

ARTIGO ORIGINAL

Desempenho da metodologia por MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram-positivos isolados na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil

Thiago Galvão da Silva Paim,¹ Keli Cristine Reiter,¹ Caio Fernando de Oliveira,¹ Pedro Alves d'Azevedo^{*1}¹Laboratório de Cocos Gram-positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brasil.

Recebido em: 28/09/2012

Aceito em: 25/10/2012

pedro_dazevedo@yahoo.com.br

RESUMO

Até recentemente, a identificação de cocos gram-positivos era baseada principalmente testes fenotípicos convencionais e demorados. A metodologia de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS – *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) tem emergido como uma alternativa rápida para a identificação bacteriana e nosso estudo teve como objetivo comparar o desempenho desta metodologia com o método padrão-ouro para identificação de cocos gram-positivos. Isolados clínicos de *Staphylococcus* spp (n=386), *Enterococcus* sp (n=46) e *Streptococcus* spp (n=18), além de cepas-referência, foram estudadas. A metodologia por MALDI-TOF MS produziu concor-

dância na identificação em 440 de 450 (97.8%) isolados identificados pelo método fenotípico convencional. A espécie com maior discordância na identificação foi *S. epidermidis* (n=5). Alguns isolados de *S. haemolyticus* mostraram dois distintos gêneros na primeira aquisição pelo MALDI-TOF MS. Dois *E. gallinarum* foram erroneamente identificados como *E. faecium* e um estreptococos foi erroneamente identificado pelo MALDI-TOF (*S. gordonii* como *S. mitis/oralis*). Nossos dados sugerem que o MALDI-TOF MS é uma metodologia rápida e viável, podendo ser implementada em um laboratório de microbiologia clínica, devido a acurácia na identificação de cocos gram-positivos.

INTRODUÇÃO

A identificação das espécies de cocos gram positivos tem sido um desafio para laboratórios de microbiologia no mundo todo. A emergência dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCoN) como patógenos e reservatório de resistência aos antimicrobianos tem exigido o emprego de métodos confiáveis de identificação ou para estabelecer tendências epidemiológicas ou como na confirmação de falhas em tratamentos para melhor entender mecanismos de patogenidade.^{1,2,3} No mesmo sentido, espécies de *Enterococcus* tornaram-se patógenos importantes devido ao aumento de sua participação como agentes oportunistas e habilidade especial em adquirir resistência a agentes antimicrobianos, inclusive vancomicina.⁴ Por sua vez, as espécies do gênero *Streptococcus* constituem um grupo heterogêneo que têm sido associadas a endocardite infecciosa, infecções piogênicas invasivas, artrite séptica, endocardite subaguda infecciosa, faringite, impetigo e pneumonia – a maior causa de mortalidade mundial deste gênero.^{5,6,7,8,9}

Até recentemente, a identificação bacteriana se baseou principalmente nos demorados métodos fenotípicos convencion-

nais, sistemas comerciais ou automatizados que frequentemente não distinguem a expressão variada de algumas características dos *Staphylococcus* e técnicas baseadas em sequenciamento de genes específicos.^{1,3,10} Nos últimos anos o sistema baseado na ionização de material amostral co-cristalizado (composição proteica de células bacterianas) conhecido como MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) tem emergido como uma rápida alternativa de identificação bacteriana.¹¹ Os íons formados por feixes de laser curtos são acelerados e seu tempo de voo medido em um tubo de voo à vácuo, resultando em um espectro de massa bacteriano.¹² Contudo, o paradoxo entre o fato de que os sistemas automatizados podem não detectar pequenas diferenças nos SCoN, discriminadas pela metodologia convencional, pode não ser solucionado ou atenuado por este sistema, pois seu princípio é baseado no perfil de proteínas específicas, bastante similar a um método de identificação molecular como o sequenciamento do rDNA 16S.¹³

O objetivo deste estudo foi comparar a metodologia MALDI-TOF MS e os métodos fenotípicos convencionais na identificação de cocos gram-positivos isolados de amostras clínicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Foram estudados isolados de *Staphylococcus* spp (n=386), *Enterococcus* spp (n=46) e *Streptococcus* spp (n=18) provenientes de amostras clínicas entre 2002 e 2010, bem como cepas referência ATCC (American Type Culture Collection). Estes isolados foram obtidos de pacientes atendidos em três hospitais de Porto Alegre, sul do Brasil. Os isolados foram cultivados em ágar sangue de carneiro 5% (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e incubados a 35°C por 24h. Após, foram submetidos a métodos fenotípicos de identificação e à análise pela metodologia MALDI-TOF MS.

