



Estudio de sensibilidad de fosfomicina en enterobacterias y microorganismos multidrogorresistentes de muestras de pacientes del Hospital General «Dr. Gaudencio González Garza» del CMN «La Raza»

Zamudio-Chávez O,* Méndez-Tovar S,[†] Apodaca-Tomas K,[‡] Cruz-Hernández M[‡]

Palabras clave:

Sensibilidad, resistencia, fosfomicina, enterobacterias, infecciones del tracto urinario.

Key words:

Sensitivity, resistance, fosfomycin, enterobacteria, urinary tract infections.

* Médico Residente de Patología Clínica.
Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital General «Dr. Gaudencio González Garza» del Centro Médico Nacional «La Raza», Universidad Nacional Autónoma de México.
† Químico Bacteriólogo Parasitólogo adscrito al Laboratorio de Microbiología Médica, UMAE «La Raza», CDMX.

Recibido:
23/08/2017
Aceptado:
31/08/2017

RESUMEN

Introducción: El aumento constante de la resistencia microbiana es actualmente un problema a nivel mundial y ha llevado a muchos países a elaborar planes nacionales de control y a investigadores a diseñar nuevas estrategias terapéuticas para las infecciones. **Objetivos:** Conocer la sensibilidad a fosfomicina de las enterobacterias y microorganismos multidrogorresistentes aislados de diferentes especímenes de laboratorio. **Material y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo analítico en donde se recolectaron 100 cepas, especialmente de la familia Enterobacteriaceae y otras multidrogorresistentes, aisladas de pacientes hospitalizados y de terapia ambulatoria; fueron identificadas por el sistema automatizado MALDI-TOF (bioMérieux) y VITEK 2XL; se sometieron a un reto de sensibilidad contra fosfomicina por el método de Kirby-Bauer. **Resultados:** Se identificaron 98% de cepas sensibles y 2% resistentes a este antibiótico. **Conclusión:** La fosfomicina puede considerarse como una opción terapéutica adecuada para enterobacterias y cepas multidrogorresistentes con base en la sensibilidad estudiada.

ABSTRACT

Introduction: Nowadays, the constant increase of microbial resistance is a global problem; this has led many countries to develop national control plans and many researchers to design new therapeutic strategies to treat infections. **Objectives:** To find out the fosfomycin sensitivity of the isolated enterobacteria and multidrug-resistant microorganisms from different laboratory specimens. **Material and methods:** An analytical and descriptive study was carried out where 100 strains were collected, especially from the Enterobacteriaceae family and other multidrug-resistant microorganisms, isolated from hospitalized patients and from outpatient therapy; they were identified by the automated system MALDI-TOF (bioMérieux) and VITEK 2XL; they were tested by a sensitivity challenge to fosfomycin through the Kirby-Bauer method. **Results:** 98% susceptible and 2% resistant strains were identified. **Conclusion:** Fosfomycin can be considered a suitable therapeutic option for enterobacteria and multidrug-resistant strains based on the sensitivity studied.

INTRODUCCIÓN

El aumento continuo de la resistencia antimicrobiana es actualmente un problema de salud pública a nivel mundial y ha llevado a muchos países a elaborar planes nacionales de control y vigilancia epidemiológica ante la tendencia alcista de los microorganismos multidrogorresistentes (MDR) a los diferentes antibióticos utilizados en terapias empíricas y de primera línea. Por ello, investigadores diseñan nuevas estrategias para el tratamiento

de las infecciones a partir del resurgimiento de antimicrobianos utilizados en el pasado, como colistín y fosfomicina.^{1,2} En sus inicios, este último fue llamado originalmente fosfomicina; fue identificado en España en 1969 como un derivado del ácido fosfónico a partir de cultivos de *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* y *Streptomyces wedmorensis*.^{3,4} Debido a sus características químicas propias no guarda relación con ningún otro tipo de agente antimicrobiano. Su mecanismo de acción es mediante la inactivación

