

邢进,刘娜,冯育芳,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测实验动物病原菌效果初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 83-88,97.

Xing J, Liu N, Feng YF, et al. Evaluation of the biotyper MALDI-TOF MS system for identification of pathogenic bacteria in laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 83-88,97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 03. 014

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测实验动物病原菌效果初探

邢 进¹, 刘 娜², 冯育芳¹, 张雪青¹, 崔生辉², 贺争鸣¹, 赵德明³, 岳秉飞^{1*}

(1.中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所,北京 102629; 2.中国食品药品检定研究院 食品化妆品检定所,北京 100050; 3.中国农业大学动物医学院,北京 100193)

【摘要】 目的 评价基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测实验动物病原菌的效果。**方法** 使用德国 Bruker Biotyper 系统对 40 株标准菌株及 384 株实验动物分离菌进行鉴定。**结果** Bruker Biotyper 检测标准菌株和分离株的准确率分别为 90.0%和 80.0%。对鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、志贺菌(*Shigella* spp.)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 生物型(*Rodentibacter heylii*)和支气管鲍特杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)的鉴定存在偏差。**结论** MALDI-TOF MS 方法高效、准确率高,可用于实验动物病原菌的快速鉴定。

【关键词】 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;病原菌;细菌检测;实验动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0083-06

Evaluation of the biotyper MALDI-TOF MS system for identification of pathogenic bacteria in laboratory animals

XING Jin¹, LIU Na², FENG yufang¹, ZHANG xueqing¹, CUI shenghui², He zhengming¹, Zhao deming³, YUE Bingfei^{1*}

(1. Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China.
2. Institute for Food and Cosmetics Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050.
3. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193)

【Abstract】 Objective To evaluate matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detection of pathogenic bacteria in laboratory animals. **Methods** In total, 40 standard strains and 384 laboratory animal isolates were identified using the Bruker Biotyper system. **Results** The accuracy rates of Bruker Biotyper to detect standard strains and isolates were 90.0% and 80.0%, respectively. There were biases in the identification of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica* biotype Heyl, and *Bordetella bronchiseptica*. **Conclusions** The MALDI-TOF MS method is highly efficient and accurate. It can be used for rapid identification of pathogenic bacteria in laboratory animals.

【Keywords】 MALDI-TOF MS, pathogenic bacteria, bacterial detection, laboratory animal

[作者简介]邢进(1979—),男,研究员,研究方向:实验动物微生物学。E-mail:xjvet@nifdc.org.cn

[通信作者]岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物质量控制。E-mail:y6784@126.com

根据我国实验动物微生物检测国家标准,病原菌的检测一直依赖于分离培养和血清学鉴定,不仅需要检测人员具有较丰富的经验,效率和准确性方面都亟待改进。因此分子生物学方法,比如 PCR、荧光定量 PCR 等已逐渐应用到实验动物病原菌检测当中。然而进行病原菌的 PCR 检测,但是需要对实验室实行严格的分区和污染控制。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)依靠激发微生物生成的蛋白质谱与专有数据库进行比较,以实现微生物的鉴定。其具有操作简单、高效、准确等诸多优势,已经成为微生物鉴定的一种快速而可靠的工具^[1]。目前国内外应用 MALDI-TOF MS 方法鉴定微生物效果的研究已广泛开展,其中与实验动物相关的病原菌主要有金黄色葡萄球菌^[2-3]、肺炎链球菌^[4]、乙型溶血性链球菌^[5]、绿脓杆菌^[6]、志贺菌^[7]、小肠结肠炎耶尔森氏菌^[8]、棒状杆菌^[9-10]、巴斯德杆菌^[11-12]、皮肤真菌^[13]等。然而尚缺乏针对实验动物病原菌整体鉴定效果的研究,本研究采用德国布鲁克公司的 Biotyper 微生物质谱检测系统对相关菌株进行鉴定,初步评价 MALDI-TOF MS 方法对实验动物病原菌的检测效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 标准菌株