Método fenotípico convencional

Todos os isolados clínicos foram submetidos a testes fenotípicos convencionais pela metodologia proposta por Bannerman e Peacock¹⁴ e Antunes¹⁵ para estafilococos, Teixeira¹⁶ para enterococos, e Spellerberg e Brandt,¹⁷ Beck, Frodl e Funke¹⁸ para estreptococos do grupo bovis. Para identificação dos estafilococos, as seguintes características foram testadas: catalase, morfologia colonial e pigmentação, coloração por Gram, hemólise, susceptibilidade à novobiocina (5µg), polimixina B (300U), fosfomicina (200µg) e desferroxamina (100µg), atividade enzimática para arginina arilamidase, ornitina descarboxilase e urease, e produção de ácido a partir de trealose, manitol, manose, xilose, celobiose, arabinose, maltose, lactose, sacarose e rafinose. Para os enterococos, as seguintes características foram testadas: catalase, morfologia colonial e pigmentação, hidrólise da esculina na presença de 40% de bile, crescimento em NaCl 6,5%, motilidade, e produção de ácido a partir de manitol, sorbose, arginina, arabinose, sorbitol, rafinose, sacarose, piruvato e metil-alfa-D-glucopiranosídeo. As espécies pertencentes ao grupo *Streptococcus bovis* (*S. gallolyticus* e *S. infantarius*) foram testadas para o grupo D de Lancefield com teste específico (Oxoid, Hampshire, United Kingdom), hidrólise da esculina na presença de 40% de bile, crescimento em NaCl 6,5%, e produção de ácido a partir de manitol, trealose e metil-alfa-D-glucopiranosídeo. Todos os resultados foram obtidos depois de incubações por 24h, 48h e 72h a 35°C.

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

A preparação da amostra para espectrometria de massas foi feita como segue. Cada lâmina de aço continha três grupos de aquisição, e cada grupo de aquisição continha 16 poços, possibilitando a análise de 48 isolados diferentes. Uma quantidade de colônia de um cultivo bacteriano recente foi colocado diretamente sobre o poço-alvo da amostra em um filme fino. Este filme foi então coberto com 1µl de uma solução matriz saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico e deixado secar a temperatura ambiente. A lâmina de aço foi então inserida no equipamento Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). O espectro de massa gerado foi analisado e comparado com banco de dados de referência.

Análise dos dados

Foram avaliadas medidas descritivas para os resultados do MALDI-TOF. Concordância de identificação entre o método fenotípico convencional e o MALDI-TOF foram computados para determinação da acurácia do método. Identificações errôneas foram avaliadas pelo tipo de erro como erro maior (discordância em nível de gênero) e erro menor (discordância em nível de espécie).

Critérios de identificação utilizados no nosso estudo foram baseados na confiabilidade fornecida pelo instrumento, o que foi baseado em probabilidade: um micro-organismo com ≥90% indicava identificação conclusiva se mesmo gênero, dois micro-organismos com ≥90% indicava identificação inconclusiva se mesmo gênero, e um ou mais micro-organismos com ≥90% indicavam identificação não-confiável se gêneros diferentes. Limitação da técnica foi considerada quando o equipamento não forneceu nenhuma identificação.

va se mesmo gênero, e um ou mais micro-organismos com ≥90% indicavam identificação não-confiável se gêneros diferentes. Limitação da técnica foi considerada quando o equipamento não forneceu nenhuma identificação.

RESULTADOS

A acurácia do MALDI-TOF MS para a identificação bacteriana e a descrição de isolados erroneamente identificados pelo sistema automatizado foram detalhados na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente. Todos os isolados de *Staphylococcus aureus* foram corretamente identificados pela metodologia testada. A acurácia para o grupo dos SCoN foi de 98% e todos os isolados de *S. haemolyticus* e *S. hominis* foram corretamente identificados. Correspondência com identificação em nível de espécie para *S. epidermidis* foi de 89 de 94 isolados testados (94.7%). Cinco isolados foram discordantes, todos apresentando erro menor: dois *S. epidermidis* foram erroneamente identificados como *S. warneri* e cepas identificadas como *S. hominis subs. hominis*, *S. intermedius* e *S. saprophyticus*. MALDI-TOF MS falhou na identificação de três isolados de *S. epidermidis* no primeiro grupo de aquisição; entretanto, todos foram corretamente identificados em análise posterior. A metodologia corretamente identificou em nível de espécie todos os isolados de *S. haemolyticus* testados (n=106), embora dez cepas tivessem sido testadas novamente. Curiosamente, quatro isolados tiveram uma incorreta identificação em nível de gênero (erro maior) na primeira aquisição pelo MALDI-TOF MS, com três identificações consistindo nas espécies *Corynebacterium aurimucosum* e uma em *Enterococcus faecalis*. Além disso, seis isolados não puderam ser identificados na primeira análise, somente sendo identificados em aquisição posterior.

