

Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında
Yenilikler:

İdentifikasyonda Yeni Yöntemler

Prof. Dr. Rıza DURMAZ

Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Kırıkkale

Mikobakterilerin Sınıflandırması

Tüberküloz



M.tuberculosis kompleks (MTK)

- *M.tuberculosis*
- *M.bovis* (*M.bovis* BCG)
- *M.caprae*
- *M.pinnipedii*
- *M.canettii*
- *M.microti*
- *M.africanum*

Lepra



M.leprae

TDM enfeksiyonları



TDM

- Fotokromojen
 - *M.kansasii*, *M.marinum*
- Skotokromojen
 - *M.scrofulaceum*
- Nonfotokromojen
 - *M.avium*, *M.intracellulare*
- Hızlı üreyen
 - *M.abscessus*, *M.fortuitum*
 - *M.chelonae*, *M.peregrinum*

- Mikobakteri türleri **farklı virulans** ve **antibiyotik duyarlılık** profili gösterdiklerinden,
- *M. tuberculosis* kompleks ve TDM içerisinde yer alan türlerin doğru ve hızlı tanımlanması **uygun tedavi protokollerinin seçilmesi** açısından çok önemlidir.
- Son yıllarda klinik örneklerden sıklıkla izole edilmeye başlamalarından dolayı TDM türlerinin identifikasyonu daha da önemli hale geldi.
- Ulusal Tüberküloz Laboratuvarı verilerine göre 2 yıllık sürede (2009-2010) 206 hastada *Mycobacteria* üretilmiş,
 - TDM: % 11.7
 - Albayrak N ve ark. Mikrobiyol Bul. 2012 Oct;46(4):560-7.

İdentifikasyon yöntemleri

- **Fenotipik testler**

- Niyasin akümüasyonu,
- Nitrat redüksiyonu,
- Koloni morfolojisi,
- Pigmentasyon,
- *Thiophen-2-carboxylic acid hydrozyde*” (TCH) ve pirazinamide duyarlılık.
- NAP (p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksipropiofenon)
-

- **Moleküler testler**

- Nükleik asit temelli
- Protein veya diğer makro-molekül temelli

BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

- **ZAMAN ALICI**

- Biyokimyasal testler 2-6 hafta almakta

- **ZAHMETLİ**

- **YORUMLAMASI GÜÇ**

- **TCH Testi**

- Klasik *M. tuberculosis* izolatları: TCH'a DİRENÇLİ
- *M. tuberculosis* Asya suşları : TCH'a duyarlı
- *M. bovis* ve MTBK'in diğer üyeleri: TCH'a DUYARLI

- **PZA Testi**

- *M. tuberculosis* suşları pirazinamide duyarlı
 - **ÇİD olan izolatlarında pirazinamide direnç gözlenmekle birlikte,**
- *M. bovis* ve *M. bovis* BCG'de pirazinamide DİRENÇLİ.

- [J Clin Microbiol.](#) 2002;40(7):2339-45.

- **MİKOBAKTERİLERİN TÜMÜ TANIMLANAMAZ**

- Kullanılan birçok yöntem yeni türleri tespit edemez.

Nükleik asit Temelli moleküler testler

- **Prob hibridizasyon testleri,**
- **Sekans analizleri**
- **Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)-RFLP çalışmaları**
 - Avantajları
 - Dizi analizi 1-2 gün almaktadır.
 - 16S rRNA dizileme yöntemiyle tanımlamanın maliyeti biyokimyasal testlerden daha düşük.

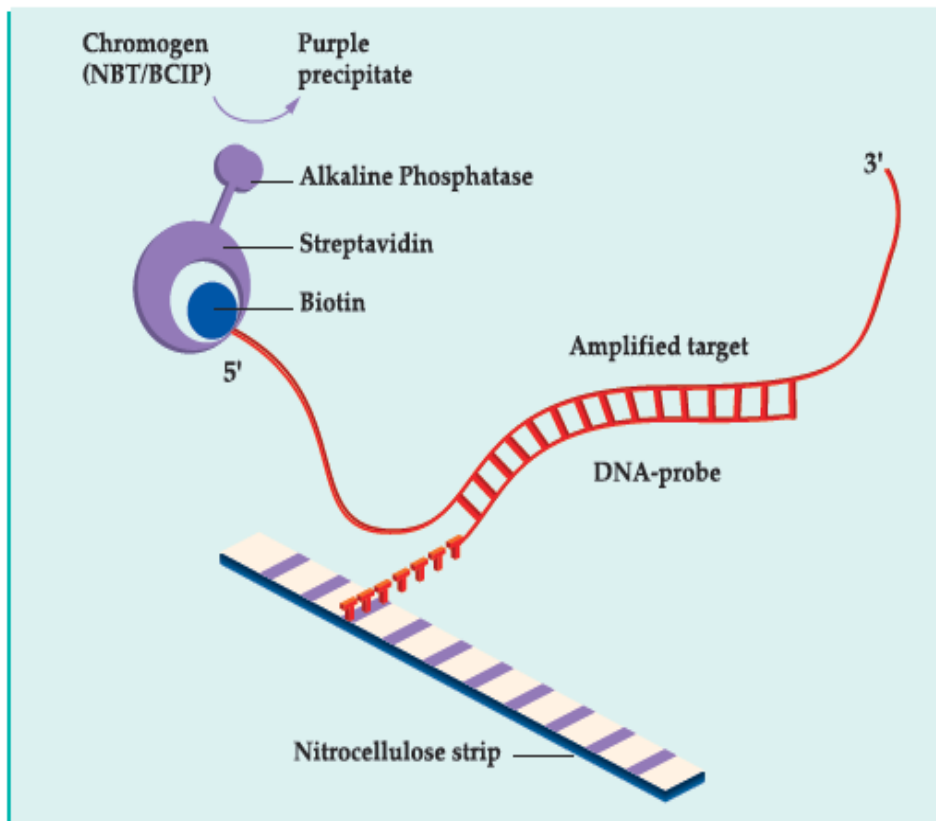
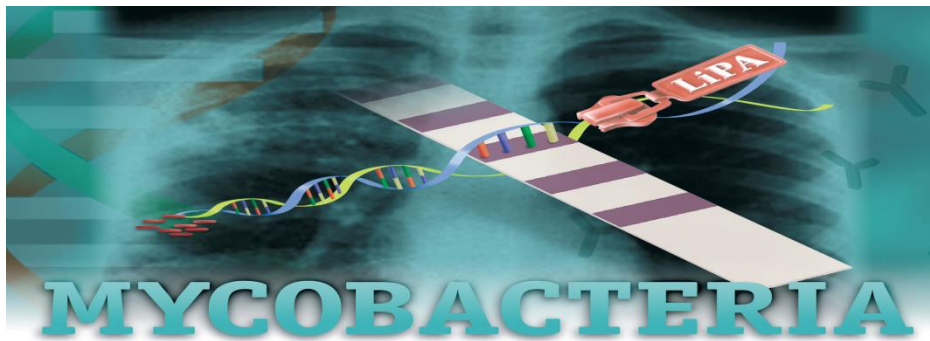
	Biyokimyasal testler	16SrRNA dizileme
Yavaş/aktif	55.89 (\$)	35.45 (\$)
Yavaş/İnert	128.19(\$)	35.45(\$)
Hızlı üreyenler	95.76(\$)	35.45(\$)

