Comparing MALDI-TOF Mass Spectrometry with Molecular and Biochemical Methods in Identifying Enterococcus Faecium and Enterococcus Faecalis Isolated from Clinical

Samadi Kafil,H.
PhD student of Bacteriology,Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat modares University

Mohebati Mobarez,A.(PhD)
Associat Professor of Bacteriology.Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat modares University

Forouzandeh Moghadam,M.(PhD)
Associat Professor of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding author: Mohebati Mobarez,A

Email:
mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 19 Dec 2012
Revised: 14 Jun 2013
Accepted: 14 Jun 2013

Abstract

Background and Objective: Enterococci are Gram-positive members of human gastrointestinal flora, in Dairy products and environment. they have emerged as important causes of opportunistic nosocomial infections in recent years. In this study we aimed to investigat and compare the efficiency of MALDI-TOF mass spectroscopy method through Biochemical and Molecular methods for detecting *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.

Materials and Methods: seventhy five clinical samples were collected for biochemical, molecular and mass spectroscopy investigations. Samples were treated with Esculin hydrolysis, Catalase, Pyrrolidonyl aminopeptidase, 6.5% NaCl solution, motility, 0.04% Tellurite, L-Arabinose and Sorbitol. Using specific primes allele specific PCR was used.The samples were then analyzed by MALDI-TOF mass spectroscopy and Biotyper 3 software.

Results: *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* were detected in thirty and forty two samples, respectively whereas three samples showed both bacterial infections. Using biochemical analysis, two *E. faecium* isolates were Arabinose negative and one *E. faecalis* isolates was Telliurite negative. All samples were showed correct bands in PCR results but two of them didn't show clear bands(on agarose gel). In mass spectroscopy analysis all strains were correctly detected and well defined.

Conclusion: According to our results, MALDI-TOF mass spectrometry in comparison with Molecular and Biochemical Methods could be a reliable and accurate method that can easily and quickly identify and differentiate *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in clinical samples.

Key words: *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium,* MALDI-TOF mass spectrometry, PCR

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

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

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 باکتری‌های گرم مثبتی هستند که به عنوان فلور نرمال در روده انسان، محصولات لبنی و محیط اطراف حضور دارند ولی در سال‌های اخیر به عنوان یک بیماریزای مهم فرصت طلب در عفونت‌های بیمارستانی ظهور کرده‌اند. 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 روش‌های 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 آزمون‌های بیوشیمیایی هیدرولیز اسکولین، کاتالاز، وجود پیرولیدونیل آمینوپپتیداز، رشد در مجاورت ۶/۵٪ نمک، حرکت، رشد در محیط حاوی ۰/۰۴٪ تلوریت، و تست قندهای ال-آرابینوز و سوربیتول مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد بررسی و با استفاده از دستگاه طیف سنجی جرمی و نرم افزار بیوتایپر 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 روش‌های 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 پلیمراز تمامی نمونه‌ها 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 نمونه‌ها تمامی آزمون‌ها 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 می‌باشد که در شناسائی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم قادر به تشخیص با حساسیت ۱۰۰٪ می‌باشد و با روش‌های بیوشیمیایی و ملکولی از نظر سرعت اجرا و دقت قابل مقایسه می باشد.*

واژه های کلیدی: *انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فسیوم، طیف سنجی جرمی، واکنش زنجیره ای پلیمراز*

آدرس مقاله:
صمدی کفیل ح، محبتی مبارز ا، فروزنده مقدم م "مقایسه روش طیف سنجی جرمی MALDI-Tof با روش های ملکولی و بیوشیمیایی در شناسایی انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس جداشده از نمونه های بیمارستانی". مجله علوم آزمایشگاهی، ۱۳۹۲ دوره هفتم(شماره ۱):۶-۱