Tabela 1 - Análise da acurácia do MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram-positivos.

Taxa (No.)	Concordância de identificação entre MALDI-TOF MS e o método fenotípico convencional – No (%)	
	Gênero	Espécie
<i>Staphylococcus</i> spp. (386)	384 (99.5)	379 (98.2)
<i>S. aureus</i> (43)	43 (100)	43 (100)
<i>S. epidermidis</i> (94)	94 (100)	89 (94.7)
<i>S. haemolyticus</i> (106)	106 (100)	106 (100)
<i>S. hominis</i> (26)	26 (100)	26 (100)
<i>S. saprophyticus</i> (95)	94 (99)	94 (99)
Outros SCoN ^a (22)	21 (95.5)	21 (95.5)
<i>Enterococcus</i> sp. (46)	46 (100)	44 (95.7)
<i>E. faecalis</i> (28)	28 (100)	28 (100)
<i>E. faecium</i> (8)	8 (100)	8 (100)
Outros ^b	10 (100)	8 (80)
<i>Streptococcus</i> spp. (18)	18 (100)	17 (94.4)
<i>Micrococaceae</i> (386)	384 (99.5)	379 (98.2)
<i>Streptococcaceae</i> (64)	64 (100)	61 (95.3)

^a *S. capitis* (5), *S. caprae* (1), *S. cohnii* (3), *S. intermedius* (1), *S. lugdunensis* (1), *S. sciuri* (1), *S. warneri* (9) e *S. xylosum* (1);

^b *E. casseliflavus* (2), *E. gallinarum* (6) e *E. hirae* (2);

^c *S. agalactiae* (1), *S. gallolyticus* (7), *S. gordonii* (1), *S. infantarius* (2), *S. mitis/S. oralis* (3), *S. mutans* (1), *S. parasanguis* (1), *S. salivarius subs salivarius* (1) e *S. sanguis* (1).

Tabela 2 - Divergência de identificação entre o método convencional e MALDI-TOF MS.

Isolados Bacterianos (No.)	Identificação obtida por MALDI-TOF MS (No.)	Tipo de divergência
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (5)	<i>S. warneri</i> (2)	Erro Menor
	<i>S. hominis subs hominis</i> (1)	Erro Menor
	<i>S. intermedius</i> (1)	Erro Menor
	<i>S. saprophyticus</i> (1)	Erro Menor
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (1)	Não identificado	Não identificado
<i>Staphylococcus warneri</i> (1)	<i>Staphylococcus warneri</i> / <i>Prevotella buccalis</i>	Identificação não-confiável
<i>Enterococcus gallinarum</i> (2)	<i>E. faecium</i> (2)	Erro Menor
<i>Streptococcus gordonii</i> (1)	<i>Streptococcus mitis</i> / <i>Streptococcus oralis</i> (1)	Erro Menor

Entre os isolados de *S. saprophyticus* testados, concordância na identificação em nível de espécie foi de 98.9%; com um isolado não identificado. Semelhantemente, todos os vinte e seis isolados de *S. hominis* foram corretamente identificados em nível de espécie (100%), com um isolado não sendo identificado na primeira aquisição do método. Outros SCoN analisados neste estudo (*S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri* e *S. xylosus*) mostraram concordância de identificação em nível de espécie entre o método fenotípico convencional e MALDI-TOF MS. Resultado discordante foi encontrado para um isolado de *S. warneri*, no qual produziu dois espectros de massa com igual probabilidade (*Staphylococcus warneri* 99.9% / *Prevotella buccalis* 99.9%).