Correspondencia:
Zamudio-Chávez O
Calzada Vallejo S/N,
Esquina Av.
Jacarandas,
Col. La Raza, 02990,
Del. Azcapotzalco,
México, CDMX.
Tel: 55-54-04-05-79
E-mail: drzamudio.
oscar@gmail.com

vación de la N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa citósica (MurA), lo que evita la formación de ácido N-acetilmurámico a partir de N-acetilglucosamina y fosfoenolpiruvato, que es el paso inicial en la formación de la cadena de peptidoglicano en la pared bacteriana.⁵ Mediante un sistema de transporte de glicerol-3-fosfato (GlpT), puede ingresar a las bacterias susceptibles, así como también por un mecanismo de absorción de fosfato de hexosa (UhpT) inducido en presencia de glucosa-6-fosfato, lo que proporciona una alternativa al sistema GlpT para su entrada en las células. Un defecto en cualquiera de estos dos mecanismos condiciona resistencia a este antibiótico. Se considera un agente antimicrobiano de amplio espectro, por tener una excelente actividad bactericida frente a grampositivos y gramnegativos.⁶⁻⁸

Este antibiótico se encuentra disponible como sales de fosfomicina para administración oral: fosfomicina trometamina y fosfomicina cálcica. Ambas sales se absorben rápidamente después de la administración oral, pero la biodisponibilidad es significativamente mejor en la fosfomicina trometamina (40%) que en la fosfomicina cálcica (12%), ya que esta última es inactivada por la hidrólisis en el medio ácido gástrico. La principal contraindicación para su uso es la hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de su formulación. Se ha utilizado principalmente en el tratamiento de la infecciones del tracto urinario (UTI) desde el año 1988. Es uno de los antibióticos empleados en todo el mundo contra el cual las tasas de resistencia de *E. coli* todavía se mantienen en niveles extremadamente bajos.⁹⁻¹¹

Dentro de las diferentes familias de bacterias, la *Enterobacteriaceae* es de las que representa mayor problemática en resistencia terapéutica. Diferentes agentes antimicrobianos solían ser activos contra esta familia, incluyendo combinaciones de inhibidores de b-lactamasa, cefalosporinas, carbapenems, sulfonamidas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Sin embargo, la resistencia ha empeorado sustancialmente en la última década a estos antimicrobianos. *Escherichia coli* es el prototipo de esta familia; la fosfomicina tiene una excelente actividad contra este patógeno, así como una buena actividad *in vitro* contra

K. pneumoniae, con tasas de susceptibilidad de entre 70 y 85%, y ligeramente mayores contra *Proteus mirabilis*, 80-97%.¹²

Es importante destacar que la fosfomicina tiene una excelente actividad contra *Enterobacteriaceae* productoras de b-lactamasa de espectro extendido (BLEE), contra *S. aureus* susceptible a la meticilina y resistente (MRSA), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de aproximadamente 1 mg/mL, pero puede haber un subgrupo de cepas altamente resistentes en el MRSA. También es activa contra la mayoría de *Staphylococcus* spp. coagulasa-negativos.¹²⁻¹⁴

Actualmente, se cuenta con varios métodos y técnicas de laboratorio para determinar la resistencia y sensibilidad de los antibióticos a las diferentes familias bacterianas; el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) recomienda utilizar la dilución en agar o el método de difusión en disco para la sensibilidad a fosfomicina en aislamientos de *E. coli* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de Kirby-Bauer. El punto de corte actual para la susceptibilidad a fosfomicina es $\leq 64 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para la MIC y $\geq 16 \text{ mm}$ para difusión en disco. Sin embargo, el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST) define el punto de corte de $\leq 32 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus* spp.¹⁵⁻¹⁸