مقدمه

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 ٪ 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 (۴و۳). روش‌های بیوشیمیایی متنوعی در یک قرن اخیر جهت شناسائی 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 شناسائی و مطالعه باکتری‌ها معرفی شدند. با این وجود مشکل شناسائی گونه های خاص باکتریایی همچنان پا برجاست، از آن جمله می‌توان به باکتری‌های موجود و غیر قابل کشت (Viable butnon-culturable) اشاره نمود (۶و۵). در حالی که این باکتری‌ها از لحاظ تشخیص کلینیکی بسیار حائز اهمیت هستند ولی امکان تشخیص آن‌ها در بیماران، محیط و 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 شناسائی 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 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: MALTI-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(۹و۵). 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 ادرار 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 ونکومایسین 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 وکشت در محیط آگار خون دار، تک کلونی

آن‌ها جهت بررسی مورد استفاده قرار گرفت و بوسیله آزمون‌های‌بیوشیمیایی هیدرولیز اسکولین، کاتالاز، وجودپیرولیدونیل آمینوپپتیداز، رشد در مجاورت ۶/۵٪ نمک، حرکت، رشد در محیط حاوی ۰/۰۴٪ تلوریت و تست قندهای ال-آرابینوز و سوربیتول مورد بررسی قرار گرفتند (جدول۱). جهت استخراج DNA از روش استخراج بافتی استفاده شد. برای بررسی ملکولی از پرایمرهای اختصاصی شامل پرایمر رفت ddlF1:5"TTGAGGCAGACCAGATTGACG و برگشت ddlF2:5" TATGACAGCGACTCCGATTCC3" جهت شناسائی انتروکوکوس فکالیس استفاده نمودیم که محصول آزمون‌زنجیره ای پلیمراز به طول ۹۴۱bp می‌دهد(۱۱). جهت تشخیص انتروکوکوسفسیوم از پرایمر های رفت ddlF1:5"TTGAGGCAGACCAGATTGACG و برگشت ddlF2:5" TATGACAGCGACTCCGATTCC3" استفاده شد که طول قطعه حاصل ۶۵۸bp بود(۱۲). واکنش زنجیره ای پلیمراز براساس پروتکل عمومی به شرح زیر اجرا شد :۱۰دقیقه 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 .نمونه های باکتریایی انتروکوکوس فکالیس (۲۹۲۱۲) و انتروکوکوس فسیوم (۵۱۵۵۹) به‌عنوان‌کنترل‌مثبت‌واشریشیاکلی (۲۵۹۲۲) به عنوان کنترل منفی و تیوب بدونDNA به عنوان کنترل واکنش مورد استفاده قرار گرفتند. محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز -Invitrogen) (USA ۱٪ الکتروفورز و بوسیله ۰/۵میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. تمامی آزمایش های بیوشیمیایی و ملکولی در گروه باکتری شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شدند و آزمون طیف سنجی جرمی در مرکز تحقیقات میکروب شناسی بیمارستان دانشگاهی UZA درشهرآنتورپ‌بلژیک‌انجام‌شد. جهت طیف سنجی جرمی برای هر جدایه ، یک کلونی از باکتری جداشده 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 بیوتایپر۳. (Bruker Daltonics) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته و شناسائی شدند. برای هر نمونه دوبار این فرآیند تکرار شد.