Para os isolados de enterococos, concordância na identificação foi de 95.7%. Todos os isolados de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. hirae* foram corretamente identificados pela metodologia por MALDI-TOF. Contudo, correta identificação em nível de gênero, mas incorreta em nível de espécie foi encontrada para duas de seis cepas de *E. gallinarum*. Esses isolados foram erroneamente identificados como *E. faecium*, portanto, classificados como erro menor (Table 2).

Um grupo diverso de espécies de *Streptococcus* foi analisado pela metodologia por MALDI-TOF MS. Um total de 17 de 18 isolados foram identificados em nível de espécie, com uma taxa de concordância na identificação de 94.4%. Um isolado de *S. gordonii* foi erroneamente identificado como uma cepa do grupo *Streptococcus mitis*/*Streptococcus oralis* (erro menor) e todos os isolados de *S. gallolyticus* (n=7) concordaram exatamente em nível de sub-espécie com a metodologia do estudo.

DISCUSSÃO

Uma técnica de identificação de bactérias clinicamente relevantes deve ser rápida, acurada e confiável. Entretanto, os métodos fenotípicos convencionais para identificação de cocos gram-positivos são relativamente problemáticos para o uso na rotina laboratorial, com testes bioquímicos que requerem mais de 72 horas para identificação em nível de espécie.¹⁹

Atualmente, sistemas automatizados e métodos miniaturizados são comumente utilizados nos laboratórios para a rápida identificação de micro-organismos, contudo, a acurácia para alguns cocos gram-positivos tem sido relatada menor que o do método referência. Esses achados poderiam ser provavelmente devido às reações ambíguas, variação fenotípica, características bioquímicas atípicas e lentas taxas de crescimento bacteriano, ocasionando identificações errôneas pelo curto tempo de incubação utilizado pelos instrumentos.^{19, 20}

A metodologia por MALDI-TOF MS, quando implementada nos laboratórios clínicos, tem sido reportada como eficiente,

custo-efetiva e rápida na identificação de micro-organismos. Permitiu a identificação de uma ampla faixa de espécies bacterianas e, sobre condições da rotina laboratorial, demonstrou uma elevada acurácia na identificação em nível de espécie.^{21, 22}

Neste estudo, a metodologia por MALDI-TOF produziu uma identificação concordante em 440 (97.8%) dos 450 isolados de cocos gram-positivos identificados pelo método fenotípico convencional. O melhor desempenho da nova metodologia foi para isolados de estafilococos, seguidos por enterococos e streptococos. Entre os SCoN, a taxa de correta identificação em nível de espécie foi de 98% (336/343), com seis isolados erroneamente identificados e um não identificado. Esses resultados foram semelhantes a estudo prévio, no qual incluiu isolados clínicos de SCoN.²³ Dubois *et al* e Carpaij *et al*, em estudos recentes, demonstraram que o MALDI-TOF, comparado a identificação molecular de isolados clínicos e cepas-referência, é um método acurado para determinação de espécies de SCoN (acurácia de 99.3% e 100%, respectivamente), um método que poderia ser implementado para identificação desse grupo de cocos gram-positivos na rotina da microbiologia clínica.^{24, 25}

Os isolados de *S. epidermidis* erroneamente identificados (identificados como *S. warneri*, *S. hominis subs. hominis*, *S. intermedius* e *S. saprophyticus*) poderiam ser discriminados por testes bioquímicos convencionais, como a coagulase (resultados positivos para *S. intermedius*), susceptibilidade à novobiocina (entre essas espécies, somente o *S. saprophyticus* é resistente) e a susceptibilidade à desferroxamina (*S. epidermidis* e *S. hominis* são suscetíveis, mas *S. warneri* não).¹⁹ Embora as espécies *S. epidermidis* e *S. hominis* mostrem um perfil fenotípico semelhante, discos de fosfomicina podem ser usados como um teste viável para diferenciar esses isolados (*S. epidermidis* é suscetível, enquanto *S. hominis* é resistente).¹⁵

O sistema MALDI-TOF MS identificou um isolado de *S. warneri* com espectro de massa de duas bactérias não relacionadas – *Staphylococcus warneri* 99.9% / *Prevotella buccalis* 99.9%. *Prevotella buccalis* é um bastonete gram-negativo anaeróbico isolado a partir da microbiota oral humana.²⁶ Fenotipicamente, ambos micro-organismos podem ser diferenciados pelo processamento prévio das amostras, sem qualquer teste complementar.