Prob hibridizasyon testleri

- İlk ticari moleküler test olan **AccuProbe** (Gen- Probe Inc.)
- rRNA ile hibridizasyona giren tür spesifik DNA problemleri kullanılmakta
- **Kültürde üretilmiş mikobakterilerin** identifikasyonu amacıyla tasarlanmıştır.
- **MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX TEST**
 - *M.tuberculosis* kompleksi diğer mikobakterilerden ayırmak için tasarlanmıştır
 - Fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı %99 , özgüllüğü %99.9
 - **TBC içerisinde yer alan türlerin ayrımını yapamamaktadır.**
- **MYCOBACTERIUM AVIUM TEST**
 - *M. avium* ile *M. intracellulare* arasındaki ayrımı yapabilmekte
 - Fenotipik yöntemler bu ayrımında yetersiz
 - HPLC ile karşılaştırıldığında özgüllük %97-100, Duyarlılık %100

Prob hibridizasyon testleri-2

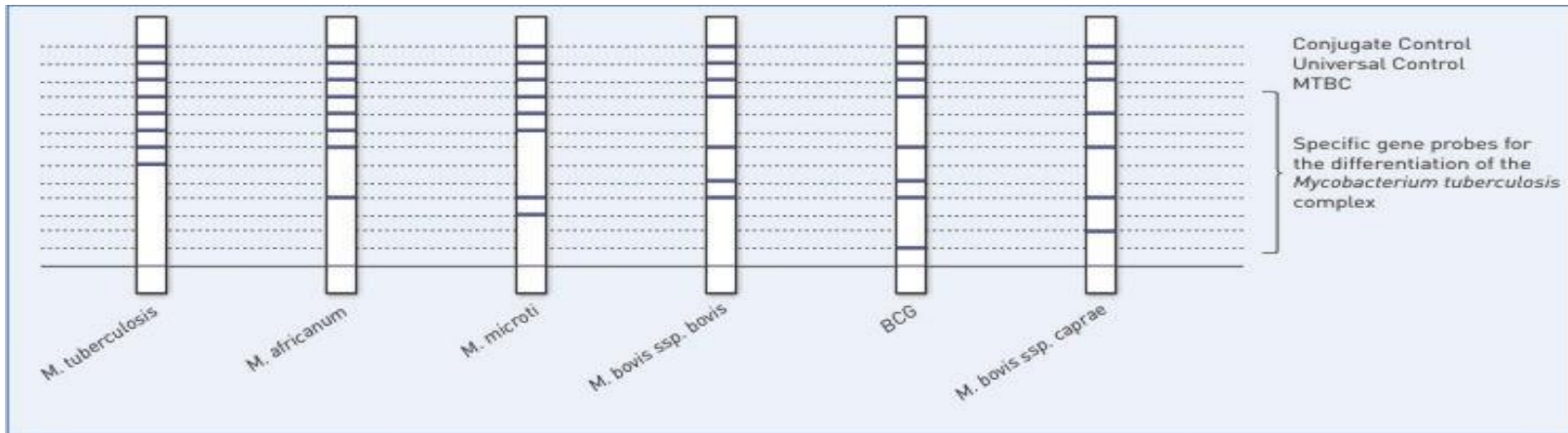
- **INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2,/Line Probe Assay (InnoGenetics)**
 - Rereverse hibridizasyon sistemidir.
 - Türler arasındaki “16S-23S rRNA sapcer” bölgesindeki nükleotid dizilim farklılığına bakılmaktadır.
 - Katı veya sıvı kültürden çalışılabilmektedir.
 - **İdentifikasyonu yapılabilen türler**
 - *M. tuberculosis* kompleks ve 16 ilave tür ve/veya kompleks
 - **Önemli dezavantajı TBC kompleks ve diğer komplekslerin içerisindeki üyelerin ayrımında yetersiz kalmaktadır.**



marker line		
Conjugate control - 1		Conjugate control
MYC genus - 2		<i>Mycobacterium</i> genus
MTB complex - 3		MTB complex
MKA-1 - 4		<i>M. kansasii</i> I
MKA-2 - 5		<i>M. kansasii</i> II
MKA-3 - 6		<i>M. kansasii</i> III, IV, V
MXE - 7		<i>M. xenopi</i>
MGO - 8		<i>M. goodii</i>
MGV - 9		<i>M. goodii</i>
MSI - 10		<i>M. simiae</i>
MMU - 11		<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
MCE - 12		<i>M. celatum</i>
MAIS - 13		MAIS complex
MAV - 14		<i>M. avium</i>
MIN-1 - 15		<i>M. intracellulare</i> 1
MIN-2 - 16		<i>M. intracellulare</i> 2
MSC - 17		<i>M. scrofulaceum</i>
MML - 18		<i>M. mageritense</i>
MHP - 19		<i>M. haemophilum</i>
MCH-1 - 20		<i>M. chelonae</i> I, II, III, IV
MCH-2 - 21		<i>M. chelonae</i> III
MCH-3 - 22		<i>M. chelonae</i> I
MFO - 23		<i>M. fortuitum</i> complex
MSM - 24		<i>M. smegmatis</i>