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento bacteriano

Se recabó un total de 100 aislamientos bacterianos consecutivos no duplicados, especialmente de la familia *Enterobacteriaceae* y multidrogoresistentes, de muestras clínicas tomadas de pacientes hospitalizados y de población ambulatoria en el Hospital General «Dr. Gaudencio González Garza» del Centro Médico Nacional «La Raza» del IMSS en un periodo comprendido del 1 de marzo de 2016 al 25 de septiembre del mismo año. Fueron 80 urocultivos, seis de secreción bronquial, seis hemocultivos, dos de herida quirúrgica, dos de líquido peritoneal, dos de expectoración, una de líquido biliar y una biopsia de piel (*figura 1*). Para incluirse en el estudio, los microorganismos tenían que presentar resistencia a más de tres antibióticos, con base en la definición de la EUCAST para MDR.

Identificación bacteriana

Las muestras de los pacientes fueron recibidas en la sección de microbiología médica, identificadas y distribuidas por tipo de espécimen; se realizó el aislamiento y siembra en un medio de cultivo primario (agar gelosa sangre), se incubaron por 24 horas y, posteriormente, se realizó la identificación macroscópica y microscópica de las colonias; cada aislamiento fue llevado al sistema automatizado VITEK 2XL bioMérieux para determinar su sensibilidad a

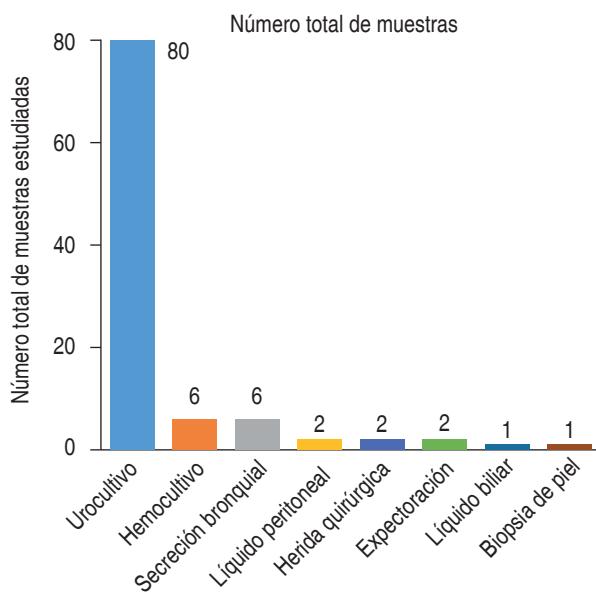


Figura 1. Total de muestras recabadas por la sección de microbiología médica en el Departamento de Patología Clínica.

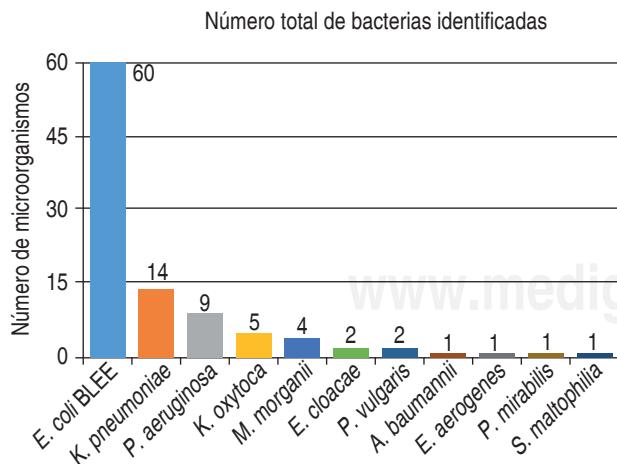


Figura 2. Total de microorganismos identificados por el sistema automatizado MALDI-TOF MS.

16 diferentes antimicrobianos, y mediante espectrometría de masa, con el sistema automatizado MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) de bioMérieux, se realizó la identificación (*figura 2*).

Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Ya identificado el microorganismo y obtenido el antibiograma por el sistema VITEK 2XL a los siguientes antibióticos: ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam cefazolina, ceftriaxona, cefepime, aztreonam, ertapenem, meropenem, amikacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, tigeciclina, nitrofurantoína y trimetroprima/sulfametoxazol, se realizó el sembrado por estría masiva en el medio de cultivo en agar Müller-Hinton utilizando la técnica de Kirby-Bauer, a una concentración de 0.5 del nefelómetro de McFarland; se colocó un disco de 50 mg de fosfomicina y se incubó a 35 ± 2 °C. Luego, se midieron los halos de inhibición a las 24 horas, de acuerdo con los lineamientos del (CLSI).^{19,20} Por medio de bitácoras y del software Modulab con el que cuenta el laboratorio, se llevó un control sobre los microorganismos reportados por los sistemas automatizados, así como las mediciones en milímetros de los diámetros (*figura 3*). Las técnicas de difusión que requieren medir los diámetros

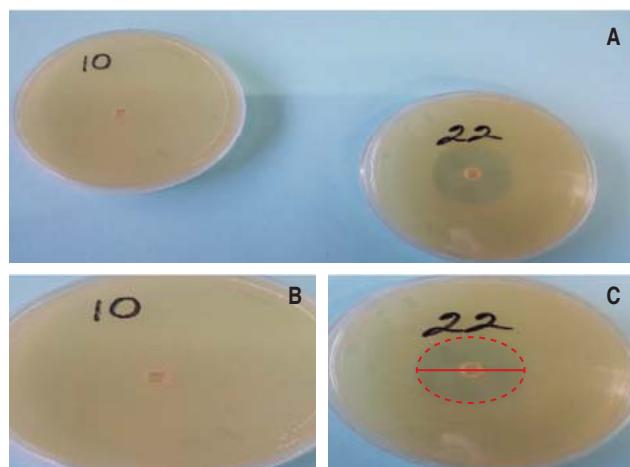


Figura 3. Agar Müller-Hinton con disco de fosfomicina de 50 mg; A) se presenta el medio de cultivo de dos cepas bacterianas diferentes sembradas por estría masiva; B) se observa ausencia de halo de inhibición correspondiente a *P. aeruginosa* menor de 16 mm, secundario a resistencia bacteriana a fosfomicina; C) presencia de halo de inhibición representado por las líneas discontinuas mayor de 16 mm, representado por línea continua horizontal correspondiente a *E. coli* sensible a fosfomicina.

de las zonas proporcionan estimaciones reproducibles de la sensibilidad de las bacterias a la fosfomicina. Los resultados de las pruebas se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: un diámetro de la zona de 16 mm significa una cepa sensible; el diámetro de la zona de 13-15 mm significa una sensibilidad intermedia, y el diámetro de la zona ≤ 12 mm significa resistente.

Se usaron *E. coli* ATCC 25922 (BLEE negativa) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (BLEE positivo) como cepas de control de calidad en las pruebas fenotípicas de producción de BLEE.

Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software de Ciencias Sociales para Windows versión 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los datos de la enumeración se expresaron como valores porcentuales.

RESULTADOS

Se encontraron 98 cepas sensibles y dos resistentes a fosfomicina (figura 4 y cuadro I). Además, 100% de *E. coli* fueron BLEE, 89% resistentes a ampicilina, 72% a trimetroprim-sulfametoxazol, 70% a cefazolina, 57% a quinolonas, 62 % a ceftriaxona, 62% a ampicilina-sulbac-tam, 57% a ciprofloxacino, 52% a cefepime (figura 5). En este estudio, el microorganismo de mayor frecuencia en urocultivo fue *E. coli*, en secreción bronquial, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. maltophilia*; en hemocultivos, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *P. aeruginosa*.

