



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias

Álvaro Pascual Hernández^{a,b,*}, Mónica Ballester-Téllez^a, Fátima Galán-Sánchez^{c,d} y Manuel Rodríguez Iglesias^{c,d}

^aUnidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Virgen Macarena-Virgen del Rocío, Sevilla, España

^bDepartamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^cUnidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospitales Universitarios Puerta del Mar y Puerto Real, Cádiz, España

^dDepartamento de Microbiología, Universidad de Cádiz, Cádiz, España

RESUMEN

Palabras clave:

Espectrometría de masas
Identificación
MALDI-TOF
Grampositivos
Gramnegativos

Una identificación correcta y rápida de las bacterias es esencial para un diagnóstico y un tratamiento adecuado de los pacientes con infecciones. Hasta hace pocos años se utilizaban pruebas bioquímicas, colorimétricas o incluso de sensibilidad antibiótica para la identificación a niveles de género y especie. Las principales limitaciones de estos métodos son el tiempo necesario para su realización y la dificultad para diferenciar microorganismos poco reactivos, muy parecidos entre ellos o de difícil crecimiento. Desde la introducción en el laboratorio de la espectrometría de masas (EM) con el uso de MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*), muchos de estos problemas se han solventado. Para poder sacar el máximo rendimiento a esta tecnología se han de conocer sus puntos fuertes y sus limitaciones. No todos los microorganismos se identifican con la misma facilidad o fiabilidad mediante MALDI-TOF y es obligación del microbiólogo saber cómo interpretar los resultados que de este se obtienen y las alternativas disponibles para lograr identificar los microorganismos que generan más problemas. Este trabajo pretende hacer una recopilación de la información disponible sobre la correcta identificación de las principales bacterias patógenas humanas mediante el uso de la EM MALDI-TOF, centrándose en gramnegativos, grampositivos y microorganismos anaerobios. Las condiciones del cultivo, la preparación de la extensión con el método de extracción idóneo y, sobre todo, el uso de una correcta y actualizada base de datos son los principales factores que hay que tener en cuenta para la identificación fiable de cualquier bacteria.

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

Application of mass spectrometry to bacterial identification

ABSTRACT

Keywords:

Mass spectrometry
Identification
MALDI-TOF
Gram-positive
Gram-negative

Correct and rapid identification of bacteria is essential for the correct diagnosis and treatment of infected patients. Until a few years ago, biochemical, colorimetric or even antibiotic sensitivity tests were used to identify genera and species. The main limitations of these methods were the time needed for their performance and the difficulty of distinguishing between microorganisms that were little reactive, highly similar, or difficult to culture. Many of these problems have been solved by the introduction of mass spectrometry (MS) in the laboratory with the use of MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*). Knowledge of the strengths and weaknesses of this technology is essential to be able to take maximum advantage of this technique. Not all microorganisms can be identified with the same ease and reliability by MALDI-TOF and microbiologists need to know how to interpret the results obtained with this technique and the available alternatives in order to identify the microorganisms causing the most problems. This article aims to summarise the available information on the correct identification of the main human pathogenic bacteria through the use of MALDI-TOF MS, focusing on Gram-negative, Gram-positive and anaerobic microorganisms. The main factors that must be taken into account for the reliable identification of any bacterium are the conditions for culture, sample preparation with the ideal extraction method and especially the use of a correct and updated database.

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

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: apascual@us.es (A. Pascual Hernández).

Bacilos gramnegativos: introducción

Los bacilos gramnegativos (BGN) pueden encontrarse en prácticamente la totalidad de las muestras que se reciben en el laboratorio de microbiología clínica ya que forman parte de la flora normal de los seres humanos y son causantes de numerosas infecciones. Clásicamente eran identificados mediante pruebas bioquímicas basadas en características típicas de cada género y especie como su morfología, el crecimiento selectivo según el medio de cultivo, la composición de su pared o la utilización de rutas metabólicas y sustratos. Mediante el uso de la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) se identifican directamente desde una colonia en placa o incluso, en algunos casos, directamente desde la muestra. Por sus características, la pared de los BGN es fácilmente desintegrada mediante el láser del espectrómetro de masas y las proteínas contenidas en estas bacterias quedan liberadas con mayor facilidad que en otro tipo de bacterias con paredes más gruesas o complejas, permitiendo una identificación más fiable.

Preparación de la muestra para la identificación de bacilos gramnegativos

A pesar de que la identificación de la mayoría de los BGN no suele suponer un problema siguiendo los protocolos que facilitan los fabricantes, hay ciertos aspectos en la preparación de la muestra que pueden interferir en la fiabilidad de esta. Se han evaluado diferentes variables en la preparación de las colonias bacterianas (la densidad de la extensión del microorganismo, el uso de ácido fórmico previo a la dispensación de la matriz, la temperatura de incubación del cultivo o el tipo de medio de cultivo utilizado), llegando a la conclusión de que tanto la temperatura como el medio de cultivo empleado no afectan a la calidad de la identificación¹.

Enterobacterias

Ya en 1999 Lynn et al² utilizaron la EM para poder diferenciar *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* y *Providencia rettgeri* tras un ciclo de congelación a -20°C . Estos autores lograron obtener espectros específicos para el género *Enterobacteriaceae*, específicos de especie para los 2 serovares de *Salmonella* y específicos de cepa para los *E. coli* estudiados.

Una de las limitaciones más conocidas del uso de MALDI-TOF con las bases de datos comerciales disponibles hasta la fecha es la imposibilidad de diferenciar de manera correcta entre *E. coli* y *Shigella* spp. En 2010 se evaluó la eficacia de MALDI-TOF para la identificación de 304 colonias de aislados de heces y se llegó a la conclusión de que el sistema Biotyper 2.0 identifica de manera correcta los enteropatógenos más comunes, pero falla a la hora de diferenciar entre 36 aislados de *Shigella* spp. y 3 *E. coli* enterohemorrágicos³. Otros estudios corroboran esta limitación recomendando el uso de pruebas complementarias para una adecuada diferenciación de estas especies^{4,5}.

K. pneumoniae no presenta habitualmente problemas para su identificación mediante MALDI-TOF. Incluso en estudios donde se realizan las identificaciones de los microorganismos causantes de bacteriemia directamente desde frascos de hemocultivos positivos se consigue una tasa de identificación correcta en esta especie próxima al 90%. *K. oxytoca* es un patógeno habitualmente nosocomial, íntimamente relacionado con *K. pneumoniae*, que se distingue fenotípicamente de este por ser indol positivo. Los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* son genéticamente muy parecidos. En un estudio para verificar la identificación de *K. oxytoca* obtenida por MALDI-TOF (base de datos Bruker Biotyper 3.0) se analizaron 99 supuestas *K. oxytoca* de las que 8 fueron identificadas como *Raoultella*. Al realizar la secuenciación genómica del ARNr 16S de estas 8 discordantes, 5 fueron realmente *Raoultella* mientras que las otras 3 fueron *K. oxytoca*. En este

mismo estudio también se apuntó la importancia de verificar la diferencia entre las puntuaciones de las identificaciones (*score*) que genera MALDI-TOF. Para poder distinguir entre especies muy parecidas se recomienda una diferencia entre la mejor puntuación y la segunda de como mínimo el 10%. Aplicando esta regla, aumentaría considerablemente la discriminación entre *Raoultella* y *K. oxytoca*⁷.

Las especies del complejo *Enterobacter cloacae* se encuentran en el medio ambiente, aunque también pueden actuar como patógenos humanos. Estudios bioquímicos y moleculares han demostrado su heterogeneidad genómica, por lo que se divide en 6 especies diferentes: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis*. *E. cloacae* y *E. hormaechei* son las más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. La diferenciación fenotípica de los miembros del complejo es muy complicada, por lo que para ello suelen usarse técnicas moleculares⁸. Pavlovic et al⁹ evalúan la capacidad de MALDI-TOF para generar identificaciones a nivel de especie de miembros del complejo *E. cloacae* junto con el uso de una PCR (*polymerase chain reaction*) multiplex casera. Mientras que la PCR no tiene ningún problema para la identificación, la técnica MALDI-TOF resultó no ser capaz de diferenciar *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* y *E. ludwigii* de *E. cloacae*. Sería necesario mejorar las bases de datos de MALDI-TOF para llegar a diferenciar los miembros del complejo *E. cloacae* de manera inequívoca y sin necesidad de pruebas moleculares confirmatorias.

Cronobacter spp. está muy estrechamente relacionado con el género *Enterobacter* y hasta hace pocos años se denominaba *Enterobacter sakazakii*. En la base de datos Biotyper de Bruker actual solamente se encuentran espectros para la especie *Cronobacter sakazakii*. La secuenciación del ARN 16S tampoco es útil para diferenciar todas las especies de este género, especialmente entre *C. sakazakii* y *C. amalonaticus*, y en las bases de datos de las pruebas bioquímicas como API 20E y API ID32E encontramos aún *Enterobacter sakazakii*. Para la identificación a nivel de género y especie se recomienda la secuenciación del gen *fusA* y MLST (*multilocus sequence typing*)^{10,11}.