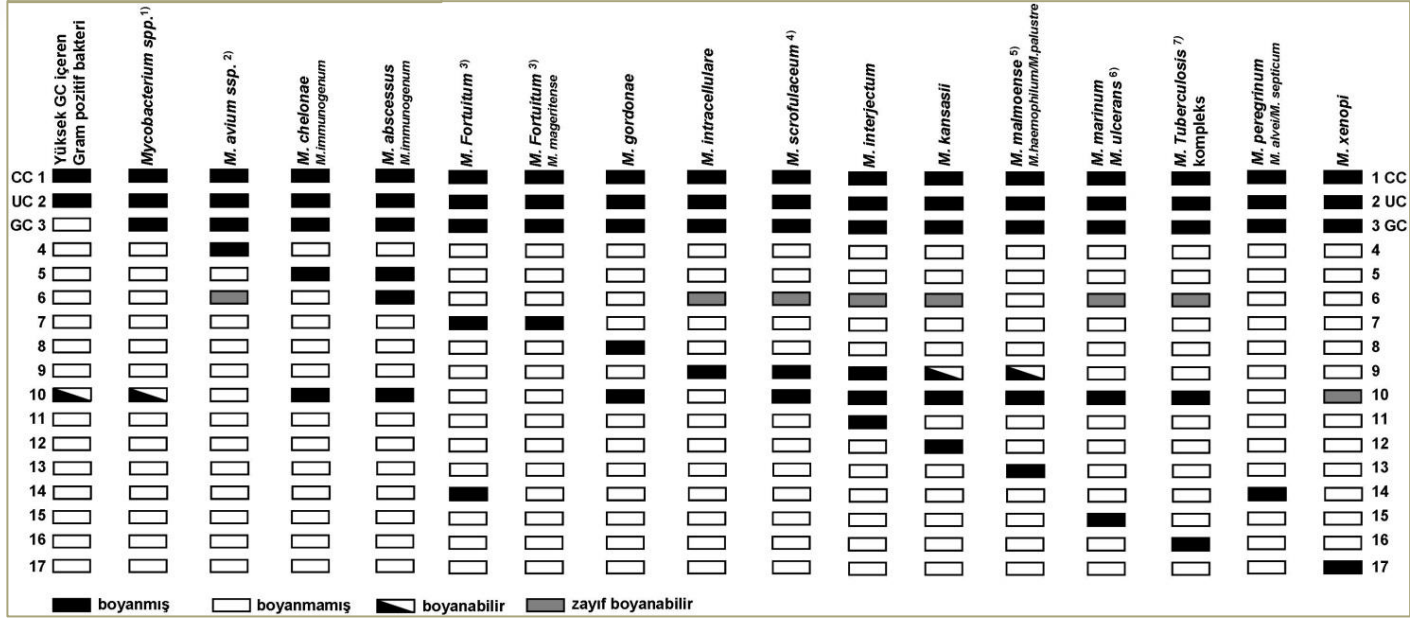
Prob hibridizasyon testleri-3

- **Geno-Type MTBC/GenoType Mycobacterium CM/AS** sistemleridir (Hain Lifesince)
 - **GenoType MTBC** sisteminde.....MTBC üyelerinin ayrımı,
 - *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin ayrımını yapabilmek için 23S rRNA gen bölgesini hedef almaktadır.
 - *M bovis* BCG'nin identifikasyonu için RD1 (regions of difference, RD) delesyonunu kullanmaktadır.