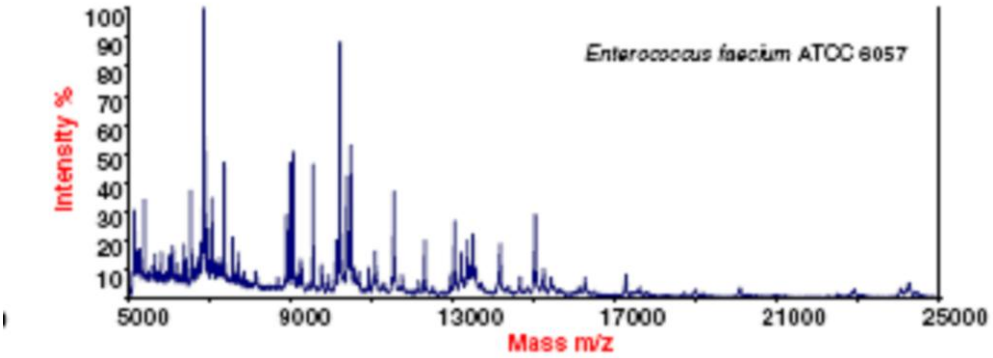
یافته ها

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

در روش‌های بیوشیمیایی دو نمونه انتروکوکوس فسیوم تست آرابینوز 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-آرابینوز منفی بود). در بررسی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 نمونه های بین هر سه گروه ۱۰۰٪ بود.

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

Enterococcus faecium	*Enterococcus faecalis*	آزمون بیوشیمیایی
+	+	Esculin hydrolysis
-	-	Catalase
+	+	Pyrrolidonyl aminopeptidase
+	+	6.5% NaCl
-	-	Motility
-	+	0.04% Tellurite
+	-	L-Arabinose
-	+	**Sorbitol**



شکل شماره ۱- الگوی MALDI mass spectra در باکتری انتروکوکوس فاسیوم ٦٠٥٧(الگو برگرفته از مقاله Kuehel و همکاران)

بحث و نتیجه گیری

هدف از این مطالعه بررسی کار آیی روش نوین طیف سنجی جذبی در شناسائی دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم و همچنین مقایسه آن با روش‌های سنتی‌تر تشخیص بیوشیمیایی و روش‌های ملکولی بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد این روش می‌تواند به عنوان یک روش بسیار قدرتمند و کارآمد در شناسائی و افتراق انواع گونه های مختلف باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد. از مهم‌ترین عوامل مداخل کننده در بررسی‌های بیوشیمیایی می‌توان به تفاوت‌های ناشی از موتاسیون و یا تغییرات بیان آنزیمی در ایجاد نتایج بیوشیمیایی اشاره نمود، همچنین عوامل مداخله کننده در نتایج روش‌های ملکولی می‌توان به تغییرات غلظت DNA و عملکرد آنزیم پلیمرازی و آلودگی نمونه‌ها و نتایج مثبت کاذب اشاره نمود. روش‌های 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 آیی این تکنیک پرداختند بلوندیاکس و همکاران (۱۳) میزان هم گرایی نتایج طیف سنجی جرمی و روش‌های بیوشیمیایی را ۷۳٪ شناسائی نمودند و در ۳۷٪ نمونه‌ها هم گرایی بین نتایج مطالعه ژنتیک، بیوشیمی و طیف سنجی وجود نداشت. هرچند ۲۳ نمونه انتروکوکوس مورد مطالعه در این مطالعه به درستی شناسائی شده بودند ولی افتراق بین گونه‌ها مورد بررسی قرار نگرفته بود (۱۳). در مطالعه مذکور از نرم افزار بیوتایپر ۲ جهت آنالیز نتایج استفاده شده بود درحالی‌که در این مطالعه از نرم افزار بیوتایپر ۳ که به تازگی عرضه شده است به روز آوری شده است استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از نرم افزار بیوتایپر ۱۰۰٪ نمونه های کلینیکی مورد بررسی افتراق داده شد. در مطالعه ای که کاربونل در سال ۲۰۱۲ با استفاده از نرم افزار بیوتایپر۳ انجام داده شده است، ۴/۹۴٪ جنس‌ها و ۴/۸۳٪ از گونه باکتری‌ها 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 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 شناسائی نمود(۵). مزایای اصلی روش طیف سنجی جرمی در واقع کوتاه بودن فرایند تیمار و آماده سازی نمونه، کم بودن هزینه های 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 می آید. 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 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 شناسائی انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم قادر به تشخیص نمونه ها با حساسیت ۱۰۰٪ می‌باشد و به روش‌های بیوشیمیایی و ملکولی سرعت اجرا و دقت قابل مقایسه ای 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 تامین بخشی از هزینه های 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 می نماییم.

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.

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.