DISCUSIÓN

El aumento de la resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública actualmente, en particular, la resistencia de los uropatógenos como *E. coli*. Esto está

llevando al resurgimiento de antibióticos como fosfomicina, agente de amplio espectro.²¹

El perfil de multirresistencia que expresan estas cepas ocasiona un problema terapéutico importante, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad. Tal es el caso del incremento de la resistencia bacteriana contra trimetroprim-sulfametoxazol y las quinolonas, por lo que se requiere plantear alternativas terapéuticas, especialmente en el tratamiento ambulatorio oral de las infec-

Cuadro I. Se presenta el total de cepas sensibles y resistentes a fosfomicina expresado en porcentaje.

Cepas	Resistencia y sensibilidad total			
	Sensi-bles (n)	Resis-tentes (n)	Sensibles (%)	Resisten-tes (%)
<i>E. coli</i> BLEE	60	0	100	0
<i>K. pneumoniae</i>	14	0	100	0
<i>P. aeruginosa</i>	8	1	88.88	11.11
<i>K. oxytoca</i>	5	0	100	0
<i>M. morganii</i>	3	1	75	25
<i>E. cloacae</i>	2	0	100	0
<i>P. vulgaris</i>	2	0	100	0
<i>A. baumannii</i>	1	0	100	0
<i>E. aerogenes</i>	1	0	100	0
<i>P. mirabilis</i>	1	0	100	0
<i>S. maltophilia</i>	1	0	100	0
Total	98	2		

Resultados expresados en porcentaje sobre la resistencia y sensibilidad por microorganismo aislado en la sección de microbiología médica.

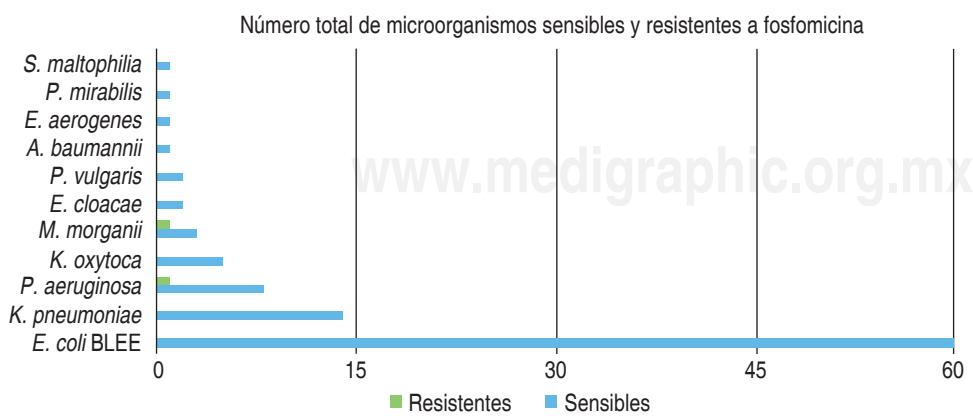


Figura 4.

Representación gráfica sobre la resistencia y sensibilidad por mi-croorganismo.

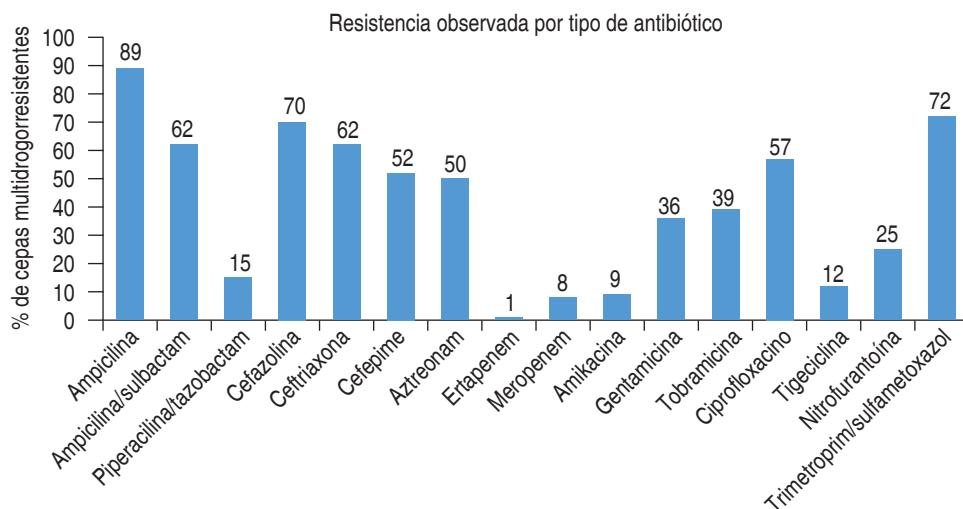


Figura 5.

