

دارای رتبه علمی - پژوهشی

از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

مقایسه روش طیف سنجی جرمی MALDI-TOF با روش های ملکولی و بیوشیمیایی در شناسایی انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه های بیمارستانی

حسین صمدی کفیل

دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی
پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم
پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

اشرف محبتی مبارز

دانشیار، دکتری تخصصی باکتری شناسی
پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم
پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت
مدرس، تهران، ایران

مهدی فروزنده مقدم

دانشیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، گروه
بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی، دانشکده علوم پزشکی،
دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده مسئول: اشرف محبتی مبارز

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۶۲

پست الکترونیک: mmmobarez@modares.ac.ir

آدرس: دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت
مدرس، تهران، ایران

وصول مقاله: ۹۱/۹/۲۹

اصلاح نهایی: ۹۱/۱۰/۲۵

پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: انتروکوکوس ها باکتری های گرم مثبتی هستند که به عنوان فلور نرمال در روده انسان، محصولات لبنی و محیط اطراف حضور دارند ولی در سال های اخیر به عنوان یک بیماریزای مهم فرصت طلب در عفونت های بیمارستانی ظهور کرده اند. در این مطالعه به بررسی و مقایسه کارآمدی روش نوین طیف سنجی جرمی MALDI-TOF در انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم پرداخته شده است و با روش های بیوشیمیایی و ملکولی مورد استفاده در تشخیص مقایسه شده است.

روش بررسی: ۷۵ نمونه کلینیکی مشکوک به انتروکوکوس جهت بررسی بیوشیمیایی، ملکولی و طیف سنجی جذبی انتخاب شدند و با آزمون های بیوشیمیایی هیدرولیز اسکولین، کاتالاز، وجود پرولیدونیل آمینوپپتیداز، رشد در مجاورت ۶/۵ درصد نمک، حرکت، رشد در محیط حاوی ۰/۴ درصد تلوریت، و تست قندهای ال-آرابینوز و سوربیتول مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد بررسی و با استفاده از دستگاه طیف سنجی جرمی و نرم افزار بیوتا پیر مورد تحلیل قرار گرفتند. **یافته ها:** در ۳۰ نمونه انتروکوکوس فسیوم، در ۴۲ نمونه انتروکوکوس فکالیس و در ۳ نمونه عفونت با هر دو باکتری شناسائی شدند. در روش های بیوشیمیایی ۲ نمونه انتروکوکوس فسیوم تست آرابینوز منفی و در یک نمونه انتروکوکوس فکالیس تست تلوریت منفی بود. در بررسی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز تمامی نمونه ها به درستی تشخیص داده شدند ولی در ۲ نمونه با وجود تکرار، باندهای قابل افتراق مشهودی نداشتند. در بررسی با استفاده از طیف سنجی جرمی در تمامی نمونه ها تمامی آزمون ها و تکرارها با قابلیت افتراق بالا و به درستی شناسائی شدند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این بررسی روش طیف سنجی جرمی MALDI-TOF روش قابل اطمینان و دقیقی می باشد که در شناسائی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم قادر به تشخیص با حساسیت ۱۰۰ درصد می باشد و با روش های بیوشیمیایی و ملکولی از نظر سرعت اجرا و دقت قابل مقایسه می باشد.

واژه های کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فسیوم، طیف سنجی جرمی

آدرس مقاله:

صمدی کفیل ح، محبتی مبارز، فروزنده مقدم م "مقایسه روش طیف سنجی جرمی MALDI-Tof با روش های ملکولی و بیوشیمیایی در شناسایی انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس جدا شده از نمونه های بیمارستانی". مجله علوم آزمایشگاهی،