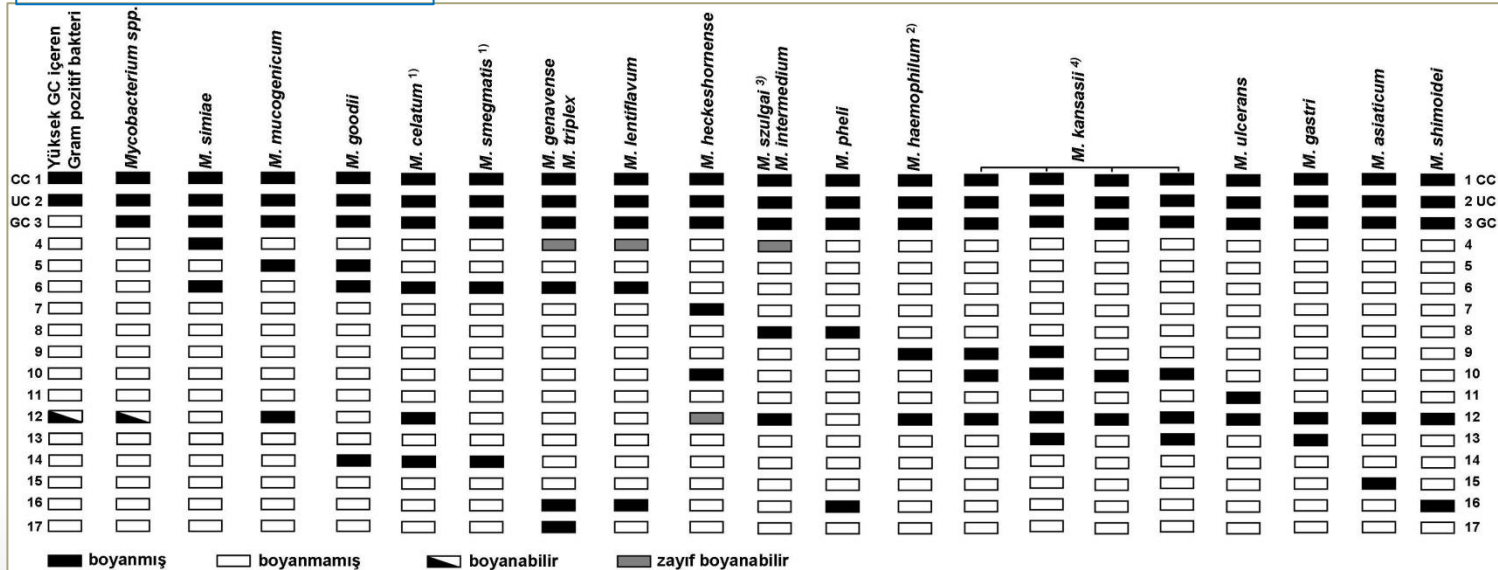


- **GenoType Mycobacterium CM/AS** sistemlerinde....MTBC kompleksi yanında >30 NTB türünün ayrımı yapılabilmektedir.

Mycobacterium CM



Mycobacterium AS



- Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. [Clin Microbiol Infect.](#) 2010 Aug;16(8):1161-4. doi
- Portekiz'deki 12 farklı hastaneden 3 yıl süreyle izole edilmiş toplam 1181 *Mycobacterim* izolatu Lizbon'daki bir merkezde moleküler yöntemlerle identifiye edilmiş:
- ***M. tuberculosis* kompleks tanımlaması:** “Accuprobe system”
- **TDM tanımlaması:** GenoType Mycobacterium (CM/AS)
 - İzolatların
 - 1032 (87.4%)’si MTBK
 - 149 (% 12.6) TDM
 - **GenoType Mycobacterium (CM/AS) yöntemiyle TDM’lerin %96.6’sı tanımlanabilmiş.**

Prob Hibridizasyon yöntemi-4

GENOQUICK MTB (Hain Lifesince)

Klinik örneklerden *M. tuberculosis* kompleks tespiti için geliştirilmiş hızlı bir LiPA testi

Test Principle and Duration of GenoQuick® MTB



DNA extraction
(30 minutes)



PCR
(approx. 2 hours)



Detection
(10 minutes)

This means:



Valid results
on the same day!

Reaction zones of the GenoQuick® MTB



Conjugate Control
Amplification Control
MTB

- Use of a new qualitative **molecular dipstick assay** for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive and smear-negative clinical specimens (**The Genoquick® MTB** (Hain Lifescience, Nehren, Germany))
- D. Papaventsis*, P. Ioannidis, S. Karabela, I. Marinou, E. Konstantinidou, A. Skouroglou, M. Panagi, E.D. Vogiatzakis (Athens, GR) **22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)** 31.03.2012 - 03.04.2012
- Test edilen örnek sayısı: 60; 48 balgam

- Mikroskopi
 - Pozitif: 32
 - Negatif: 27

- Sonuç:

	Mikroskopi + (%)	Mikroskopi - (%)
Duyarlılık	91	91
Özgüllük	70	69
PPD	87.5	66.7
NPD	77.8	91.7

Baz dizi analiz çalışmaları

- 16S rRNA,
- 16S-23S *internal transcribed spacer* (ITS)
- *hsp65*,
- *rpoB*,
- Hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedirler
 - Ngan GJY, et al. Lett Appl Microbiol 2011;52:546–54
 -



Ribozomal RNA operonu

DNA BAZ DİZİ ANALİZ ZAMAN ÇİZELGESİ



16S rDNA Dizileme

- 16S rDNA gen bölgesi tüm bakteri cinsleri ve türleri arasında korunmuştur.
- Genel olarak 16S rDNA geninin 1500- 5500 baz çiftlik (aşırı değişken) bölgesi tanımlamada kullanılır.
- 16S rDNA analizi bakteri tanımlanmasında **altın standart olarak kabul edilmektedir.**
- **Yüksek düzeyde benzer türleri ayırmada yetersiz**
 - *M tuberculosis* kompleks içerisinde yer alan türleri ayırt etmede yetersiz.
 - Slany M, Pavlik I. J Mol Microbiol Biotechnol. 2012;22(4):268-76.

Nükleik asit dizilemenin sınırlamaları

%100 benzerlik gösteren türleri ayırt edemiyor

- *M. bovis*, *M. microti*, *M. tuberculosis* ve *M. africanum*
- *M. chelonae* ve *M. abscessus*
- *M. genavensae* ve *M. simiae*
- *M. kansasii* ve *M. gastri*
- *M. peregrinum* ve *M. septicum*
- *M. fortuitum* ve *M. farcinogenes* ve *M. porcinum*
- *M. murale* ve *M. tokaiense*