En un estudio de 2013 en el que se evaluaron un total de 965 aislados de enterobacterias de 17 géneros y 40 especies diferentes se consiguieron mediante espectrometría de masas unos porcentajes de identificación del 96,7 y el 83,8%, respectivamente. Analizando los resultados pormenorizadamente, se identificó correctamente a nivel de especie el 100% de los siguientes aislados: *Serratia marcescens* (57), *Morganella morganii* (52), *E. aerogenes* (52), *E. gergoviae* (10), *Serratia odorifera* (30), *Providencia stuartii* (31), *Citrobacter koseri* (31), *Ewingella americana* (6), *K. oxytoca* (49), *K. pneumoniae* (58), *Yersinia enterocolitica* (14) y *Y. pseudotuberculosis*. Cinco microorganismos tuvieron una identificación correcta de especie en, como mínimo, un 90% de los aislados: *Citrobacter amalonaticus*, *Leclercia adecarboxylata*, *Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *Salmonella enterica* y *Serratia liquefaciens*. Los fallos más frecuentes en la identificación a nivel de género se encuentran en *Pantoea agglomerans* ya que el 13,6% se identifica como especies del género *Enterobacter*. En cambio, a nivel de especie, encuentran mayor problema en el género *Citrobacter*, por lo que proponen el término "complejo *Citrobacter freundii*" para *C. freundii*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii* y *C. sedlakii*. *C. koseri* y *C. amalonaticus* sí presentan una correcta identificación de género y especie¹².

Salmonella es un microorganismo relacionado con toxoinfección alimentaria que produce patología gastrointestinal. Para su identificación de forma clásica se necesita un cultivo de heces sembrado en diferentes medios y una sucesión de subcultivos en medios selectivos, pruebas bioquímicas y tests serológicos para la identificación de serotipos. Todo esto puede llegar a retrasar el diagnóstico de 2 a 3 días. Con la incorporación de MALDI-TOF al laboratorio de microbiología clínica se esperaba poder tener toda esta información en el mismo día que se observaran las colonias, por lo que rápidamente empezaron a aparecer publicaciones que sugerían su uso para determinar la especie y la tipificación de subespecies. Hay varios trabajos que intentan encontrar puros consenso en los espectros que

permitan diferenciar serovares de *Salmonella* pero no es un proceso sencillo y presenta problemas a la hora de reproducirse en otros laboratorios^{2,3,14}. En un estudio más reciente de Kuhns et al¹⁵ se evaluó la posibilidad de discriminar entre *S. enterica* serovar *typhi* de otros serovares mediante el uso de MALDI-TOF con la base de datos de Bruker Biotyper 3.0. Estos autores concluyen que no existe ningún problema para diferenciar *Salmonella* del resto de enterobacterias y que, además, *S. enterica* serovar *typhi* presenta espectros específicos que permiten diferenciar este serovar de otros. En resumen, MALDI-TOF es útil para la identificación de *Salmonella* spp. Como herramienta para la distinción de subespecies y tipado de serovares, MALDI-TOF puede llegar a ser una herramienta muy útil pero aún son necesarios más estudios que hagan los protocolos más asumibles por la rutina de trabajo y sean tan fiables como los métodos convencionales.

Las especies patógenas del género *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* y *Y. pestis*), son agentes zoonóticos infrecuentes en muestras clínicas. Las infecciones por *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* ocurren tras la ingestión de comida o agua contaminada y causan clínica gastrointestinal. *Y. pestis* es el agente causal de la peste. Es muy importante la distinción de las especies ya que, además de tener cuadros clínicos muy diferentes, la enfermedad causada por *Y. pestis* es de declaración obligatoria.

En 2010, Lasch et al¹⁶ desarrollan una base de datos propia centrada en *Enterobacteriaceae* y, sobre todo, en el género *Yersinia*. Debido a la peligrosidad de los aislados, se hace un pretratamiento de las extensiones con ácido trifluoroacético antes de realizar la identificación. Los autores encuentran picos en el espectro que pueden utilizarse como biomarcadores de enterobacterias junto con otros género y especie específicos de *Yersinia* spp. Ayyadurai et al¹⁷ también investigan el uso de MALDI-TOF de Bruker con Biotyper 2.0 para identificar *Yersinia* spp. mediante la creación de una base de datos propia con una colección de 39 cepas y llegan a la conclusión de que sí es capaz de diferenciar *Y. pestis* de *Y. enterocolitica*, además de distinguir biotipos de *Y. pestis*. Por todo eso podemos concluir que la EM nos permite identificar de forma correcta entre especies de *Yersinia* además de poder darnos información sobre los biotipos de *Y. pestis* siempre que contemos con la base de datos adecuada.

La única especie del género *Plesiomonas* es *P. shigelloides*. Es un patógeno emergente causante de diarrea del viajero y raramente produce infección extraintestinal. Hasta la introducción de la EM, se identificaba mediante pruebas bioquímicas. Hoy en día, puede utilizarse MALDI-TOF, sobre todo si se complementa la base de datos disponible¹⁸.

Aeromonas spp., Vibrio y géneros relacionados

Para estudiar la utilidad de la EM MALDI-TOF para la identificación de *Aeromonas* spp., Lamy et al¹⁹ analizan un total de 171 cepas de diferentes orígenes y lo comparan con el resultado obtenido de la secuenciación del gen *rpoB*. Obtienen una concordancia a nivel de género del 100% y de especie del 90,6% (29 de 32) para cepas de referencia y del 91,4% (127 de 139) para cepas clínicas y ambientales. Estos autores concluyen que esta tecnología es uno de los métodos más fiables para la identificación de estos microorganismos, aunque hacen hincapié en la importancia de tener una base de datos completa.

En un estudio más reciente en el que se evalúa la influencia de una correcta identificación a nivel de género de *Aeromonas* spp. para poder dar una correcta información de sensibilidad antibiótica, de las 22 cepas estudiadas (5 *A. caviae*, 9 *A. hydrophyla*, 8 *A. veronii*) el 100% de las identificaciones conseguidas mediante MALDI-TOF se correlaciona con los resultados de la secuenciación del gen *rpoB*²⁰.

Vibrio cholerae y otras especies de *Vibrio* (especialmente *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* y *V. alginolyticus*) han demostrado ser causantes de gastroenteritis, infección de tejidos blandos y septicemia, entre otras infecciones. Dado el potencial de *V. cholerae*

para producir brotes, es crucial su correcta identificación en el laboratorio. Tradicionalmente se hacía con métodos fenotípicos, pero son muchos los autores que han intentado identificarlo mediante el uso de MALDI-TOF. En un estudio en el que se examinan 56 aislados de hemocultivos pertenecientes a la especie *Vibrio* (confirmado por secuenciación del ARN 16S y el gen *rpoB*) se identifican correctamente todos los aislados de *V. vulnificus* (20), *V. parahaemolyticus* (20) y *V. fluvialis* (1), pero ningún *V. cholerae* (30) se llega a identificar a nivel de especie hasta que no se crea una base de datos propia específica para esta²¹. En un trabajo sobre 30 aislados de aguas residuales de Marruecos también se demuestra la utilidad de MALDI-TOF para la identificación y diferenciación de las especies de *Vibrio* spp. ambientales²².

Bacterias gramnegativas no fermentadoras

La EM es una tecnología prometedora para la identificación correcta de BGN no fermentadores (BGN-NF). Hay trabajos que logran una identificación correcta del 80,4% a nivel de especie y del 92,3% a nivel de género y que solo muestran dificultades con los microorganismos que están infrarrepresentados en las bases de datos utilizadas²³.

Fernández-Olmos et al²⁴ analizan el uso de esta tecnología para la identificación de BGN-NF en muestras de pacientes con fibrosis quística. El estudio se llevó a cabo en 182 aislados mediante transferencia de la colonia directamente a la placa de MALDI-TOF y el uso del sistema Bruker Biotyper 2.0. Al analizar los resultados, concluyen que la espectrometría es significativamente mejor para identificar los aislados que los métodos fenotípicos. MALDI-TOF discrimina más eficientemente los miembros de los géneros *Achromobacter* y *Pandoraea*, además de diferenciar mejor los miembros de la especie *Burkholderia cepacia* complex, pero no logró identificar el género *Ralstonia*, *Bordetella petrii*, *Chryseobacterium* (actualmente denominado *Elizabethkingia*) ni *Sphingobacterium spiritivorum* ya que la base de datos no contenía espectros adecuados para ello.

En otro estudio, Abdul Wahab et al²⁵ identificaron 123 aislados de 50 pacientes con fibrosis quística mediante métodos fenotípicos y MALDI-TOF y resolvieron las discrepancias por secuenciación del ARN 16S. MALDI-TOF identificó 122 de 123 aislados a nivel de género y 118 de 123 a nivel de especie. Además, mostró un 100% de correlación a nivel de especie con los métodos fenotípicos para la identificación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* y otros microorganismos menos comunes como *Chryseobacterium gleum* y *E. cloacae*.

En 2012 se publicó un artículo en el que se comparaban 2 sistemas de EM (Bruker Biotyper y VITEK MS) para la identificación de BGN-NF procedentes de pacientes con fibrosis quística. La concordancia combinada a nivel de especie/complejo/género fue mayor para Bruker Biotyper (97%) que para VITEK MS (89,5%) aunque el primero necesitó en más ocasiones un paso extra de extracción en el procesamiento de la colonia²⁶.

La principal ventaja del uso de la EM MALDI-TOF es que proporciona una rápida y fiable identificación de los BGN-NF más comunes en fibrosis quística. Aun así, esta tecnología no es perfecta con microorganismos poco habituales, de los que se dispone de pocos espectros patrón o de aquellos genéticamente muy parecidos. Estos problemas se pueden solventar añadiendo los espectros que faltan o creando nuevas bases de datos.