۱۳۹۲ دوره هفتم (شماره ۱): ۱-۶

مقدمه

در طی آن جداسازی یک یا چند اتمی بر پایه نسبت جرم به بار (m/z) و فراوانی یون‌ها در فاز گازی می‌باشد. در واقع این روش به بررسی نسبت جرم به بار ملکول‌ها با استفاده از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی می‌پردازد (۷). در سال‌های اخیر این ابزار برای بررسی ترکیبات باکتری‌ها و امکان افتراق آن‌ها با استفاده از تفاوت در ترکیب آنها مورد بررسی قرار گرفته است. این امکان با استفاده از کسب الگوی ترکیبات ملکولی باکتری و مقایسه آن با الگوهای کامپیوتری که از پیش تهیه شده‌اند به عنوان ابزاری که قادر به تشخیص نمونه های کلینیکی می‌باشد به دنیای علم معرفی شده است (۸). این ایده برای اولین بار توسط دکتر هولاند و همکاران ارائه شد که توانستند با استفاده از این ابزار نمونه های باکتریایی را از لحاظ کموتاکسونومی (chemotaxonomical) طبقه بندی نمایند (۸). دستگاه طیف سنجی جرمی تحت عنوان: MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight Mass spectrometry) در نمونه های باکتریایی با تجزیه ترکیبات دیواره سلولی باکتری یک انگشت نگاری ملکولی از ملکول‌های متصاعد شده از دیواره باکتری که اختصاصی آن می‌باشد ارائه می‌دهد و بر اساس این الگو می‌توان نوع و گونه باکتری مورد مطالعه را تشخیص داد (۵،۹). در این مطالعه کارآمدی این روش نوین در دو باکتری شایع بیمارستانی، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم بررسی و با روش‌های بیوشیمیایی و ملکولی مورد استفاده در تشخیص مقایسه گردیده است.

روش بررسی

در این مطالعه ۷۵ نمونه کلینیکی مشکوک به انتروکوکوس جدا شده از ادار جهت بررسی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس جهت بررسی بیوشیمیایی، ملکولی و طیف سنجی جذبی منتقل شدند. تمامی سویه‌ها از انتروکوکوس های مقاوم به ونکومايسين و حائز اهمیت کلینیکی انتخاب شدند. آزمون های بیوشیمیایی به عنوان روش مرجع براساس روشی که مونره و همکاران در سال ۱۹۹۹ ارائه نمودند اجراء شد (۱۰). نمونه‌ها پس از جداسازی و کشت در محیط آگار خون دار، تک کلونی

انتروکوکوس ها باکتری‌های گرم مثبتی هستند که به عنوان فلور نرمال در روده انسان و در محصولات لبنی و محیط اطراف حضور دارند ولی در سال‌های اخیر به عنوان یک بیماری زای مهم فرصت طلب در عفونت‌های بیمارستانی ظهور کرده‌اند (۱). این باکتری‌ها قادر به ایجاد عفونت در ارگان‌های مختلف، باکتریمی، عفونت‌های داخل شکمی، اندوکاردیت و عفونت ادراری می‌باشند (۲). انتروکوکوس فکالیس شایع‌ترین گونه انتروکوکوسی می‌باشد که مسئول بیش از ۶۰ درصد عفونت‌های انتروکوکوسی می‌باشد. در سال‌های اخیر گونه انتروکوکوس فسیوم به دلیل بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حال پیشی گرفتن از انتروکوکوس فکالیس در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است (۳،۴). روش‌های بیوشیمیایی متنوعی در یک قرن اخیر جهت شناسایی و افتراق گونه های مختلف باکتریایی معرفی شده و مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین با آشنایی دانشمندان با ابعاد ملکولی حیات باکتری‌ها، روش‌های ملکولی متعددی جهت شناسایی و مطالعه باکتری‌ها معرفی شدند. با این وجود مشکل شناسایی گونه های خاص باکتریایی همچنان پا برجاست، از آن جمله می‌توان به باکتری‌های موجود و غیر قابل کشت (Viable but non-culturable) اشاره نمود (۵،۶). در حالی که این باکتری‌ها از لحاظ تشخیص کلینیکی بسیار حائز اهمیت هستند ولی امکان تشخیص آن‌ها در بیماران، محیط یا غذا وجود ندارد. از مهم‌ترین مشکلات در تشخیص کلینیکی انواع عفونت‌های بیمارستانی قابل کشت و یا غیر قابل کشت، زمان اجرای آزمون‌های تشخیصی و همچنین بروز خطا در شناسایی می‌باشد که به واسطه عوامل متعدد محیطی و اجرائی صورت می‌پذیرد. به این دلیل توسعه روش‌هایی که در حداقل زمان و با بالاترین دقت قابلیت تشخیص و افتراق گونه های مختلف را داشته باشد ضروری می‌نماید. در طی سال‌های اخیر روش نوین مبتنی بر طیف سنجی جرمی برای تشخیص و افتراق باکتری‌ها توسعه یافته است. این روش جزء روش‌های طیف سنجی می‌باشد که

باکتری جدا شده بر روی محل اختصاصی به ابعاد ۵ میلی مترمکعب در سطح پلیت استیل قرار داده شد تا مورد تشعشع لیزر قرار داده شود. کلنی افزوده شده در ابتدا در دمای هوا خشک شد و سپس یک میلی لیتر از سیانوهیدروکسی سینامیک اسید (cyano-hydroxycinnamic acid) به آن افزوده شد. سپس در دمای هوا خشک شد تا کریستال‌ها بر سطح باکتری تشکیل شود. پس از آن در شرایط خلا با استفاده از دستگاه طیف سنجی Microflex (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) با استفاده از تشعشع لیزر مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی یونی کسب شده با استفاده از نرم افزار بیوتا پیر ۳. (Bruker Daltonics) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته و شناسائی شدند. برای هر نمونه دوبار این فرآیند تکرار شد.