Organism(s) identified by phenotypic methods	No. of isolates	Result obtained when organisms were identified to species level or group or complex level by using <1% match score and MicroSeq 500 database		
		% Concordant results ^a	Distance score range (%)	Sequencing-based identification (no. of isolates)
<i>M. abscessus</i> ^b	1	100	0.0	<i>M. chelonae-M. abscessus</i> (1)
<i>M. avium-M. intracellulare</i> complex	6	66.7	0-0.97	<i>M. avium</i> (1), <i>M. malmoense</i> (1), <i>M. paratuberculosis</i> (3), <i>M. simiae-M. genavense</i> (1)
<i>M. avium-M. intracellulare-M. scrofulaceum</i> complex	11	54.5	0-0.79	<i>M. scrofulaceum</i> (6), <i>M. gilvum</i> (1), <i>M. intermedium</i> (1), <i>M. kansasii-M. gastri</i> (1), <i>M. novocastrense</i> (2)
<i>M. alvei</i>	1	100	0.2	<i>M. alvei</i> (1)
<i>M. asiaticum</i>	11	100	0-0.78	<i>M. asiaticum</i> (11)
<i>M. aurum</i>	7	85.7	0-0.2	<i>M. neoaurum</i> (6), <i>M. obuense</i> (1)
<i>M. celatum</i>	3	66.6	0.19	<i>M. celatum</i> (2), <i>M. simiae-M. genavense</i> (1)
<i>M. chelonae</i>	7	85.7	0-0.60	<i>M. chelonae-M. abscessus</i> (6), <i>M. porcinum</i> (1)
<i>M. chelonae-M. abscessus</i>	18	100	0-0.6	<i>M. chelonae-M. abscessus</i> (18)
<i>M. flavescens</i>	1	100	0.38	<i>M. novocastrense</i> (1)
<i>M. fortuitum-M. peregrinum</i>	8	100	0-0.2	<i>M. farcinogenes</i> (3), <i>M. septicum-M. peregrinum</i> (3), <i>M. porcinum</i> (2)
<i>M. fortuitum</i>	10	80.0	0-0.6	<i>M. fortuitum-M. fortuitum</i> subsp., <i>M. acetamidolyticum</i> (6), <i>M. peregrinum</i> (2), <i>M. mageritense</i> (1), <i>M. alvei</i> (1)
<i>M. gastri</i>	1	100	0	<i>M. kansasii-M. gastri</i> (1)
<i>M. gordonae</i>	5	100	0-0.78	<i>M. gordonae</i> (5)
<i>M. haemophilum</i>	8	100	0-0.58	<i>M. haemophilum</i> (8)
<i>M. hassiacum</i>	1	100	0	<i>M. hassiacum</i> (1)
<i>M. interjectum</i>	7	57.1	0-0.80	<i>M. interjectum</i> (4), <i>M. simiae-M. genavense</i> (3)
<i>M. intermedium</i>	1	100	0.20	<i>M. intermedium</i> (1)
<i>M. kansasii</i>	6	100	0-0.39	<i>M. kansasii-M. gastri</i> (6)
<i>M. mageritense</i>	5	100	0-0.20	<i>M. mageritense</i> (5)
<i>M. malmoense</i>	5	80	0	<i>M. malmoense</i> (4) <i>M. novocastrense</i> (1)
<i>M. marinum</i>	7	100	0	<i>M. marinum</i> (7)
<i>M. mucogenicum</i>	18	100	0-0.97	<i>M. mucogenicum</i> (18)
<i>M. nonchromogenicum</i>	9	100	0.97	<i>M. nonchromogenicum</i> (9)
<i>M. obuense</i>	1	100	0	<i>M. obuense</i> (1)
<i>M. peregrinum</i>	2	100	0	<i>M. peregrinum-M. septicum</i> (1), <i>M. farcinogenes</i> (1)
<i>M. porcinum</i>	1	100	0	<i>M. porcinum</i> (1)
<i>M. scrofulaceum</i>	11	42.8	0.30-0.59	<i>M. scrofulaceum</i> (4), <i>M. pulveris</i> (1), <i>M. neoaurum</i> (1), <i>M. gilvum</i> (1), <i>M. novocastrense</i> (4)
<i>M. simiae</i>	15	100	0.0-0.80	<i>M. simiae-M. genavense</i> (14)

J Clin Microbiol.
2003 April; 41(4):
1447-1453.

PCR-RFLP

- DNA eldesi



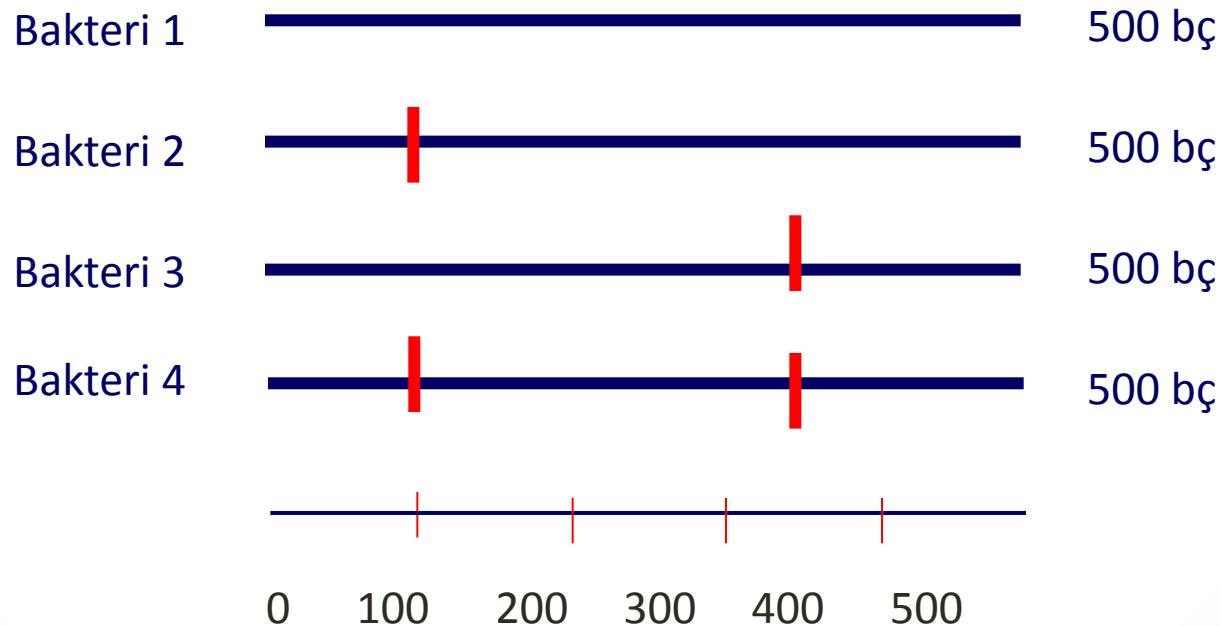
- *rDNA*
- *Hsp65*
- *rpoB*

- Amplifikasyon (PCR)