El género *Pseudomonas* spp. es complejo y comprende un número elevado de especies que difieren en su significación clínica. Actualmente su identificación en muchos hospitales europeos se realiza directamente con MALDI-TOF, pero en aquellos más pequeños o en los que no disponen de esta tecnología se siguen usando los métodos clásicos de identificación. En un estudio hecho en 2011 se analiza un total de 133 cepas del género *Pseudomonas*. Se comparan los resultados con los obtenidos por MLST y afirman que MALDI-TOF es un

buen método para identificar esta especie hasta el nivel de grupo y subgrupo. Los autores concluyen que el uso de MLST es necesario para el análisis filogenético más exhaustivo pero que MALDI-TOF proporciona una rápida y fiable identificación que permite diferenciar entre especies ambientales y clínicas, siempre que la base de datos de estas esté actualizada y completa²⁷.

Por otra parte, la identificación de las especies de *Acinetobacter* basada en las diferencias en sus propiedades bioquímicas es problemática. La mayoría de los sistemas contienen un número pequeño de especies clínicamente relevantes en sus matrices de identificación y muchas veces son necesarias otras técnicas, como por ejemplo la capacidad de crecer a 44 °C. La manera más fiable de identificar estos microorganismos es utilizando métodos genotípicos, como la secuenciación del ARNr 16S, del espaciador ARNr 16S-23S o de la subunidad b de la ARN polimerasa (*rpoB*).

El uso de MALDI-TOF para la identificación de las especies de *Acinetobacter*, especialmente de aquellas causantes de brotes nosocomiales, es un tema complejo que muchos autores han tratado de dilucidar. Kishii et al²⁸ realizaron un estudio en el que identificaron un total de 128 cepas de *Acinetobacter* spp., procedentes de hemocultivos, y lo compararon con el resultado de la secuenciación del gen *rpoB*. Sin ninguna modificación de la base de datos Biotyper 3.0, solo se consiguió identificar a nivel de especie 89 de 123 aislados y la mayoría de las discrepancias fueron consecuencia de los cambios más frecuentes en la taxonomía o de la falta de patrones. Posteriormente realizaron una actualización de su base de datos con la incorporación de 16 espectros de cepas de referencia y consiguieron mejorar los porcentajes de identificación del 74,8 al 82,4%. Estos autores concluyeron que MALDI-TOF no era eficiente para identificar *Acinetobacter* a nivel de especie y sugirieron la ampliación de la base de datos para incluir otras especies que no fueran *Acinetobacter baumannii* para que pudiera llegar a ser una herramienta útil en la identificación de todas las especies de *Acinetobacter* nosocomiales. En otro estudio más reciente se obtienen mejores resultados en identificación utilizando también el espectrómetro de masas de Bruker (98,6% *A. baumannii*, 72,4% *A. nosocomialis* y 97,6% *A. pittii*), siendo de manera general para el complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* del 85,3%. Estos autores también recomiendan la ampliación de la base de datos disponible con más espectros de *A. nosocomialis* y de especies de *Acinetobacter* relacionadas con la geno especie 13TU²⁹.

MALDI-TOF es una buena herramienta con *S. maltophilia*. Como en la mayoría de los BGN-NF, la dificultad para esta técnica consiste en tener la base de datos actualizada a los cambios en taxonomía y tener el número suficiente de espectros, incluyendo las cepas ambientales. Vasileuskaya-Schulz et al³⁰ analizan 21 cepas pertenecientes a este género mediante MALDI-TOF (Bruker) y secuenciación multilocus (MLSA, *multilocus sequence analysis*). Los resultados demuestran una concordancia de la identificación total entre las 2 técnicas tanto a nivel intraespecie como interespecie.

El complejo *B. cepacia* está compuesto por BGN-NF de origen ambiental que pueden causar infecciones oportunistas graves, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos o con fibrosis quística³¹. La identificación precoz de estos microorganismos es importante ya que la infección por *B. cepacia* complex se ha asociado con aumento de la morbimortalidad y un mayor índice de mortalidad en pacientes con fibrosis quística colonizados sometidos a trasplante de pulmón^{32,33}. En el estudio realizado por Fehlberg et al³⁴ se analiza la capacidad de MALDI-TOF (Biotyper 3.0) para identificar las especies del complejo *B. cepacia* comparándolo con los resultados de secuenciación del gen *recA*. El 100% de los aislados se identificó correctamente a nivel de género, pero el 23,1% falló a nivel de especie. Las más problemáticas fueron *Burkholderia contaminans* (el 100% no se identificó ya que en esa base de datos no se incluyen perfiles de esta especie) y *B. cepacia* (33,3%). Estos autores concluyen que la utilización de MALDI-TOF para la identificación de las especies del complejo *B. cepacia* es una técnica rápida y fiable.

Actualmente no existen referencias sobre la validez de la identificación de *Moraxella* spp. mediante MALDI-TOF usando las bases de datos disponibles en los laboratorios de microbiología clínica³⁵. Tampoco hay suficiente evidencia científica para evaluar la fiabilidad de otros BGN-NF como *Cupriavidus*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, *Acidovorax* o *Chryseobacterium*.

***Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp.**

El género *Neisseria* incluye 2 patógenos humanos *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. En un estudio en el que se intentó identificar mediante el software Biotyper estas 2 especies y diferenciarlas de otras especies de *Neisseria* no patógenas se obtuvieron muy buenos resultados. El 100% de las cepas se identificaron correctamente y se incluyeron 57 cepas de *Neisseria* spp., 29 de *N. meningitidis* y 13 de *N. gonorrhoeae*³⁶. Resultados muy parecidos se obtuvieron en otro estudio más reciente realizado en Italia sobre 93 cepas de *N. gonorrhoeae*, en el que se consiguió identificar correctamente 92 de ellas³⁷.

El aislamiento de *Haemophilus* spp. en cultivo suele ser complicado, ya que son nutricionalmente exigentes. *H. influenzae* es un patógeno muy relevante en patología respiratoria y es importante poder diferenciarlo de otras especies, ya que pueden estar colonizando el tracto respiratorio³⁸. Con este fin, Frickmann et al³⁹ elaboran un estudio multicéntrico en el que analizan una colección de 84 cepas de *Haemophilus* spp. (50 de *H. influenzae*, 25 de *H. parainfluenzae*, 7 de *H. haemolyticus* y 2 de *H. parahaemolyticus*) mediante EM e hibridación in situ con sondas fluorescentes. Tras añadir ácido fórmico a las extensiones, el espectrómetro de masas permitió identificar correctamente el 88% de las cepas; 4 cepas obtuvieron resultados no interpretables y 6 fueron identificaciones erróneas. Los autores apuntan que estos errores podrían haberse subsanado añadiendo espectros de referencia para *H. haemolyticus* en la base de datos utilizada y remarcar que ninguna de las técnicas evaluadas está libre de identificaciones erróneas. En resumen, existe cierta dificultad para diferenciar las especies de *Haemophilus* spp. utilizando las bases de datos comerciales disponibles hasta la fecha, aunque mediante la ampliación de estas se pueden llegar a conseguir resultados muy fiables de estas especies^{40,41}.

Grupo HACEK y otros bacilos gramnegativos poco comunes

Haemophilus, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella* pertenecen al grupo HACEK; se caracterizan por su lento crecimiento, necesidades nutricionales exigentes y por formar parte de la flora orofaríngea. Es difícil llegar a una correcta y rápida identificación de estos microorganismos mediante pruebas bioquímicas. No existen muchos artículos que estudien la utilidad de MALDI-TOF para estas bacterias. En 2013 se publicó un trabajo en el que se analizaban 140 aislados de *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Haemophilus* y *Kingella* de muestras pediátricas. En él se comparaba la EM (bioMérieux VITEK) con técnicas bioquímicas junto con secuenciación. Para *Aggregatibacter* spp., *A. actinomycetemcomitans* (10) y *A. segnis* (1) la identificación mediante MALDI-TOF fue correcta. Dos de los 13 *A. aphrophilus* se confundieron con *A. segnis* y *H. parainfluenzae*. Todos los aislados de *Eikenella corrodens* (29), *Kingella denitrificans* (4) y *Kingella kingae* (20) se identificaron correctamente. En términos generales, mediante EM se obtuvo mayor número de identificaciones y hubo menos errores de identificación que con las técnicas bioquímicas⁴². Un estudio similar utilizó el espectrómetro de masas de Bruker (Biotyper 2.0) sobre una colección de 24 *H. parainfluenzae*, 20 *A. aphrophilus*, 5 *A. actinomycetemcomitans*, 14 *Cryptosporidium hominis*, 35 *E. corrodens*, 5 *K. kingae* y 20 *H. influenzae*. El 93% de los aislados fueron identificados a nivel de género y el 66% a nivel de especie. Solamente un aislado de *A. aphrophilus* se identificó erróneamente como *H. influenzae*. Cuando estos autores ampliaron su base de datos fueron capaces de identificar el género de todos los aislados y el 79% de las especies⁴³.

Asimismo, se han descrito más de 20 especies diferentes de *Legionella* capaces de causar infección en humanos. Su identificación es de gran ayuda para diferenciar entre infección y contaminación e iniciar, en caso necesario, un tratamiento adecuado. En un estudio canadiense se evaluó la capacidad de la EM (Bruker, Biotyper) para la identificación de un total de 83 cepas clínicas y de referencia de *Legionella* spp. De manera general, se identificaron correctamente el 61,4% de las cepas a nivel de especie. Si se analizan solamente las cepas para las cuales existen patrones en la base de datos, este porcentaje aumenta hasta el 86,4%, identificando el 100% de *L. pneumophila* y un 77,1% de otras especies de *Legionella*⁴⁴.