یافته ها

در بررسی‌های بیوشیمیایی، ملکولی و آنالیز طیف سنجی جرمی در ۳۰ نمونه انتروکوکوس فسیوم، در ۴۲ نمونه انتروکوکوس فکالیس و در سه نمونه عفونت با هر دو باکتری انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم جدا سازی شدند.

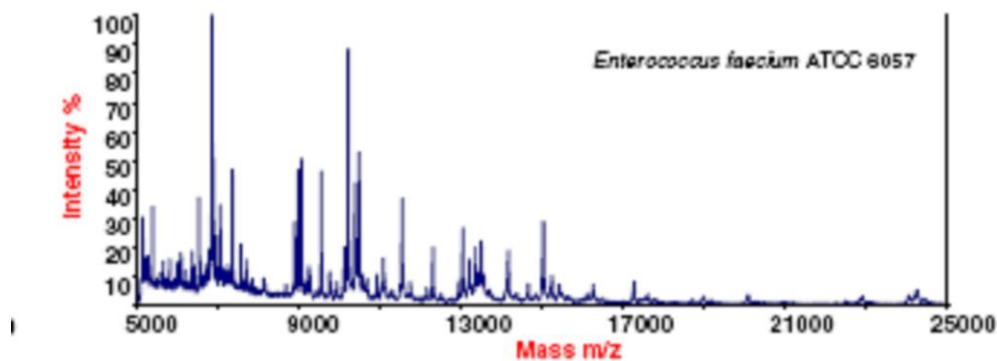
در روش‌های بیوشیمیایی دو نمونه انتروکوکوس فسیوم تست آرایینوز منفی داشتند (ولی از آنجایی که تست تلوریت و تخمیر سوربیتول منفی بودند در نهایت انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند) و در یک نمونه انتروکوکوس فکالیس تست تلوریت منفی بود (در این نمونه نیز تست سوربیتول مثبت و تخمیر ال-آرایینوز منفی بود). در بررسی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز تمامی نمونه‌ها به درستی تشخیص داده شدند ولی در دو نمونه با وجود تکرار، باندهای ضعیف انتروکوکوس فسیوم مشاهده شد. در بررسی با استفاده از طیف سنجی جرمی در تمامی نمونه‌ها تمامی آزمون‌ها و تکرارها با قابلیت افتراق بالا و به درستی شناسائی و ۳۲ نمونه انتروکوک فسیوم و ۴۴ نمونه انتروکوکوس فکالیس افتراق یافتند. در واقع میزان هم گرائی نتایج این سه آزمون در نمونه‌های بین هر سه گروه ۱۰۰ درصد بود.

آن‌ها جهت بررسی مورد استفاده قرار گرفت و بوسیله آزمون‌های بیوشیمیایی هیدرولیز اسکولین، کاتالاز، وجود پیرویدونیل آمینوپیتیداز، رشد در مجاورت ۶/۵ درصد نمک، حرکت، رشد در محیط حاوی ۰/۰۴ درصد تلوریت و تست قندهای ال-آرایینوز و سوربیتول مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). جهت استخراج DNA از روش استخراج بافتی استفاده شد. برای بررسی ملکولی از پرایمرهای اختصاصی شامل پرایمر رفت ddIF1:5"TTGAGGCAGACCAGATTGACG3 و برگشت ddIF2:5" TATGACAGCGACTCCGATTCC3" جهت شناسائی انتروکوکوس فکالیس استفاده نمودیم که محصول آزمون زنجیره ای پلیمرز به طول ۹۴۱bp می‌دهد (۱۱). جهت تشخیص انتروکوکوس فسیوم از پرایمرهای ddIF1:5"TTGAGGCAGACCAGATTGACG3 و برگشت ddIF2:5" TATGACAGCGACTCCGATTCC3" استفاده