Resistencia a los diferentes antimicrobianos determinada por medio del sistema automatizado VITEK 2XL del total de cepas aisladas en la sección de microbiología médica.

ciones causadas por *E. coli* BLEE. Varios estudios previos han demostrado que la fosfomicina puede actuar sinérgicamente con beta-lactámicos y aminoglucósidos.²²⁻²⁴ Sin embargo, este agente antimicrobiano todavía no se utiliza comúnmente en México y no está incluido en el cuadro básico de los diferentes servicios prestadores de salud en el país, a pesar de que se sabe que la tasa de resistencia a fosfomicina en cepas clínicas de *E. coli* sigue siendo muy baja. La susceptibilidad antimicrobiana de las enterobacterias a la fosfomicina no se ha evaluado todavía en México. En este estudio, se intentó evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de la fosfomicina contra cepas MDR.

En un estudio realizado por Hsin-Yi Liu y sus colaboradores en Taiwán en el año 2010, se recogieron 200 aislamientos de orina, incluidos 134 de *E. coli* productor de BLEE y 66 de *K. pneumoniae* productora de BLEE; se demostró que la fosfomicina tiene una buena actividad antimicrobiana contra *E. coli* BLEE, pero una menor actividad frente a *K. pneumoniae*. Por ello, los datos obtenidos en nuestro estudio concuerdan con la literatura internacional.²⁵

El uso de las tecnologías actuales como MALDI-TOF MS y VITEK 2XL ha revolucionado la identificación bacteriana en los laboratorios microbiológicos como una herramienta innovadora, rápida, precisa y económica que se ha integrado en el flujo de trabajo del laboratorio, reemplazando las técnicas bioquímicas o moleculares tradicionales.^{26,27}

El uso de este antimicrobiano en el ambiente hospitalario ha sido limitado desde hace varios años, ya que su costo es elevado; sin embargo, es una opción terapéutica que debería tomarse en cuenta en el sistema de salud para los pacientes de difícil manejo sin más opciones de

tratamiento, lo que se vería reflejado en la disminución en la morbilidad, días de estancia hospitalaria y costos de atención.

Nuestro estudio demuestra que la fosfomicina mantiene su actividad *in vitro* frente a cepas productoras de diferentes familias y tipos BLEE; de momento, no existe resistencia cruzada con otros grupos de antimicrobianos, lo que la convierte en una buena alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por estos patógenos multirresistentes.

Como los datos de susceptibilidad a la fosfomicina procedentes de los Estados Unidos de América son limitados, creemos que estos respaldan las directrices actuales de la IDSA, que recomiendan el uso de fosfomicina. Los futuros programas de vigilancia proporcionarán información valiosa en relación con el estado actual de la resistencia a los antimicrobianos y pueden conducir a una prescripción más adecuada.

Este estudio tiene varias limitaciones, incluyendo haberse realizado en solo un centro hospitalario, así como los números de aislamientos recolectados para varias especies, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no hay conflicto de intereses. También declaran que no se requiere aprobación ética.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado bajo la autorización del Departamento de Patología Clínica del Hospital General «Dr. Gaudencio González Garza» del Centro Médico Nacional «La Raza» del IMSS.

Los autores expresan su agradecimiento al personal de la sección de microbiología médica en la colección de las cepas.