La identificación fenotípica de *Bartonella* es complicada, ya que presenta pocas pruebas bioquímicas distintivas de género. Por ello, la EM se ha convertido en una herramienta prometedora —siempre y cuando se implementen en las bases de datos espectros para *Bartonella* spp.—, puesto que hoy en día o no los contienen o hay muy pocos⁴⁵. La misma consideración es necesaria para la identificación de *Brucella* spp. y *Francisella* spp.^{46,47}.

Preparación de las muestras para la identificación de bacterias grampositivas

Las bacterias grampositivas incluyen un gran número de especies patógenas humanas. Estos microorganismos suelen tener una pared con una gruesa capa de peptidoglicano que las hace más resistentes a la lisis, en comparación con las gramnegativas, y pueden requerir procedimientos adicionales como el uso de lisostafina, lisozima u otras moléculas que contribuyen a su rotura. No es ilógico, por tanto, que el rendimiento de la EM sea inferior al que se consigue en bacterias gramnegativas si no se utilizan protocolos de extracción que faciliten la liberación de las proteínas celulares. Con el pretratamiento de las colonias se obtiene una mejora significativa en su identificación en comparación con la obtenida directamente de colonia, en particular en determinadas especies⁴⁸. El número de pases de un mismo aislamiento hace más difícil su identificación, pero la temperatura de incubación o el medio de cultivo no parecen ser factores que afecten⁴⁹. La actualización de las bases de datos comerciales, así como la posibilidad de elaborar colecciones propias con cepas de referencia o identificadas mediante procedimientos moleculares, son necesarias en la identificación de especies menos frecuentes⁵⁰.

Estafilococos

Las especies de *Staphylococcus* constituyen algunos de los patógenos más frecuentemente aislados de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. *S. aureus* es la especie con mayor capacidad patógena; el resto de las especies se agrupan en los denominados estafilococos coagulasa negativos entre los que destacan, entre otros, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* y *S. haemolyticus*. Estas especies de estafilococos coagulasa negativos se reconocen cada vez más como causantes de infecciones nosocomiales, habitualmente relacionadas con dispositivos intravasculares o protésicos. La identificación precisa a nivel de especie es importante para guiar la terapia, distinguir bacteriemia de contaminación e identificar los posibles focos de infección.

La tecnología MALDI-TOF se ha comparado con la fenotípica y molecular para la identificación del género *Staphylococcus* a nivel de especie. Dupont et al⁵¹ evaluaron la utilidad de la EM para la identificación de 20 especies de estafilococos coagulasa negativos, con un porcentaje de aciertos del 93,2% cuando se comparaba con la secuenciación del gen *sodA*, muy superior al que ofrecían los sistemas de identificación bioquímica. Comparando con la secuenciación del gen *tuf* algunos autores mejoran estos resultados, consiguiéndose un 98-100% de concordancia entre ambas técnicas^{52,53}. Además, el uso de esta tecnología ha revelado el aislamiento en muestras clínicas de especies recientemente descritas (como *S. pettenkoferi*, *S. condimenti*

y *S. piscifermentans*) y ha confirmado la relevancia clínica de especies como *S. lugdunensis*⁵⁴. Asimismo, permite también la correcta identificación de especies coagulasa positivas diferentes a *S. aureus* —como el grupo *S. intermedius*, que incluye *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*— a menudo incorrectamente identificadas como *S. aureus* y que se relacionan con infecciones asociadas a mordeduras de perros⁵⁵. MALDI-TOF permite identificar subespecies de estafilococos, como demuestra el estudio de Spanu et al⁵⁶, en el que se identifican correctamente *S. capitis* subsp. *capitis* y subsp. *urealyticus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* y subsp. *hominis*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* y *S. sciuri* subsp. *sciuri*. La identificación de *S. aureus* no ofrece ningún problema usando MALDI-TOF, consiguiéndose en más del 95% de las cepas puntuaciones superiores a 2,0⁵⁷. En los últimos años se ha intentado utilizar esta tecnología para tipado-detección de resistencia a la metilina^{58,59}, o para identificación de la producción de leucocidina de Pantón-Valentine⁶⁰.

Sin embargo, no todos los estudios consiguen resultados tan prometedores. Los porcentajes de identificación parecen depender de los diferentes protocolos de extracción proteica, del número de réplicas, de las especies estudiadas y de los puntos de corte que se utilicen⁶¹. La base de datos y el algoritmo utilizado también influyen: la versión actual de Bruker (v 4.0.0.1) incluye 201 espectros de 39 especies de *Staphylococcus*. Respecto al método de extracción, la transferencia directa a la placa es simple y rápida pero los resultados no son muy fiables. Matsuda et al⁶² comparan la extracción en placa (colonia más ácido fórmico al 70%, secado y acetonitrilo antes de la matriz), la extracción estándar (etanol más acetonitrilo utilizando el sobrenadante tras 2 centrifugaciones) y la transferencia directa a la placa, identificando el 89,5, el 80,8 y el 60,2%, respectivamente. Otros autores consiguen buenos resultados con otras variantes, como la extracción durante 30 min en ácido fórmico al 70%⁵⁷. En cuanto a las diferencias entre especies, se ha objetivado que las puntuaciones más bajas son dependientes de la especie, ya que solamente el 5% de *S. epidermidis* y el 4,8% de *S. aureus* puntúan por debajo de 2,0, mientras que el 100% de *S. cohnii*, el 75% de *S. sciuri* y el 60% de *S. caprae* producen puntuaciones más bajas, aunque seguras⁵⁷. Ello ha llevado a algunos autores a proponer nuevos puntos de corte. Richter et al⁶³ sugieren una puntuación $\geq 2,0$ para *S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* y *S. xylosus*; y una puntuación $\geq 1,7$ para la identificación a nivel de especie de *S. caprae*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. succinus* y *S. warneri*, mientras que *S. cohnii* puede ser identificado con una puntuación $\geq 1,6$. Por todo ello, se ha propuesto un algoritmo que incluya un punto de corte de 1,7, la extracción en placa, realizar el test por duplicado y utilizar la última versión de la base de datos de Bruker para conseguir una tasa de identificación superior al 99%⁶¹.

Estreptococos

El género *Streptococcus* es un grupo muy numeroso y heterogéneo de bacterias, algunas de las cuales son importantes patógenos para el ser humano. Este género ha sido objeto de numerosas revisiones y su nomenclatura se ha modificado con frecuencia. En estos últimos años, con la aplicación de técnicas moleculares, su taxonomía y clasificación ha experimentado algunas modificaciones. Para estructurar este apartado, utilizaremos la clasificación de los estreptococos en 2 grandes grupos en función de su hemólisis y, dentro de cada uno, la clasificación de Lancefield y la basada en la secuencia del gen del ARNr 16S.

La clasificación de los estreptococos beta-hemolíticos según los grupos de Lancefield tiene cierta dificultad, pues hay especies que pueden clasificarse en diferentes grupos y grupos con más de una especie. *Streptococcus dysgalactiae* puede contener los grupos C y G y algunas cepas poco frecuentes pueden clasificarse dentro del grupo A. *S. canis* puede contener el grupo G y *S. equi* spp. *zoepidemicus*

puede contener el grupo *C. S. pyogenes* únicamente contiene el grupo A de Lancefield. La identificación mediante MALDI-TOF de estas especies ofrece resultados variables, siendo muy fiable para *S. pyogenes* (94% identificaciones correctas) y *S. canis* (100%)⁶⁴. Un estudio reciente⁶⁵ confirma la utilidad de esta técnica en *S. pyogenes*, ya que incluso permitiría discriminar entre distintos serotipos mediante el análisis de los espectros⁵. Sin embargo, es menos eficaz para *S. dysgalactiae* y el porcentaje de aciertos para esta especie oscila entre el 51%⁶⁴ y el 66%⁶⁶.

La identificación mediante MALDI-TOF de *Streptococcus agalactiae* es muy fiable y son varios los estudios que informan de la correcta identificación de todas las cepas estudiadas^{64,67}, incluso cuando se incluyen cepas de diferentes serotipos y secuenciotipos⁶⁸. Como se sabe, esta bacteria causa infecciones graves en mujeres embarazadas, durante el parto y, sobre todo, en neonatos; de ahí el interés en identificar precozmente a las mujeres portadoras para administrarles profilaxis durante el parto. En este sentido, se ha publicado recientemente un protocolo para la identificación de *S. agalactiae* directamente del caldo selectivo de enriquecimiento utilizado para el cultivo del exudado vaginal⁶⁹.

S. constellatus, *S. anginosus* y *S. intermedius* constituyen el grupo *anginosus*. Estas especies se asocian con infecciones piógenas de tejidos profundos, incluido el sistema nervioso central. La heterogeneidad de este grupo ha dificultado tradicionalmente su correcta identificación. Recientemente, *S. constellatus* se ha dividido en 3 subespecies (*S. constellatus* subsp. *pharyngis*, *S. constellatus* subsp. *constellatus* y *S. constellatus* subsp. *viborgensis*) y *S. anginosus* en otras 2: *S. anginosus* subsp. *anginosus* (anterior *S. anginosus*) y *S. anginosus* subsp. *whileyi*. Según el estudio de Woods et al⁷⁰, la identificación de este grupo mediante MALDI-TOF es buena en general y correcta a nivel de especie en un 93,1% de las cepas. No obstante, este porcentaje de aciertos se obtiene tras aplicar el protocolo completo de extracción; utilizando la transferencia directa a la placa y la extracción in situ con fórmico al 70%, los porcentajes son del 77,6 y del 83,6% respectivamente. Existe además una amplia variabilidad en estos porcentajes según la especie y la técnica MALDI-TOF es muy fiable para la identificación de *S. anginosus* y *S. constellatus*, pero no para *S. intermedius*. En cuanto a la identificación de subespecies, la base de datos de Bruker (versión 3.3.1.1.) únicamente contiene *S. constellatus* subsp. *pharyngis* y *S. constellatus* subsp. *constellatus* y no es capaz de identificarlas correctamente⁷¹, aunque probablemente esta limitación carece de repercusión clínica, ya que la necesidad de la identificación de las subespecies no está claramente definida.