شد که طول قطعه حاصل ۶۵۸bp بود (۱۲) واکنش زنجیره ای پلیمرز بر اساس پروتکل عمومی به شرح زیر اجرا شد: ۱۰ دقیقه فاز denaturation اولیه و سپس ۳۵ چرخه تکراری از ۱ دقیقه denaturation در دمای ۹۴°C، یک دقیقه annealing در ۵۸ درجه و یک دقیقه extension در دمای ۷۲°C، سپس یکدوره پایانی ده دقیقه ای extension در دمای ۷۲°C. نمونه‌های باکتریایی انتروکوکوس فکالیس (۲۹۲۱۲) و انتروکوکوس فسیوم (۵۱۵۵۹) به عنوان کنترل مثبت و اشریشیاکلی (۲۵۹۲۲) به عنوان کنترل منفی و تیوب بدون DNA به عنوان کنترل واکنش مورد استفاده قرار گرفتند. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگارز-Invitrogen (USA) ۱٪ الکتروفورز و بوسیله ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. تمامی آزمایش‌های بیوشیمیایی و ملکولی در گروه باکتری شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شدند و آزمون طیف سنجی جرمی در مرکز تحقیقات میکروبی شناسی بیمارستان دانشگاهی UZA در شهر آنتورپ بلژیک انجام شد. جهت طیف سنجی جرمی برای هر جدایه، یک کلونی از

جدول شماره ۱- آزمون های بیوشیمیایی مورد استفاده در این مطالعه جهت افتراق انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم

<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	آزمون بیوشیمیایی
+	+	Esculin hydrolysis
-	-	Catalase
+	+	Pyrrrolidonyl aminopeptidase
+	+	6.5% NaCl
-	-	Motility
-	+	0.04% Tellurite
+	-	L-Arabinose
-	+	Sorbitol



شکل شماره ۱- الگوی MALDI mass spectra در باکتری انتروکوکوس فاسیوم ۶۰۵۷ (الگو برگرفته از مقاله Kuehel و همکاران)

بحث و نتیجه گیری

و همکاران (۱۳) میزان هم گرایی نتایج طیف سنجی جرمی و روش های بیوشیمیایی را ۷۳ درصد شناسایی نمودند و در ۳۷ درصد نمونه ها هم گرایی بین نتایج مطالعه ژنتیک، بیوشیمی و طیف سنجی وجود نداشت. هرچند ۲۳ نمونه انتروکوکوس مورد مطالعه در این مطالعه به درستی شناسایی شده بودند ولی افتراق بین گونه ها مورد بررسی قرار نگرفته بود (۱۳). در مطالعه مذکور از نرم افزار بیوتاایپر ۲ جهت آنالیز نتایج استفاده شده بود درحالی که در این مطالعه از نرم افزار بیوتاایپر ۳ که به تازگی عرضه شده است به روز آوری شده است استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از نرم افزار بیوتاایپر ۱۰۰ درصد نمونه های کلینیکی مورد بررسی افتراق داده شد. در مطالعه ای که کاربونل در سال ۲۰۱۲ با استفاده از نرم افزار بیوتاایپر ۳ انجام داده شده است، ۴/۹۴ درصد جنس ها و ۴/۸۳ درصد از گونه باکتری ها با استفاده از طیف سنجی جرمی به درستی تعیین شدند. در این مطالعه نیز ۹ نمونه انتروکوکوس فکالیس و پنج نمونه انتروکوکوس فسیوم به درستی افتراق یافتند (۱۴). در مطالعه ای که کوهل و همکاران (۵) در سال ۲۰۱۰ انجام دادند

هدف از این مطالعه بررسی کار آبی روش نوین طیف سنجی جذبی در شناسایی دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم و همچنین مقایسه آن با روش های سنتی تر تشخیص بیوشیمیایی و روش های ملکولی بود. نتایج این پژوهش نشان می دهد این روش می تواند به عنوان یک روش بسیار قدرتمند و کارآمد در شناسایی و افتراق انواع گونه های مختلف باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد. از مهم ترین عوامل مداخل کننده در بررسی های بیوشیمیایی می توان به تفاوت های ناشی از موتاسیون و یا تغییرات بیان آنزیمی در ایجاد نتایج بیوشیمیایی اشاره نمود، همچنین عوامل مداخله کننده در نتایج روش های ملکولی می توان به تغییرات غلظت DNA و عملکرد آنزیم پلیمرازی و آلودگی نمونه ها و نتایج مثبت کاذب اشاره نمود. روش های حاضر نیازمند صرف زمان طولانی توسط کارمندان آزمایشگاهی است، در حالی که در روش طیف سنجی جذبی عواملی همچون آلودگی، موارد مثبت و منفی کاذب، زمان بری و هزینه های افزوده هر آزمایش کاهش می یابد. در مطالعات قبلی که به بررسی کار آبی این تکنیک پرداختند بلوندیاکس