40 株标准菌株,购自美国标准物质保藏中心(ATCC)、中国医学菌种保藏中心(CMCC)和中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)。见表 1。

1.1.2 分离菌株

384 株实验动物分离菌株包括沙门氏菌 4 株、金黄色葡萄球菌 21 株、绿脓杆菌 32 株、嗜肺巴斯德杆菌 315 株、多杀巴斯德杆菌 2、肺炎链球菌 1 株、肺炎克雷伯杆菌 3 株、产酸克雷伯杆菌 1 株、志贺菌 1 株、牛棒状杆菌 2 株、辛氏鲍特杆菌 1 株和嗜水气单胞菌 1 株。其中金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、牛棒状杆菌、绿脓杆菌和辛氏鲍特杆菌各有 1 株国际实验动物科学理事会(ICLAS)国际比对菌株。

1.2 主要试剂与仪器

哥伦比亚血琼脂培养基(Oxoid, CM0331),脱纤维羊血(北京路桥),厌氧袋和厌氧盒(三菱 MGC AnaeroPack), Nuclease-Free Water (Promega, P1193), PCR 反应试剂(TAKARA, R010 A), 细菌生化鉴定板(BD phoenix, 448505, 448008), 甲酸

(J&K, 299272), 基质溶液(Bruker IVD HCCA, 8255344)。16Sr DNA 扩增引物 FD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', RP2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'^[14](上海生工)。布鲁克微生物快速鉴定系统(Bruker MALDI Biotyper IVD)、A2 级生物安全柜(NUAIR-NU-437-400S)、核酸提取仪(Qiagen QIAcubeHT)、超微量紫外分光光度计(Implen NanoPhotometer)、恒温培养箱(Thermo IGS180)、全自动细菌鉴定仪(BD phoenix100)、PCR 仪(ABI Veriti96)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的培养

所有受试菌株接种于 5% 哥伦比亚血琼脂培养基,沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、志贺菌、克雷伯杆菌和啮齿类柠檬酸杆菌置 36℃ 培养 24 h;巴斯德杆菌、链球菌、棒状杆菌、支气管鲍特杆菌和念珠状链杆菌置 36℃ 培养 48 h;耶尔森菌和嗜水气单胞菌至 27℃ 分别培养 48 h 和 24 h;空肠弯曲菌 36℃ 厌氧培养 48 h。初代培养物按相同条件传代一次,次代菌落用于生化、测序和 MALDI-TOF MS 鉴定。

1.3.2 菌株的验证

对所有受试的标准菌株和分离菌株使用 BD phoenix 100 进行生化鉴定,同时提取基因组 DNA,用引物 FD1/RP2 扩增 16S rDNA,产物经测序后经 Genbank BLAST 比对,验证所用菌株的准确性。

1.3.3 MALDI-TOF MS 鉴定

根据布鲁克微生物快速鉴定系统操作规程,采用直接转移法制备待检样本。用一次性接种环挑取受试菌株单个菌落,直接涂抹于不锈钢 MALDI MSP 靶板圆孔中,每孔滴加 70% 甲酸溶液 1 μL,室温下晾干。随后用 2 μL 基质溶液覆盖,自然晾干后上机鉴定。结果用 Biotyper 3.0 database 处理分析。

2 结果

2.1 受试菌株验证

40 株标准菌株和 384 株分离菌株经生化和 16S rDNA 序列比对验证,所有菌株确定无误。

2.2 MALDI-TOF MS 分析

2.2.1 标准菌株鉴定结果

标准菌株的质谱结果分值区间为 1.532 ~ 2.546,鉴定正确率为 90.0%(36/40)。对所有沙门氏菌只能鉴定到属水平,不能确定到种。其中鼠伤

寒沙门氏菌 CMCC50115 被鉴定为啮齿类枸橼酸杆菌;假结核耶尔森氏菌 CMCC53521 被鉴定为小肠结肠炎耶尔森氏菌;志贺菌所有菌株全部有误,结果为埃希氏菌或 *Kosakonia*;嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型被鉴定为艰难梭菌;支气管鲍特杆菌被鉴定为百日咳鲍特杆菌。