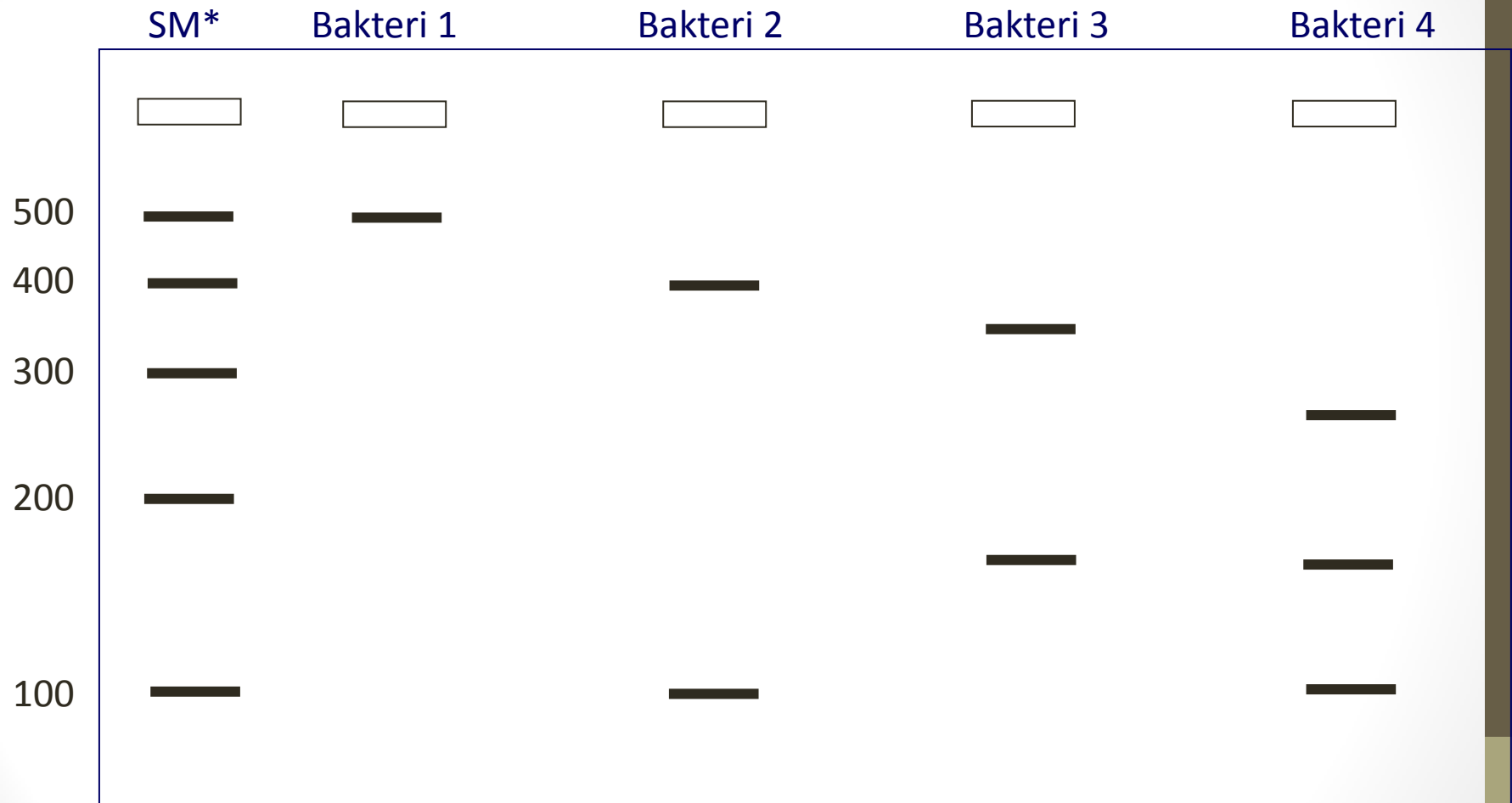


PCR-RFLP

- **Restriksiyon**
- Enzimin spesifik dizilerden kesim yapabilmesi için PCR ürünleri restriksiyon enzimi ile karıştırılarak 37 C'de bir süre (2-12 saat) enkübe edilir



PCR-RFLP



PCR-RFLP

- ***hsp65***

- 439 bç'lik parça *NruI* ve *BamHI* ile kesilir
- *M.tuberculosis* kompleks'in TDM'lerden ayrımını sağlar.
- 310 MTBK suşunu %95 doğrulukla tanımlamış.
- [Varma-Basil M,](#) et al.[J Clin Microbiol.](#) 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]

- ***rpoB***

- 360 bç'lik parça *HaeIII* ve *MspI* ile kesilir
- *M.tuberculosis* kompleks'in tamamı,
- hızlı üreyenlerin %96'sı
- yavaş üreyenlerin %53'ü doğru tanımlanmış

- **16S rDNA**

- 475 bç'lik parça *Hae II* ve *CfoI* ile kesilir
- *M.tuberculosis* kompleks'in tamamı
- 22 TDM türünün 19'u tanımlanmış