Alguns isolados de *S. haemolyticus* mostraram dois gêneros distintos na identificação por MALDI-TOF MS na primeira aquisição. Isolados de *S. haemolyticus* foram erroneamente identificados como *Corynebacterium aurimucosum*, micro-organismo pertencente a microbiota normal humana; algumas espécies são comumente contaminantes e ocasionalmente causam infecções de próteses articulares.^{27, 28} Semelhantemente, a metodologia identificou um isolado como *E. faecalis*. Esses erros maiores encontrados nos resultados da primeira aquisição foram resolvidos posteriormente repetindo-se o teste por MALDI-TOF

MS. Fenotipicamente, as características desses gêneros bacterianos facilmente poderiam ser avaliadas por coloração de Gram e morfologia colonial, permitindo o rastreio de resultados erroneamente identificados e posterior aquisição para nova análise.

Quarenta e quatro dos quarenta e seis isolados de enterococos que foram identificados por MALDI-TOF tiveram uma identificação concordante com os métodos fenotípicos. Esses resultados foram semelhantes à estudos prévios.²² Entretanto, dois erros menores foram encontrados para isolados de *E. gallinarum*. Esses isolados foram erroneamente identificados como *E. faecium*, mostrando resultados particularmente não aceitáveis (66,7% corretamente identificados em nível de espécie), embora o número de isolados investigados fosse baixo, semelhantemente à outro estudo.²⁹ Em estudo de genômica comparativa de cepas de enterococos, Palmer *et al* reportou a divergência entre as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* e identificou as características genéticas das espécies de enterococos com motilidade - *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Ao contrário de *E. faecalis*, ampla divergência filogenética foi observada entre as cepas de *E. faecium*.³⁰ Esta característica é de especial interesse para a identificação bacteriana, porque o MALDI-TOF é uma metodologia baseada em perfil proteômico, permitindo a separação de biomarcadores pela razão massa/carga obtido.¹¹ Portanto, a variação genômica entre mesma espécie mas distintas cepas poderia afetar a identificação bacteriana, uma vez que poderia induzir mudanças no perfil de proteínas expressas nos micro-organismos. Além disso, *E. faecium* e *E. gallinarum* compartilham características bioquímicas semelhantes (*Enterococcus* do grupo II). Os testes fenotípicos divergentes entre essas espécies é que *E. gallinarum* é móvel e MGP (*metil-alfa-D-glucopiranosideo*) positivo, enquanto *E. faecium* não.^{16,31} Apesar dos isolados erroneamente identificados de *E. gallinarum*, todos os *E. faecium* foram corretamente identificados pelo MALDI-TOF. Esta espécie de enterococos é um emergente e desafiante patógeno hospitalar, principalmente os *E. faecium* resistentes a vancomicina (VREfm), isolados a partir de pacientes hospitalizados com bacteremia e endocardite, frequentemente associados com multirresistência aos antimicrobianos, comprometendo a terapia.^{32,33,34,35} Griffin *et al* demonstrou que a nova metodologia tem a habilidade para reportar um teste diagnóstico rápido e acurado, permitindo reduzir a disseminação desse patógeno a partir de pacientes colonizados, prevenindo surtos infecciosos adquiridos no leito hospitalar.³⁶

Um isolado de estreptococos foi erroneamente identificado pelo MALDI-TOF (*S. gordonii* como *S. mitis/oralis*). Essas cepas pertencem ao grupo *Viridans* e *Mitis*, nos quais compreendem uma proporção significativa da microbiota normal da orofaringe.³⁷ Embora o presente estudo tivesse um número reduzido de isolados de estreptococos (n=18), estudos prévios mostraram que o banco de dados do Vitek MS é mais específico para identificação de *S. viridans*.³⁸ Contudo, devido ao elevado nível de similaridade entre esse grupo, análise com um número maior de isolados deveria ser realizado para demonstrar a acurácia do MALDI-TOF MS na identificação dos *S. viridans*.

CONCLUSÃO

MALDI-TOF MS tem o potencial para ser uma ferramenta acurada à identificação da maioria dos cocos gram-positivos. Além disso, é uma metodologia simples, barata, rápida e viável; e pode ser implementada em um laboratório de microbiologia clínica, melhorando a eficiência, tempo para diagnóstico e custo-efetividade para a identificação bacteriana.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Edital PRONEM 03/2011 nº 11/2058-5). Nós somos gratos à bioMeriëux pela grande oportunidade de trabalhar com a tecnologia por MALDI-TOF MS.