En la actualidad el grupo *S. bovis* ha pasado a considerarse un complejo y se denomina *S. bovis/equinus*. En él se incluyen tanto especies aisladas en infecciones en humanos (*S. gallolyticus*, *S. infantarius* y *S. lutetiensis*) como en animales (*S. bovis*, *S. equinus* y *S. lactolyticus*). La aplicación de técnicas moleculares basadas en hibridación ADN-ADN y en la secuenciación del gen ARNr 16S produjo el primer cambio en la clasificación de este complejo y se describieron 3 nuevas especies: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* y, finalmente, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*⁷². Su importancia clínica radica en su participación como agente etiológico en endocarditis y sepsis y en su asociación con el cáncer de colon. Aunque se han llevado a cabo pocos estudios acerca de la eficacia de MALDI-TOF en la identificación de estos patógenos, en las series publicadas se observa una elevada concordancia entre los resultados mediante esta tecnología y el análisis de la secuencia de los genes *sodA*, *rnpB* o *rpoB*⁷³, con mejores resultados en la identificación de las subespecies cuando se usa VITEK MS⁷⁴⁻⁷⁶ o un software específico para el análisis de espectros (Biotech Launchpad)⁷⁷.

En el grupo *mitis* se incluyen las especies *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. pseudopneumoniae*. Sus propiedades patogénicas difieren significativamente porque, a diferencia de *S. pneumoniae* (patógeno bien conocido), las otras especies suelen ser comensales y rara vez causan infección o se presentan en pacientes inmunocomprometi-

dos. La identificación de las especies de este grupo es difícil, incluso utilizando la secuenciación de distintos genes, ya que existe un altísimo grado de similitud. Desde el principio de su desarrollo se sugirió que la tecnología MALDI-TOF podría ser útil para la identificación rápida de *S. pneumoniae*. Sin embargo, usando la base de datos de Bruker 3.0 o la de VITEK MS (bioMérieux), las especies *S. mitis* y *S. oralis* se clasificaban erróneamente como *S. pneumoniae*, por lo que algunos autores propusieron la utilización de algoritmos para resolver este problema mediante programas como el ClinPro Tools 2.1 (Bruker) tras la identificación de picos característicos de las diferentes especies⁷⁸. En este sentido, Werno et al⁷⁹ describieron 6 patrones tras el análisis visual de los espectros: MP1 (que contiene los picos m/z 2.937,5 y 5.877) es representativo de *S. pneumoniae*; MP2 (con los picos m/z 2.625, 2.937,5, 5.253 y 5.877) y MP3 (que incluye los picos m/z 2.625, 5.253 y 5.877) identifican a *S. pseudopneumoniae*, mientras que MP4 (con los picos m/z 2.911, 5.824 y 6.955), MP5 (picos m/z 6.955) y MP6 (que contiene los picos m/z 2.625, 2.937,5, 5.877 y 6.955) fueron representativos de otras especies incluidas en este grupo. Con la versión VITEK MS v2.0 los resultados en la identificación de este grupo mejoran notablemente⁶⁴, mientras que sigue habiendo problemas con la versión de Bruker más actualizada en este momento (v 4.0.0.1): esta identifica correctamente todas las cepas de neumococos, pero existe un alto porcentaje de cepas de *S. oralis/S. mitis* identificadas como *S. pneumoniae*, por lo que en artículos recientes se sigue aconsejando la revisión de espectros para la búsqueda de picos característicos⁸⁰, ya sea visualmente o utilizando el software ClinPro Tools. La utilidad de este programa en el serotipado de *S. pneumoniae* mediante EM MALDI-TOF también se ha descrito recientemente⁸¹.

Son diversos los estudios que han comprobado la utilidad de la técnica MALDI-TOF para la identificación de las numerosas especies incluidas en los grupos *mutans*, *salivarius* y *sanguis*^{64,74,82,83}.

Enterococos

No hay muchos estudios que analicen el uso de MALDI-TOF en la identificación de las especies incluidas en este género. Los resultados en general son buenos y fiables (90-100%), tanto en las especies más habituales (*Enterococcus faecalis* y *E. faecium*) como en otras menos aisladas en clínica (*E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* y *E. avium*)^{64,82,84,85}. Fang et al⁸⁶ realizaron un estudio comparativo de métodos fenotípicos, moleculares y de las 2 plataformas MALDI-TOF más utilizadas (Bruker Biotyper 3.0 y VITEK-MS) para la identificación a nivel de especie de 132 aislados clínicos de *Enterococcus* en el que se obtuvieron excelentes resultados para los 2 espectrómetros. En un trabajo reciente que compara la identificación de 21 cepas de referencia de *Enterococcus* de las especies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. cecorum* y *E. columbae*, y 47 cepas porcinas de *Enterococcus* identificadas mediante análisis de restricción con endonucleasas del producto ITS (*intergenic transcribed spacer*) con la obtenida por MALDI-TOF se comprueba también la utilidad de esta tecnología, ya que se identificaron correctamente todas las cepas⁸⁷.

Otros cocos grampositivos

Aunque la utilidad de MALDI-TOF para la identificación de estos géneros poco habituales en clínica no se ha evaluado ampliamente, hay algunas publicaciones que confirman su buen rendimiento. Ratcliffe et al⁸⁸ evaluaron la utilidad de esta tecnología para la identificación de 14 cepas invasivas de *Granulicatella* y *Abiotrophia* (10 de *Granulicatella adiacens*, 1 de *G. elegans* y 3 de *A. defectiva*), consiguiendo mediante MALDI-TOF la correcta identificación de todas ellas a nivel de especie. La identificación de *Lactococcus garviae* (importante patógeno emergente) y de *Rothia mucilaginosa* también se considera fiable mediante MALDI-TOF⁸⁹⁻⁹¹. Para *Pediococcus clausenii*

y varias especies de *Leuconostoc*, la tecnología MALDI-TOF ha demostrado ser simple y rápida, consiguiendo buenos resultados incluso a nivel de especie^{92,93}. Respecto a *Micrococcus luteus* y *Gemella haemolysans*, aunque el número de cepas estudiadas no es muy elevado, los resultados también son excelentes y únicamente un 2% de cepas de *M. luteus* no se han identificado⁶⁴. En un estudio sobre micrococcos ambientales, los aislados se identificaron correctamente a nivel de género, pero la identificación a nivel de especies no fue posible por la ausencia de los espectros correspondientes en la base de datos⁹⁴.

Bacilos grampositivos

En cuanto al género *Bacillus*, las 2 especies patógenas más importantes son *B. cereus* y *B. anthracis* y ambas están muy relacionadas genéticamente entre sí y comparten un 90% de su genoma, aunque tienen un significado patógeno muy diferente. *B. anthracis* se puede diferenciar en el laboratorio por la producción de cápsula en medios que contienen sangre y su perfil bioquímico y, sin embargo, la trascendencia de su rápida identificación surge del uso potencial de esta bacteria con fines militares y bioterroristas. Mediante la utilización de una base de datos específica con perfiles de proteínas ribosomales se consigue una diferenciación superior al análisis de secuencia del gen del ARNr 16S⁹⁵. No obstante, en un trabajo reciente en el que se estudia la identificación por MALDI-TOF de microorganismos muy virulentos se encuentran dificultades para diferenciar *B. anthracis* de *B. cereus* y *B. thuringiensis*⁹⁶.

El género *Listeria* comprende 6 especies de las cuales solo 2 se consideran patógenas: *Listeria monocytogenes* y *L. ivanovii*. La primera, *L. monocytogenes*, es predominante, responsable de la contaminación de alimentos y causa de infecciones graves como meningitis, sepsis y encefalitis y es más frecuente en pacientes inmunodeprimidos. También es un riesgo su colonización en mujeres embarazadas, ya que puede atravesar la barrera placentaria y ser responsable de infecciones graves en el feto y el recién nacido.

Aunque la identificación bioquímica es fácil a nivel de especie, requiere incubaciones adicionales y subcultivos que prolongan el tiempo de diagnóstico. La identificación a nivel de subespecie es importante en brotes relacionados con alimentos contaminados. MALDI-TOF ha demostrado ser una alternativa rápida y eficaz a los métodos fenotípicos y genéticos en la identificación a nivel de especie e incluso es capaz de discriminar líneas clonales en concordancia con la PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) utilizada como método de referencia en el subtipado molecular⁹⁷.

Lactobacillus contiene numerosas especies con diferente nivel de implicación en el hospedador humano, manteniendo el ecosistema microbiano a nivel vaginal y protegiendo de las infecciones urinarias. Sin embargo, algunas especies están relacionadas con infecciones odontológicas y producción de caries. La identificación de especie por criterios fenotípicos es difícil y los métodos genotípicos son complejos. MALDI-TOF permite identificar en la microbiota vaginal las especies *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, estando la primera de ellas asociada con estadios previos al desarrollo de una vaginosis bacteriana. A nivel oral, en las lesiones iniciales de caries participa flora cariogénica, como *Streptococcus mutans*, que genera el ambiente adecuado para la colonización con bifidobacterias y lactobacilos. De la biocapa subgingival se pueden cultivar especies como *Lactobacillus salivarius*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei*, que pueden identificarse correctamente por MALDI-TOF, aportando una herramienta diagnóstica que permite profundizar en la patogénesis de estos procesos relacionados con cambios en la flora habitual⁹⁸.

