse S, Bresan S, Erhard M, Edel B, Pfister W, Saupe A, et al. Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;80:267-71.
- Bernaschi P, Del Chierico F, Petrucca A, Argentieri A, Ciofi Degli Atti M, Ciliento G, et al. Microbial tracking of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital setting. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;26:463-72.
- 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.
- Leuschner RG, Beresford-Jones N, Robinson C. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry spectra. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38:24-31.
- 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;77:4136-46.
- 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.
- Khenouchi NC, Loucif L, Boutefnouchet N, Allag H, Rolain JM. MALDI-TOF MS as a Tool To Detect a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase- and ArmaA Methyltransferase-Producing *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates in Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:6477-83.
- Batah R, Loucif L, Olaitan AO, Boutefnouchet N, Allag H, Rolain JM. Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmaA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist.* 2015;21:470-6.
- Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, et al. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:603-6.
- Rim JH, Lee Y, Hong SK, Park Y, Kim M, D'Souza R, et al. Insufficient Discriminatory Power of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Dendrograms to Determine the Clonality of Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from an Intensive Care Unit. *Biomed Res Int.* 2015;535027.
- 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.
- Mulet M, Gomila M, Scotta C, Sanchez D, Lalucat J, Garcia-Valdes E. Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst Appl Microbiol.* 2012;35:455-64.
- Oumeraci T, Jensen V, Talbot SR, Hofmann W, Kostrzewa M, Schlegelberger B, et al. Comprehensive MALDI-TOF biotyping of the non-redundant Harvard *Pseudomonas aeruginosa* PA14 transposon insertion mutant library. *PLoS One.* 2015;10:e0117144.
- Cabrolier N, Sauguet M, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1395-8.
- Miñan A, Bosch A, Lasch P, Stammler M, Serra DO, Degrossi J, et al. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Analyst.* 2009;134:1138-48.
- Niyompanich S, Jaresithikunchai J, Srisanga K, Roytrakul S, Tungpradabkul S. Source-identifying biomarker ions between environmental and clinical *Burkholderia pseudomallei* using whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS One.* 2014;9:e99160.
- Gomila M, Prince-Manzano C, Svensson-Stadler L, Busquets A, Erhard M, Martínez DL, et al. Genotypic and phenotypic applications for the differentiation and species-level identification of *Achromobacter* for clinical diagnoses. *PLoS One.* 2014;9:e114356.
- Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of

- Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1809-17.
45. Lasch P, Fleige C, Stammeler M, Layer F, Nubel U, Witte W, et al. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods.* 2014;100:58-69.
 46. Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-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;301:64-8.
 47. Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, et al. Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44:256-9.
 48. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2918-31.
 49. Jadhav S, Gulati V, Fox EM, Karpe A, Beale DJ, Seviour D, et al. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Microbiol.* 2015;202:1-9.
 50. Rizzardi K, Wahab T, Jernberg C. Rapid subtyping of *Yersinia enterocolitica* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for diagnostics and surveillance. *J Clin Microbiol.* 2013;51:4200-3.
 51. Rizzardi K, Akerlund T. High Molecular Weight Typing with MALDI-TOF MS - A Novel Method for Rapid Typing of *Clostridium difficile*. *PLoS One.* 2015;10:e0122457.
 52. Nagy E, Urban E, Becker S, Kostrzewa M, Voros A, Hunyadkurti J, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe.* 2013;20:20-6.
 53. Taniguchi T, Sekiya A, Higa M, Saeki Y, Umeki K, Okayama A, et al. Rapid identification and subtyping of *Helicobacter cinaedi* strains by intact-cell mass spectrometry profiling with the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014;52:95-102.