REFERÊNCIAS

1. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3099-103.
2. de Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:1219-24.
3. Kontos F, Petinaki E, Spiliopoulou I, Maniatis M, Maniatis AN. Evaluation of a novel method based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J Microbiol Methods* 2003;55:465-9.
4. Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:513-522.
5. Desimone DC, Tleyjeh IM, Correa de Sa DD *et al*. Incidence of infective endocarditis caused by viridans group streptococci before and after publication of the 2007 American Heart Association's endocarditis prevention guidelines. *Circulation* 2012;126(1):60-4.
6. Simone G, Rubini G, Conti A *et al*. *Streptococcus anginosus* group disseminated infection: case report and review of literature. *Infez Med* 2012;20(3):145-54.
7. Yombi JC, Belkhir L, Jockheere S *et al*. *Streptococcus gordonii* septic arthritis: two cases and review of literature. *BMC Infect Dis* 2012;12(1):215.
8. Parks T, Smeesters PR, Steer AC. Streptococcal skin infection and rheumatic heart disease. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25(2):145-53.
9. Simell B, Auranen K, Käyhty H *et al*. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines* 2012;11(7):841-55.
10. Caierão J, Superti S, Dias CAG, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:277-9.
11. Murray, P. What Is a New in Clinical Microbiology - Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2012;14(5):419-423.
12. Croxatto A, Prod'homme, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36:380-407.
13. Santos OD, De Resende MC, De Mello AL, Frazzon AP, D'Azevedo PA. The use of whole-cell protein profile analysis by SDS-PAGE as an accurate tool to identify species and subspecies of coagulase-negative staphylococci. *APMIS* 2011;120(1):39-46.
14. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Landry ML eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C: ASM Press, 2007:390-411.
15. Antunes AL, Secchi C, Reiter KC, Perez LR, de Freitas AL, D'Azevedo PA. Feasible identification of *Staphylococcus epidermidis* using desferrioxamine and fosfomycin disks. *APMIS* 2008;116(1):16-20.
16. Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Landry ML eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C: ASM Press, 2007:430-442.
17. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Landry ML, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C: ASM Press, 2007:412-429.
18. Beck M, Frodl R, Funke G. *Comprehensive Study of Strains Pre-*

- viously Designated *Streptococcus bovis* CoNecutively Isolated from Human Blood Cultures and Emended Description of *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. coli. *J Clin Microbiol* 2008;46(9):2966–72.
19. Iorio NLP, Ferreira RBR, Schuenck RP et al. Simplified and Reliable Scheme for Species-Level Identification of *Staphylococcus* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8): 2564–69.
20. Chatzigeorgiou KS, Sergentanis TN, Tsiodras S, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the Identification of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: a Comprehensive Meta-Analysis. *J Clin Microbiol* 2011;49(9):3284–91.
21. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1549–54.
22. 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(3):900–7.
23. Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E 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(7):998–1004.
24. Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP et al. Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(3):941–5.
25. Carpaiz N, Willems RJ, Bonten MJ, 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(10):1169–72.
26. Downes J, Liu M, Kononen E, Wade WG. *Prevotella micans* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:771–4.
27. Alatoom 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(1): 160–3.
28. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Patel R. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 2012; 50(5):1518–23.
29. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. *PLoS One* 2011;6(1):e16424.
30. Palmer KL, Godfrey P, Griggs A et al. Comparative Genomics of Enterococci: Variation in *Enterococcus faecalis*, Clade Structure in *E. faecium*, and Defining Characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *mBio* 2011; 3(1):e00318–11.
31. Han Goh S, Facklam RR, Chang M et al. Identification of Enterococcus Species and Phenotypically Similar Lactococcus and Vagococcus Species by Reverse Checkerboard Hybridization to *Chaperonin 60* Gene Sequences. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):3953–59.
32. Forrest GN, Arnold RS, Gammie JS, Gilliam BL. Single center experience of a vancomycin resistant enterococcal endocarditis cohort. *J Infect*. 2011;63(6):420–8.
33. Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35(5):872–900.
34. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(4):266–78.
35. Hayakawa K, Marchaim D, Martin ET et al. Comparison of the clinical characteristics and outcomes associated with vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and vancomycin-resistant E. faecium bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(5):2452–8.
36. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2918–31.
37. Homer KA, Roberts G, Byers HL et al. Mammosidase Production by Viridans Group Streptococci. *J Clin Microbiol* 2001;39(3):995–1001.
38. Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, 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(4):1313–25.