Corynebacterium es un grupo heterogéneo de bacterias pleomórficas que colonizan habitualmente la piel y puede ser responsable de infecciones oportunistas, a veces graves. *Corynebacterium diphtheriae* es el miembro más significativo del género por su patogenicidad y por su capacidad toxigénica, que comparte con *C. ulcerans* y *C. pseudotu-*

berculosis. Aunque la prevalencia de las infecciones por *C. diphtheriae* es muy baja debido a la cobertura vacunal, la identificación rápida es importante por motivos de salud pública. Desde los primeros estudios de identificación por MALDI-TOF en este grupo de bacterias se ha demostrado su enorme potencial y precisión en comparación con la identificación molecular mediante secuenciación del gen *rpoB*. La EM también ha demostrado ser útil en la identificación de cepas potencialmente toxígenas^{99,100} y en el control de un brote por *C. pseudodiphtheriticum* en pacientes pediátricos con fibrosis quística¹⁰¹.

Como ocurre con otras bacterias, la actualización de las bases de datos es determinante en la precisión de la identificación. Alatoom et al¹⁰² evalúan Bruker Biotyper comparando los resultados con la secuenciación del gen *rpoB* e identifican correctamente el 87% de los aislados con puntuación > 1,7 con la excepción de *C. aurimucosum*, que se identifica como *C. minutissimum*, especie muy cercana a la anterior. Otras especies de *Corynebacterium* importantes responsables de infecciones oportunistas, como *C. jeikeium* o *C. striatum*, se identifican correctamente con las bases de datos actuales utilizadas por las plataformas existentes⁸².

Arcanobacterium haemolyticum es una causa significativa de faringitis y su identificación en el laboratorio clínico es difícil debido a su lento crecimiento con respecto a otras bacterias que crecen a partir de la misma muestra y por la lenta producción de hemólisis. MALDI-TOF permite identificar de manera sencilla *A. haemolyticum* a nivel de especie¹⁰³. El género *Actinotignum* contiene 3 especies: *Actinotignum schaalii* (anteriormente *Actinobaculum schaalii*), *Actinotignum urinale* y *Actinotignum sanguinis*. *A. schaalii* está relacionado con infecciones en humanos (especialmente del tracto urinario) y no crece en los medios de cultivo sin suplementar con sangre, por lo que puede no identificarse si solamente se utilizan medios selectivos o cromogénicos. Bruker Biotyper permite su identificación siempre que se utilicen los medios y el período de incubación adecuados, lo que ha permitido comprobar su importancia en la etiología de las infecciones urinarias¹⁰⁴.

Nocardia es un actinomiceto ubicuo que se aísla del ambiente y no se considera flora normal aislada en muestras clínicas. Algunas especies producen infecciones, con más relevancia en pacientes inmunodeprimidos. El diagnóstico de la nocardiosis supone el aislamiento de la bacteria (que requiere hasta 2 semanas para su crecimiento) y su posterior identificación de especie mediante la combinación de métodos bioquímicos y moleculares. La utilización de MALDI-TOF permite una identificación precisa cuando se utilizan bases de datos actualizadas, comerciales o preparadas en el propio laboratorio¹⁰⁵. Paściak et al¹⁰⁶ utilizaron una base de datos propia de *Corynebacterium* y *Nocardia* y un procedimiento modificado de extracción e identificaron *Nocardia farcinica* en un caso de absceso cerebral que pudo tratarse con monoterapia de trimetoprim-sulfametoxazol de forma rápida y eficaz. Aunque las características de la pared de estas bacterias requieren procedimientos de extracción para su correcta identificación con MALDI-TOF, la rapidez de identificación es muy superior a los métodos convencionales o moleculares¹⁰⁷.

Bacterias anaerobias

MALDI-TOF es un método especialmente útil en la identificación rutinaria de bacterias que requieren incubación prolongada y son inertes bioquímicamente. Ambas características son comunes en las bacterias anaerobias; por ello su uso se ha generalizado en la identificación de estas. Se ha evaluado con buenos resultados mediante la aplicación directa de colonias en la placa de análisis del espectrómetro en la identificación de especies de *Porphyromonas*¹⁰⁸, *Bacteroides*¹⁰⁹ y *Prevotella*¹¹⁰. La preparación de la muestra no exige extracción previa si se considera aceptable un umbral de la puntuación en 1,7. Fournier et al¹¹¹ consideran que la extracción química puede causar cambios en el espectro proteómico que dificultan la identificación precisa, pero en otro trabajo¹¹² en el que se ha ensayado esta técnica se obtienen

resultados similares al análisis sin extracción. El tiempo óptimo de incubación del cultivo es de 48 h para bacterias gramnegativas y 72 h para grampositivas. La exposición al oxígeno no influye en los resultados de los bacilos grampositivos pero sí en los BGN si esta excede las 48 h, con la excepción de *Fusobacterium necrophorum*¹¹³. Nagy et al¹¹⁴, utilizando la versión 3.0 Biotyper de Bruker estudiaron 283 aislamientos anaerobios con significación clínica e identificaron a nivel de especie el 77% de las cepas (puntuación > 2,0) y a nivel de género el 11% (puntuación, 1,7-2,0). De los 44 resultados discordantes entre MALDI-TOF e identificación convencional, solo 3 fueron mal identificados por EM utilizando la secuenciación del gen del ARNr 16S como referencia. Cuando se comparan sistemas diferentes, como Bruker y Shimadzu, los resultados son similares (el 75 frente al 76,7%) en bases de datos no actualizadas¹¹⁵, mientras que, cuando se utilizan bases de datos construidas específicamente, el 96% de los cocos anaerobios grampositivos pueden identificarse¹¹⁶⁻¹¹⁸. Justesen et al¹¹⁹ compararon los sistemas Bruker Biotyper 3.1 y SARAMIS y encontraron que el sistema de Bruker realiza más identificaciones correctas a nivel de especie y enfatiza la importancia de la actualización de la base de datos y la necesidad de ajustar los niveles de la puntuación a 1,7 para establecer identificaciones de confianza a nivel de especie. Otros estudios recientes que evalúan VITEK MS muestran niveles de identificación superiores (91,2%)¹²⁰, pero no incluyen algunos géneros de bacilos y cocos grampositivos, como *Eggerthella* y *Peptoniphilus*¹²¹. Sin embargo, Barba et al¹²² sí identifican con el sistema Bruker Biotyper *Eggerthella lenta*, aunque *Peptoniphilus indolicus* lo identifican como *P. hareii*.

Propionibacterium acnes se considera una bacteria comensal de la piel con baja patogenicidad. Sin embargo, su papel patógeno está emergiendo como oportunista en infecciones protésicas, osteomielitis, endocarditis, endoftalmis y otras infecciones asociadas a neurocirugía. Los filogrupos se asocian a diferentes tipos de infección y situaciones clínicas. MALDI-TOF puede distinguir los filogrupos básicos (I, II y III) evitando utilizar una técnica más discriminativa pero más compleja, como MLST¹²³.

Bacteroides está implicado en infecciones mixtas de diversos orígenes anatómicos y lo componen especies con características fenotípicas muy similares, lo que conduce a identificaciones incorrectas mediante métodos convencionales cuyas bases de datos para la interpretación de resultados tampoco están actualizadas. La taxonomía de estas bacterias ha cambiado en los últimos años con la creación de los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella* y la descripción de otros menos habituales (*Anaerorhabdus*, *Dichelobacter*, *Dialister*, *Fibrobacter*, *Megamonas*, *Mitsuokella*, *Rikenella*, *Sebaldella*, *Tannerella*, *Tissierella*, *Alistipes* y *Parabacteroides*). El uso de MALDI-TOF está especialmente indicado en este escenario, ya que aporta rapidez y precisión en la identificación, con resultados superiores al 97% y discriminando las especies más importantes como *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis* y *Parabacteroides distasonis*¹⁰⁹. Barba et al¹²² identifican correctamente la mayoría de las especies de *Bacteroides*, excepto *B. dorei*, que Bruker Biotyper 3.1 no incluye en su base de datos e identifica como *B. vulgatus*. Culebras et al¹²⁴ demuestran la superioridad de Bruker Biotyper 2.0 sobre métodos convencionales como RapID 32A (87 frente a 52% de identificación a nivel de especie) y con posibilidad de mejorar los resultados utilizando bases de datos más completas que pueden incluso permitir el subtipado de algunas especies.

Fusobacterium nucleatum es un patógeno oportunista asociado a enfermedad periodontal, infecciones extraorales y cáncer colorrectal. Es una especie heterogénea con 5 subespecies: *animalis*, *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii* y *fusiforme*. El interés de identificar la subespecie radica en los diferentes perfiles patogénicos de cada una de ellas. La identificación por MALDI-TOF permite una identificación precisa de *F. nucleatum* y un estudio reciente consigue identificar la subespecie en 28 de 34 cepas analizadas¹²⁵.