نمونه‌ها و گزارش نتایج فراهم می‌گردد (۱۴). در مجموع با توجه به نتایج این بررسی روش طیف سنجی جرمی MALDI-TOF روش قابل اطمینان و دقیقی می‌باشد که در شناسایی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم قادر به تشخیص نمونه‌ها با حساسیت ۱۰۰ درصد می‌باشد و به روش‌های بیوشیمیایی و ملکولی سرعت اجرا و دقت قابل مقایسه‌ای دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به عنوان بخشی از رساله دکتری حسین صمدی کفیل اجرا و به وسیله دانشگاه تربیت مدرس تهران تأمین اعتبار گردیده است. همچنین از بنیاد ملی نخبگان به جهت تأمین بخشی از هزینه‌های مطالعه کمال تشکر را داریم. بدین وسیله از تمامی همکاران بیمارستانی و گروه باکتری شناسی پزشکی که در اجرای این پژوهش همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, et al. *Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy*. Diagn Microbiol Infect Disease. 2007; 58(1): 59–65.
2. Pillar CM, Gilmore MS. *Enterococcal virulence pathogenicity island of E. faecalis*. Front Biosci. 2004; 1(9): 2335–46.
3. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. *Virulence of enterococci*. Clin Microbiol Rev. 1994; 7(4): 462–78.
4. Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. *Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American Surveillance study (2000–2002)*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2004; 3(1): 14.
5. Kuehl B, Marten SM, Bischoff Y, Brenner-Weiss G, Obst U. *MALDI-TOF mass spectrometry–multivariate data analysis as a tool for classification of reactivation and non-culturable states of bacteria*. Anal Bioanal Chem. 2011; 401(5): 1593–1600.
6. Oliver JD. *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*. FEMS Microbiol Rev. 2010; 34(4): 415–425.
7. Todd JFJ. *Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology)*. (Recommendations 1991). Pure Appl Chem. 1991; 63(10): 1541-1566.

توانایی روش طیف سنجی جرمی در تشخیص باکتری‌های غیر قابل کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از انتروکوکوس فکالیس به عنوان یک مدل غیر قابل کشت استفاده شد. این روش براساس الگوهای نرم افزاری از قبل داده شده باکتری را شناسایی نمود (۵). مزایای اصلی روش طیف سنجی جرمی در واقع کوتاه بودن فرایند تیمار و آماده سازی نمونه، کم بودن هزینه‌های اجرا و عدم نیاز به فرآیند طولانی در تشخیص است، به نحوی که در زمانی کوتاه تر از پنج دقیقه نتایج بررسی را ارائه می‌دهد. این روش در مقایسه با زمان بری و نیاز به تخصص در روش‌های ملکولی دارای مزایای بیشتری می‌باشد. همچنین در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی از نظر هزینه و زمان قابل رقابت بوده و نتایج دقیق‌تر نیز به دست می‌آید. در صورتی که بتوان تشخیص طیف سنجی جرمی را با استفاده از نمونه مستقیم کلینیکی انجام داد تنها مشکل این تکنیک که نیاز به کشت خالص شده می‌باشد حل شده و امکان تشخیص سریع

8. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. *Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996; 10(10): 1227–1232.

9. Fenselau C, Demirev PA. *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev. 2001; 20(4): 157–171.

10. Manero A, Blanch AR. *Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(10): 4425–4430.

11. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. *Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci*. J Clin Microbiol. 2000; 38(8): 3092-3095.

12. Cheng S, McCleskey FK, Gress MJ, Petroziello JM, Liu R, Namdari H, et al. *A PCR assay for identification of Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 1997; 35(5): 1248-50.

13. Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. *MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: Evaluation in a teaching hospital*. Pathologie Biologie. 2010; 58(1): 55–57.

14. Carbonnelle E, Grohs P, Jacquier H, Day N, Tenza S, Dewailly A, et al. *Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification*. J Microbiol Methods. 2012; 89(2): 133-6.

15. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero- Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct *identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization—time-of-flight mass spectrometry*. J Clin Microbiol. 2010; 48(6):2110–2115

16. 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 (1):104–109.

17. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. *MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology*. Future Microbiol. 2010; 5(11):1733–1754.

18. Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB. *Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant Staphylococcus aureus: media effects and inter-laboratory reproducibility*. J Microbiol Methods. 2002; 48(2–3):117–126.

Archive of SID