1 2 3 4 5 6 7

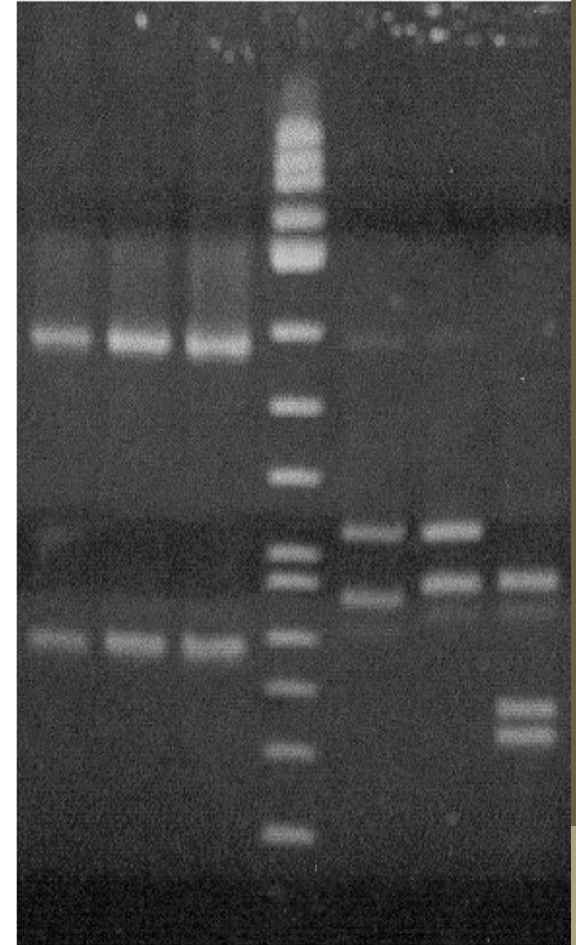


Table 1

Species identification of 321 isolates which had concordant results by both phenotypic and PRA-*hsp65* methods.

Phenotypic identification	PRA- <i>hsp65</i> ^b	N (%)
<i>M. avium</i> complex (146) ^a	<i>M. avium</i> 1	107 (33.5)
	<i>M. avium</i> 2	24 (7.5)
	<i>M. avium</i> 3	1 (0.3)
	<i>M. intracellulare</i> 1	13 (4.1)
	<i>M. intracellulare</i> 4	1 (0.3)
<i>M. kansasii</i> (95)	<i>M. kansasii</i> 1	95 (29.7)
<i>M. gordonae</i> (30)	<i>M. gordonae</i> 1	2 (0.6)
	<i>M. gordonae</i> 3	19 (6.0)
	<i>M. gordonae</i> 4	2 (0.6)
	<i>M. gordonae</i> 5	1 (0.3)
	<i>M. gordonae</i> 7	3 (0.9)
	<i>M. gordonae</i> 8	3 (0.9)
<i>M. fortuitum</i> complex (24)	<i>M. fortuitum</i> 1	21 (6.6)
	<i>M. peregrinum</i> 2	1 (0.3)
	<i>M. peregrinum</i> 3	2 (0.6)
<i>M. chelonae</i> complex (21)	<i>M. chelonae</i> 1	5 (1.6)
	<i>M. abscessus</i> 1	14 (4.4)
	<i>M. abscessus</i> 2	2 (0.6)
<i>M. marinum</i> (2)	<i>M. marinum</i> 1	2 (0.6)
<i>M. terrae</i> complex (2)	<i>M. terrae</i> 1	1 (0.3)
	<i>M. nonchromogenicum</i> 2	1 (0.3)
<i>M. szulgai</i> (1)	<i>M. szulgai</i> 1	1 (0.3)

^a Number of isolates.

Table 6

Summary of concordance among species identification results obtained by PRA-*hsp65*, phenotypic evaluation and sequence analysis of the *hsp65* gene.

<i>hsp65</i> sequence N	PRA- <i>hsp65</i>		Phenotypic identification			
	Concordant	New Pattern	Discordant	Concordant	Ambiguous	Discordant
Not done ^a	321	321	--	--	321	--
Done	113	71	30	12	17	63
Total	434	392 (90.3%)	30 (6.9%)	12 (2.8%)	338 (77.9%)	63 (14.5%)
					33 (7.6%)	

^a Isolates for which species identification by PRA-*hsp65* and phenotypic/biochemical evaluation were concordant were not sequenced. Based on prior reports by the authors and others, sequencing *hsp65* in such isolates almost invariably confirms the species identification of the other methods.

Multipleks Gerçek Zamanlı PZR

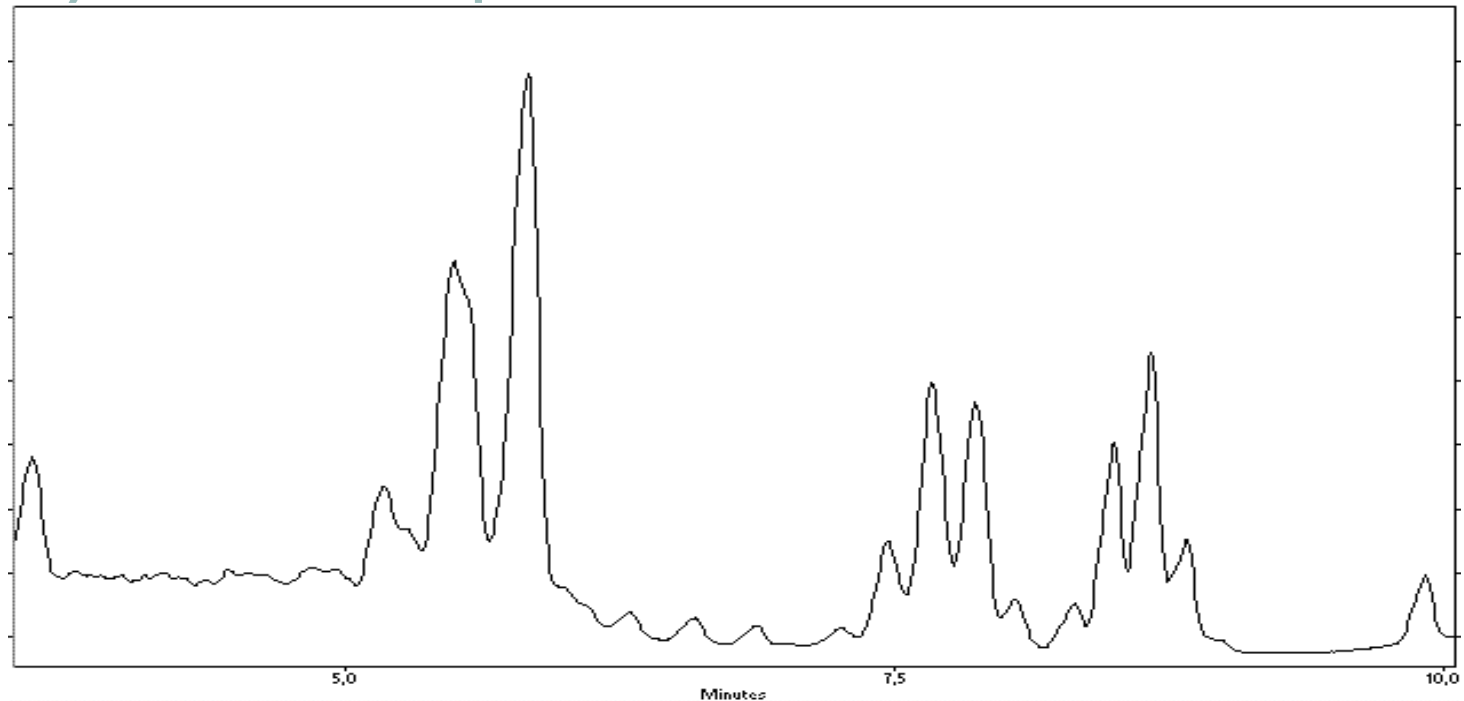
- Multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon ve takiben uygulanan erime sıcaklığı (*melting curve*) analiziyle 23 mikobakteri türünün ayrımı başarıyla yapılabilmektedir.
- Yöntem, referans suşlar (77) ve klinik izolatlar (369) üzerinde denenmiştir;
- *M. tuberculosis* kompleks suşlarının tanımlanmasında %100
-
- TDM tanımlanmasında ise %94 oranında başarılı bulunmuştur.
- [Kim JU](#), et al. J [Clin Microbiol](#). 2012;50(2):483-7.