Estudios preliminares con las primeras bases de datos ya demostraron la utilidad de la identificación de especies de *Clostridium* me-

dante MALDI-TOF¹²⁶. En un estudio reciente, realizado con la versión 3.1 de Bruker Biotyper y VITEK MS, Chean et al¹²⁷ obtienen buenos resultados para identificar especies de *Clostridium*; sin embargo, con la primera plataforma se obtienen mejores identificaciones extrayendo directamente sobre la placa de análisis. Mayor interés tiene la posibilidad de ribotipar los aislamientos de *Clostridium difficile* teniendo en cuenta su importancia epidemiológica. Reil et al¹²⁸, con una base de datos propia y el sistema SARAMIS MALDI-TOF MS, son capaces de identificar todas las cepas y los ribotipos 001 y 027. Estos resultados no se pueden obtener comparando los sistemas de IVD SARAMIS y Biotyper en 50 cepas clínicas¹²⁹. Bases de datos más completas, con la introducción de aislamientos de diversas regiones geográficas, serán necesarias para discriminar cepas muy relacionadas.

Actinomyces forma parte de la microbiota intestinal y también se encuentra en el tracto genitourinario y la piel. Se reconocen al menos 36 especies y 20 de ellas están relacionadas con procesos infecciosos asociados a actinomicosis cervicofacial, abscesos orales o cerebrales, caries y periodontitis. Su aislamiento e identificación por métodos convencionales es difícil y lento, por lo que los métodos fenotípicos existentes se complementan con técnicas moleculares. MALDI-TOF es muy útil en la identificación rápida de *Actinomyces*, pero requiere utilizar bases de datos específicas y actualizadas. Ng et al¹³⁰ han obtenido buenos resultados de identificación (97%) con cepas de *Actinomyces* aerotolerantes aisladas en infecciones de tejidos blandos y Stingu et al¹³¹ han identificado 674 cepas aisladas de la biocapa subgingival utilizando un análisis de similitud y algoritmos propios.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Ford BA, Burnham CA. Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1412-20.
- Lynn EC, Chung MC, Tsai WC, Han CC. Identification of Enterobacteriaceae bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13:2022-7.
- He Y, Li H, Lu X, Stratton CW, Tang Y-W. Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3888-92.
- Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg*. 2011;66:267-73.
- Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to report. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3301-8.
- Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:0421-7.
- De Jong E, De Jong AS, Smidts-van den Berg N, Rentenaar RJ. Differentiation of *Raoultella ornithinolytica/planticola* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75:431-3.
- Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2012;7:887-902.
- 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.
- Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3031-9.
- Cetinkaya E, Joseph S, Ayhan K, Forsythe SJ. Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. *Mol Cell Probes*. 2013;27:60-4.
- Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro MJ, et al. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:1571-8.

13. Pribil P, Fenselau C. Characterization of *Enterobacteria* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005;77:6092-5.
14. Leuschner RGK, 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.
15. 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.
16. Lasch P, Drevinek M, Nattermann H, Grunow R, Stämmler M, Dieckmann R, et al. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal Chem*. 2010;82:8464-75.
17. Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2010;10:285.
18. Kolínská R, Dřevínek M, Aldová E, Zemličková H. Identification of *Plesiomonas* spp.: serological and MALDI-TOF MS methods. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010;55:669-72.
19. Lamy B, Kodjo A, Laurent F; ColBVH Study Group. Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71:1-5.
20. Ruiz-Castillo A, Lepe-Jiménez JA, Torres-Sánchez MJ, Artacho-Reinoso MJ, Aznar-Martín J. [The relevance of correct identification and interpretation of susceptibility testing of *Aeromonas* spp. bacteremia isolates]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:96-100.
21. Cheng W-C, Jan I-S, Chen J-M, Teng S-H, Teng L-J, Sheng W-H, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *J Clin Microbiol*. 2015;53:1741-4.
22. Eddabra R, Prévost G, Scheffel J-M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*. 2012;167:226-30.
23. Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigner U, et al. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3732-4.
24. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini M-I, Lamas A, Máz L, Cantón R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2012;11:59-62.
25. AbdulWahab A, Taj-Aldeen SJ, Ibrahim EB, Talaq E, Abu-Madi M, Fotedar R. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist*. 2015;8:83-8.
26. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2034-9.
27. Mulet M, Gomila M, Scotta C, Sánchez D, Lalucat J, García-Valdés 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.
28. Kishii K, Kikuchi K, Matsuda N, Yoshida A, Okuzumi K, Uetera Y, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:424-30.
29. Hsueh P-R, Kuo L-C, Chang T-C, Lee T-F, Teng S-H, Chuang Y-C, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3095-100.
30. Vasileuskaya-Schulz Z, Kaiser S, Maier T, Kostrzewa M, Jonas D. Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34:35-9.
31. Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, Friedman RL, Hussong D. *Burkholderia cepacia*: This Decision is Overdue. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2011;65:535-43.
32. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:299-323.
33. Olland A, Falcoz P-E, Kessler R, Massard G. Should cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex be listed for lung transplantation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011;13:631-4.
34. Fehlberg LC, Andrade LHS 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.
35. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:547-603.
36. Iliina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J Mol Diagn*. 2009;11:75-86.
37. Carannante A, De Carolis E, Vacca P, Vella A, Vocale C, De Francesco MA, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol*. 2015;15:142.
38. Hinz R, Zautner AE, Hagen RM, Frickmann H. Difficult identification of *Haemophilus influenzae*, a typical cause of upper respiratory tract infections, in the microbiological diagnostic routine. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2015;5:62-7.
39. Frickmann H, Christner M, Donat M, Berger A, Essig A, Podbielski A, et al. Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) platforms. *PLoS One*. 2013;8:e63222.
40. Zhu B, Xiao D, Zhang H, Zhang Y, Gao Y, Xu L, et al. MALDI-TOF MS distinctly differentiates nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *PLoS One*. 2013;8:e56139.
41. Bruin JP, Kostrzewa M, Van der Ende A, Badoux P, Jansen R, Boers SA, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:279-84.
42. Powell EA, Blecker-Shelly D, Mortensen JE. Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of the fastidious pediatric pathogens *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Haemophilus*, and *Kingella*. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3862-4.
43. Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, Fisher MA. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1104-6.
44. He Y, Chang TC, Li H, Shi G, Tang Y-W. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and database for identification of *Legionella* species. *Can J Microbiol*. 2011;57:533-8.
45. Fournier P-E, Couderc C, Buffet S, Flaudrops C, Raoult D. Rapid and cost-effective identification of *Bartonella* species using mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2009;58:1154-9.
46. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One*. 2010;5:e14235.
47. Müller W, Hotzel H, Otto P, Karger A, Bettin B, Bocklisch H, et al. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol*. 2013;13:61.
48. Alatomo AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of Gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2868-73.
49. TeKippe EM, Shuey S, Winkler DW, Butler M, Burnham CAD. Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1421-7.
50. Christensen JJ, Dargis R, Hammer M, Justesen US, Nielsen XC, Kemp M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of Gram-positive, catalase-negative cocci not belonging to the *Streptococcus* or *Enterococcus* genus and benefits of database extension. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1787-91.
51. Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, Dauphin B, Beretti JL, Alvarez AS, et al. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:998-1004.
52. Carpaij N, Willems RJJ, Bonten MJM, Fluit AC. Comparison of the identification of coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and tuf sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:1169-72.
53. Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere A-M, Bes M, Meugnier H, et al. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:343-54.
54. Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpre N, Hansmann Y, et al. Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2030-6.
55. Lee J, Murray A, Bendall R, Gaze W, Zhang L, Vos M. Improved detection of *Staphylococcus intermedius* group in a routine diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol*. 2015;53:961-3.
56. Spanu T, De Carolis E, Fiori B, Sanguinetti M, D'Inzeo T, Fadda G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to rpoB gene sequencing for species identification of bloodstream infection staphylococcal isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:44-9.
57. Zhu W, Sieradzki K, Albrecht V, McAllister S, Lin W, Stuchlik O, et al. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species. *J Microbiol Methods*. 2015;117:14-7.
58. Zhang T, Ding J, Rao X, Yu J, Chu M, Ren W, et al. Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Microbiol Methods*. 2015;117:122-7.
59. Ostergaard C, Hansen SGK, Moller JK. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol*. 2015;305:838-47.
60. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:467-70.