REFERENCIAS

1. Martin D, Fougnot S, Grobst F, Thibaut-Jovelin S, Ballereau F, Gueudet T et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *J Infect.* 2016; 72 (2): 201-206.
2. Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39 (1): 45-51.
3. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ et al. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Science.* 1969; 166 (3901): 122-123.
4. De Cueto M, Hernández JR, López-Cerero L, Morillo C, Pascual A. Actividad de fosfomicina sobre cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2006; 24 (10): 613-616.
5. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci.* 1974; 235 (0): 364-386.
6. Kadner RJ, Winkler HH. Isolation and characterization of mutations affecting the transport of hexose phosphates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1973; 113 (2): 895-900.
7. Lu CL, Liu CY, Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Turnidge JD et al. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomycin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (9): 4295-4301.
8. Li Y, Zheng B, Li Y, Zhu S, Xue F, Liu J. Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in mainland China. *PLoS One.* 2015; 10 (8): e0135269.
9. Bergan T. Degree of absorption, pharmacokinetics of fosfomycin trometamol and duration of urinary antibacterial activity. *Infection.* 1990; 18 Suppl 2: S65-S69.
10. Patel SS, Balfour JA, Bryson HM. Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs.* 1997; 53 (4): 637-656.
11. Yilmaz N, Ağuş N, Bayram A, Şamlıoğlu P, Şirin MC, Derici YK et al. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* isolates as agents of community-acquired urinary tract infection (2008-2014). *Turk J Urol.* 2016; 42 (1): 32-36.
12. Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Kapaskelis A, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35 (5): 497-499.
13. Bouchillon SK, Badal RE, Hoban DJ, Hawser SP. Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of gram-negative bacilli in the United States: results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program: 2009-2011. *Clin Ther.* 2013; 35 (6): 872-877.
14. Neuner EA, Sekeres J, Hall GS, van Duin D. Experience with fosfomycin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (11): 5744-5748.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Wayne, PA: 2015.
16. Barry AL, Fuchs PC. In vitro susceptibility testing procedures for fosfomycin tromethamine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35 (6): 1235-1238.
17. Albur MS, Noel A, Bowker K, MacGowan A. The combination of colistin and fosfomycin is synergistic against NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model experiments. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 46 (5): 560-567.
18. Yeganeh-Sefidan F, Ghatalou R, Akhi MT, Sadeghi MR, Mohammadzadeh-Asl Y, Bannazadeh Baghi H. Fosfomycin, interesting alternative drug for treatment of urinary tract infections created by multiple drug resistant and extended spectrum β-lactamase producing strains. *Iran J Microbiol.* 2016; 8 (2): 125-131.
19. Cağan Aktaş S, Gençer S, Batirel A, Haciseyitoğlu D, Ozer S. Fosfomycin susceptibility of urinary *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase according to CLSI and EUCAST recommendations. *Mikrobiyol Bul.* 2014; 48 (4): 545-555.
20. Hirsch EB, Raux BR, Zucchi PC, Kim Y, McCoy C, Kirby JE et al. Activity of fosfomycin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary urine isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 46 (6): 642-647.
21. Okazaki M, Suzuki K, Asano N, Araki K, Shukuya N, Egami T et al. Effectiveness of fosfomycin combined with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using the efficacy time index assay. *J Infect Chemother.* 2002; 8 (1): 37-42.
22. Olay TA, Rodriguez A, Oliver LE, Vicente MV, Quecedo MC. Interaction of fosfomycin with other antimicrobial agents: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Antimicrob Chemother.* 1978; 4 (6): 569-576.
23. Hayami H, Goto T, Kawahara M, Ohi Y. Activities of beta-lactams, fluoroquinolones, amikacin and fosfomycin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from complicated urinary tract infections. *J Infect Chemother.* 1999; 5 (3): 130-138.
24. Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011; 44 (5): 364-368.
25. Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol.* 2017; 25 (6): 447-455.
26. Rennie RP, Brosnikoff C, Shokoples S, Reller LB, Mirrett S, Janda W et al. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol.* 2008; 46 (8): 2681-2685.