Primer mixture ^a	Primer target	Target gene ^b	Sequence(5'→3')	T _m (°C) ^c
I	<i>M. gastri</i>	ITS	GGGCTTGTCTTGGACTCGT	75.13 ± 0.11
			TGGTGGGACAACACTCTTGG	
	<i>M. xenopi</i>	ITS	GTTGGGCAGCAGGCAGTA	80.97 ± 0.43
			GTTGCCTCAAAACCCAACAG	
	<i>M. fortuitum</i>	ITS	CCCGAGCCGTGAGGAAC	81.65 ± 0.26
			CAATAGTGTGTCTGGCAGTCAAAA	
II	MTC	IS6110	CGAACTCAAGGAGCACATCAG	84.47 ± 0.41
			CAGGGTTAGCCACACTTTGC	
	NTM	16S rRNA	ATGTYTTSTGGKGSAAAGCTTT	88.14 ± 0.51
			GTAGGAGTCTGGGCGCGTA	
	<i>M. abscessus</i>	ITS	ATGAACTAGGGAACATAAAGTATGCA	72.72 ± 0.74
			AGGATTTACAAAACATATTCACCAAGT	
III	<i>M. intracellulare</i>	16S rRNA	GGTCTAATACCGGATAGGACCTTTAG	75.38 ± 0.31
			GCAAAAGCTTTCCACCAAAA	
	<i>M. szulgai</i>	ITS	GGTCCTGAGGCAACACTCA	80.00 ± 0.42
			CCAAGATGGTGGGACAACAG	
	<i>M. terrae</i>	ITS	GATTCCCCCGTACCTCACAT	83.09 ± 0.33
			ACCACCGACCACCCACTAC	
III	<i>M. avium</i>	16S rRNA	GGGTCTAATACCGGATAGGACCT	73.55 ± 0.34
			CGCAAAAGCTTTCCACCAGA	
	<i>M. chelonae</i>	ITS	TGTCCACCCCGTGGATA	79.40 ± 0.25
			GTGCCAGCGTTTCAATTCTA	
	<i>M. kansasii/M. gastri</i>	16S rRNA	CGGAAAGGTCTCTTCGGAGAC	81.42 ± 0.20
			TTTCCCAGGCTTATCCTGGT	
III	<i>M. gordonae</i>	ITS	TGCAAGCCTTGAGTGGTCA	84.04 ± 0.33
			GGGGACAGCACCAGAGG	

HPLC

- Hücre duvarı mikololik asitleri bromofenaçil esterlerine çevrilir ve kromatografik yöntemle incelenir.
- Elde edilen kromatografik paternler veri tabanında HPLC kütüphanesinde bulunan paternlerle görsel olarak karşılaştırılır

Mycobacterium sp. E498



MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*)

- Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometre
- MALDI biyomoleküllerin (protein, peptit vb) analizine izin veren bir iyonizasyon tekniğidir
- Kütle Spektrometre (MS) yüklü partiküllerin kütle yük oranını ölçen analitik bir tekniktir

- [Anal Chim Acta](#). 2012 Feb 24;716:133-7. doi: 10.1016/j.aca.2011.12.016. Epub 2011 Dec 17.
- **Rapid identification and classification of *Mycobacterium* spp. using whole-cell protein barcodes with matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in comparison with multigene phylogenetic analysis.**
- [Wang J](#), [Chen WF](#), [Li QX](#).
- **Source**
- Department of Molecular Biosciences and Bioengineering, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822, USA.
- **Abstract**
-The genus *Mycobacterium* contains more than 154 species that are taxonomically very close and require use of multiple genes including 16S rDNA for phylogenetic identification and classification. **Six strains of five *Mycobacterium* species were selected as model bacteria in the present study because of their 16S rDNA similarity (98.4-99.8%) and the high similarity of the concatenated 16S rDNA, rpoB and hsp65 gene sequences (95.9-99.9%), requiring high identification resolution.** The classification of the six strains by MALDI TOF MS protein barcodes was consistent with, but at much higher resolution than, that of the multi-locus sequence analysis of using 16S rDNA, rpoB and hsp65. **The species were well differentiated using MALDI TOF MS and MALDI BioTyper™ software after quick preparation of whole-cell proteins.** Several proteins were selected as diagnostic markers for species confirmation. An integration of MALDI TOF MS, MALDI BioTyper™ software and diagnostic protein fragments provides a robust phenotypic approach for bacterial identification and classification.