61. Han HW, Chang HC, Hunag AH, Chang TC. Optimization of the score cutoff value for routine identification of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83:349-54.
62. Matsuda N, Matsuda M, Notake S, Yokokawa H, Kawamura Y, Hiramatsu K, et al. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3862-6.
63. Richter C, Hollstein S, Woloszyn J, Kaase M, Gatermann SG, Szabados F. Evaluation of species-specific score cut-off values for various *Staphylococcus* species using a MALDI Biotyper-based identification. *J Med Microbiol*. 2012;61:1409-16.
64. Rychert J, Burnham CA, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2225-31.
65. Gaibani P, Scaltriti E, Foschi C, Baggio E, Tamburini MV, Creti R, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight and comparative genomic analysis of M-18 group *Streptococcus* strains associated with an acute rheumatic fever outbreak in northeast Italy in 2012 and 2013. *J Clin Microbiol*. 2015;53:1562-72.
66. Jensen CS, Dam-Nielsen C, Arpi M. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry identification of large colony beta-hemolytic streptococci containing Lancefield groups A, C, and G. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47:575-9.
67. Cherkaoui A, Emonet S, Fernandez J, Schorderet D, Schrenzel J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of beta-hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3004-5.
68. Lartigou M-F, Hery-Arnaud G, Haguenoer E, Domelier A-S, Schmit P-O, Van der Mee-Marquet N, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2284-7.
69. Abrok M, Arcson A, Lazar A, Urban E, Deak J. Combination of selective enrichment and MALDI-TOF MS for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation of pregnant women. *J Microbiol Methods*. 2015;114:23-5.
70. Woods K, Beighton D, Klein JL. Identification of the "Streptococcus anginosus group" by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2014;63:1143-7.
71. Arinto-García R, Pinho MD, Carrico JA, Melo-Cristino J, Ramirez M. Comparing Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Phenotypic and Molecular Methods for Identification of Species within the *Streptococcus anginosus* Group. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3580-8.
72. Romero-Hernández B, Del Campo R, Cantón R. *Streptococcus bovis*, situación taxonómica, relevancia clínica y sensibilidad antimicrobiana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31 Suppl 1:14-9.
73. Romero B, Morosini M-I, Loza E, Rodríguez-Banos M, Navas E, Cantón R, et al. Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? *J Clin Microbiol*. 2011;49:3228-33.
74. Karpanoja P, Harju I, Rantakokko-Jalava K, Haanpera M, Sarkkinen H. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry systems for identification of viridans group streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:779-88.
75. Isaksson J, Rasmussen M, Nilson B, Stadler LS, Kurland S, Olaison L, et al. Comparison of species identification of endocarditis associated viridans streptococci using *mnpB* genotyping and 2 MALDI-TOF systems. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:240-5.
76. Angeletti S, Dicuonzo G, Avola A, Crea F, Dedej E, Vailati F, et al. Viridans Group Streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry versus gene sequence-based identification. *PLoS One*. 2015;10:e0120502.
77. Hinse D, Vollmer T, Erhard M, Welker M, Moore ERB, Kleesiek K, et al. Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF mass spectrometry in comparison to sodA sequence analyses. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34:52-7.
78. Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Iliina EN, et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:1066-71.
79. Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2863-7.
80. Chen JHK, She KK, Wong O-Y, Teng JLL, Yam W-C, Lau SKP, et al. Use of MALDI Biotyper plus ClinProTools mass spectra analysis for correct identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis/oralis*. *J Clin Pathol*. 2015;68:652-6.
81. Nakano S, Matsumura Y, Ito Y, Fujisawa T, Chang B, Suga S, et al. Development and evaluation of MALDI-TOF MS-based serotyping for *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:2191-8.
82. Deak E, Charlton CL, Bobenchik AM, Miller SA, Pollett S, McHardy IH, et al. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:27-33.
83. Moon H-W, Lee SH, Chung H-S, Lee M, Lee K. Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J Med Microbiol*. 2013;62:1301-6.
84. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg G V, Zbinden R, Bottger EC, Hombach M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1834-40.
85. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010;48:900-7.
86. Fang H, Ohlsson A-K, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:3073-7.
87. Nowakiewicz A, Ziolkowska G, Zieba P, Proscienczyk A, Banach T, Kowalski C. Modified 16S-23S rRNA intergenic region restriction endonuclease analysis for species identification of *Enterococcus* strains isolated from pigs, compared with identification using classical methods and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2015;64(Pt 3):217-23.
88. Ratcliffe P, Fang H, Thidholm E, Borang S, Westling K, Ozenci V. Comparison of MALDI-TOF MS and VITEK 2 system for laboratory diagnosis of *Granulicatella* and *Abiotrophia* species causing invasive infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77:216-9.
89. Heras Canas V, Pérez Ramírez MD, Bermúdez Jiménez F, Rojo Martín MD, Miranda Casas C, Marín Arriaza M, et al. *Lactococcus garvieae* endocarditis in a native valve identified by MALDI-TOF MS and PCR-based 16s rRNA in Spain: A case report. *New Microbes New Infect*. 2015;5:13-5.
90. Reguera-Brito M, Galán-Sánchez F, Blanco MM, Rodríguez-Iglesias M, Domínguez L, Fernández-Garayzabal JF, et al. Genetic analysis of human clinical isolates of *Lactococcus garvieae*: Relatedness with isolates from foods. *Infect Genet Evol*. 2015;37:185-91.
91. Kayman T, Akalin T, Ugur H, Bozdogan B, Duyan S. Two bacteremia cases associated with *Rothia mucilaginosa*. *Clin Lab*. 2013;59:1167-70.
92. Kern CC, Usbeck JC, Vogel RF, Behr J. Optimization of Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry for the identification of bacterial contaminants in beverages. *J Microbiol Methods*. 2013;93:185-91.
93. Benmechene Z, Fernandez-No I, Quintela-Baluja M, Bohme K, Kihal M, Calomata P, et al. Genomic and proteomic characterization of bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from raw camel milk in two southwest Algerian arid zones. *Biomed Res Int*. 2014;2014:853238.
94. Fox K, Fox A, Ellsner T, Feigley C, Salzberg D. MALDI-TOF mass spectrometry speciation of staphylococci and their discrimination from micrococci isolated from indoor air of schoolrooms. *J Environ Monit*. 2010;12:917-23.
95. Hotta Y, Sato J, Sato H, Hosoda A, Tamura H. Classification of the genus *Bacillus* based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in S10 and spc operons. *J Agric Food Chem*. 2011;59:5222-30.
96. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, et al. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2632-40.
97. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, et al. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:5402-7.
98. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, Clad A, Karygianni L, Hellwig E, et al. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol*. 2014;14:312.
99. Konrad R, Berger A, Huber I, Boschert V, Hörmansdorfer S, Busch U, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxicogenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Eurosurveillance*. 2010;15:1-5.
100. Bittar F, Cassagne C, Bosdure E, Stremeler N, Dubus JC, Sarles J, et al. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients. *France Emerg Infect Dis*. 2010;16:1231-6.
101. Díez-Aguilar M, Ruiz-Garbayosa P, Fernández-Olmos A, Guisado P, Del Campo R, Quereda C, et al. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: An emerging respiratory pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:769-72.
102. Alatoma AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, Ihde SM, Patel R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50:160-3.
103. Hijazin M, Hassan AA, Alber J, Lämmler C, Timke M, Kostrzewa M, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification of bacteria of genera *Arcanobacterium* and *Trueperella*. *Vet Microbiol*. 2012;157:243-5.
104. Lotte R, Lotte L, Ruimy R. *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a newly recognized pathogen-review of the literature. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:281-36.
105. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*. 2010;48:4015-21.
106. Paściak M, Dacko W, Sikora J, Gurlaga D, Pawlik K, Miękiński G, et al. Creation of an In-House Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry *Corynebacteriaceae* Database Overcomes Difficulties in Identification of *Nocardia farcinica* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2611-21.
107. Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier J-C, Gouriet F, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2182-94.
108. Shah HN, Keys CJ, Schmid O, Gharbia SE. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin Infect Dis.* 2002;35:S58-64.
 109. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M, Nord CE, et al. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:796-802.
 110. Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann RE. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:372-6.
 111. Fournier R, Wallet F, Grandbastien B, Dubreuil L, Courcol R, Neut C, et al. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 2012;18:294-7.
 112. Schmitt BH, Cunningham SA, Dailey AL, Gustafson DR, Patel R. Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. *J Clin Microbiol.* 2013;51:782-6.
 113. Veloo ACM, Elgersma PE, Friedrich AW, Nagy E, Van Winkelhoff AJ. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O1091-7.
 114. Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, Urbán E. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *J Med Microbiol.* 2012;61:1393-400.
 115. Veloo AC, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1501-6.
 116. Veloo AC, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34:58-62.
 117. Veloo AC, Welling GW, Degener JE. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe.* 2011;17:211-2.
 118. Fedorko DP, Drake SK, Stock F, Murray PR. Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2257-62.
 119. Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M, et al. Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* 2011;49:4314-8.
 120. Martiny D, Busson L, Wybo I, Ait El Haj R, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1313-25.
 121. Lee W, Kim M, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS), a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS system for identification of anaerobic bacteria. *Ann Lab Med.* 2015;35:69-75.
 122. Barba MJ, Fernández A, Oviaño M, Fernández B, Velasco D, Bou G. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 2014;30C:126-8.
 123. Nagy E, Urbán E, Becker S, Kostrzewa M, Vörös A, Hunyadkúrti J, et al. MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe.* 2013;20:20-6.
 124. Culebras E, Rodríguez-Avial I, Betriu C, Gómez M, Picazo JJ. Rapid identification of clinical isolates of *Bacteroides* species by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe.* 2012;18:163-5.
 125. Nie S, Tian B, Wang X, Pincus DH, Welker M, Gilhuley K, et al. Fusobacterium nucleatum subspecies identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1399-402.
 126. Grosse-Herrenthey A, Maier T, Gessler F, Schaumann R, Böhnel H, Kostrzewa M, et al. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe.* 2008;14:242-9.
 127. Chean R, Kotsanas D, Francis MJ, Palombo EA, Jadhav SR, Awad MM, et al. Comparing the identification of *Clostridium* spp. by two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and sample. *Anaerobe.* 2014;30:85-9.
 128. Reil M, Erhard M, Kuijper EJ, Kist M, Zaiss H, Witte W, et al. Recognition of *Clostridium difficile* PCR-ribotypes 001, 027 and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:1431-6.
 129. Kiyosuke M, Kibe Y, Oho M, Kusaba K, Shimono N, Hotta T, et al. Comparison of two types of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer for the identification and typing of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2015;64:1144-50.
 130. Ng LSY, Sim JHC, Eng LC, Menon S, Tan TY. Comparison of phenotypic methods and matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry for the identification of aero-tolerant *Actinomyces* spp. isolated from soft-tissue infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:1749-52.
 131. Stingu CS, Borgmann T, Rodloff AC, Vielkind P, Jentsch H, Schellenberger W, et al. Rapid identification of oral *Actinomyces* species cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *J Oral Microbiol.* 2015;7:26110.