2. 2. 2 分离株鉴定结果

MALDI-TOF MS 对实验动物病原菌分离株鉴定的准确率为 80. 0%(307/384)。沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、多杀巴斯德杆菌、肺炎链球菌等几种常规实验动物病原菌鉴定结果全部准确;不

在国家标准中的牛棒状杆菌、辛氏鲍特杆菌和产酸克雷伯杆菌项目也都准确鉴定。1 株实验用鱼需检测的嗜水气单胞菌鉴定准确(结果见表 2)。

3 株肺炎克雷伯杆菌分离株 1 株鉴定正确,1 株鉴定为产酸克雷伯杆菌,另 1 株鉴定为新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*);志贺菌分离株为福氏志贺菌,与标准菌株类似,被鉴定为大肠杆菌。315 株嗜肺巴斯德杆菌分离株的鉴定结果准确率为 76. 5%(241/315),具体鉴定结果见表 3。利用这些分离菌株,重新构建了嗜肺巴斯德杆菌质谱数据库,提高了鉴定的准确率。

表 1 标准菌种质谱结果
Table 1 MALDI-TOF MS results of standard strains

序号 Serial number	菌株编号 Strain number	菌株名称 Strain name	最佳鉴定结果拉丁文名称 Best match	质谱结果分值 ^a Score value	NCBI 分类号 Taxonomy ID
1	CMCC47001	亚利桑那沙门氏菌 <i>Salmonella arizonae</i>	<i>Salmonella</i> sp.	2. 428	58712
2	CMCC50041	肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enterica</i>	<i>Salmonella</i> sp.	2. 376	592
3	CMCC50047	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella</i> sp.	2. 539	58712
4	CVCC525	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella</i> sp.	2. 477	58712
5	CMCC50071	伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> sp.	2. 437	149385
6	CMCC50093	甲型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> A	<i>Salmonella</i> sp.	2. 546	58712
7	CMCC50094	乙型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi</i> B	<i>Salmonella</i> sp.	2. 263	98360
8	CMCC50115	鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>	2. 338	67825
9	ATCC10442	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2. 103	1280
10	ATCC25923	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2. 087	1280
11	CMCC26001	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2. 219	1280
12	CMCC10110	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2. 081	287
13	ATCC27853	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2. 242	287
14	ATCC47085	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1. 96	287
15	CMCC10104	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2. 356	287
16	CMCC53501	假结核耶尔森氏菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2. 524	633
17	CMCC53518	假结核耶尔森氏菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2. 355	633

序号 Serial number	菌株编号 Strain number	菌株名称 Strain name	最佳鉴定结果拉丁文名称 Best match	质谱结果分值 ^a Score value	NCBI 分类号 Taxonomy ID
18	CMCC53521	假结核耶尔森氏菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.958	630
19	CMCC52301	小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.993	630
20	CMCC52302	小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.993	630
21	CMCC51082	宋内氏志贺菌 <i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i>	2.4	562
22	CMCC51252	痢疾志贺菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Escherichia coli</i>	2.509	562
23	CMCC51175	福氏志贺菌 <i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia albertii</i>	2.188	208962
24	CMCC51522	鲍氏志贺菌 <i>Shigella boydii</i>	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.784	208223
25	CMCC46108	肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella variicola</i>	2.139	244366
26	CMCC46117	肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.212	573
27	ATCC BAA-352	啮齿类柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>	2.265	67825
28	ATCC12555	嗜肺巴斯德杆菌 <i>Rodentibacter heylii</i> (<i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Heyl)	<i>Clostridium difficile</i>	1.782	1496
29	ATCC35149	嗜肺巴斯德杆菌 <i>Rodentibacter pneumotropicus</i> (<i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Jawetz)	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	2.432	758
30	ATCC43137	多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	2.368	747
31	ATCC43765	猪链球菌 2 型 <i>Streptococcus suis</i> type 2	<i>Streptococcus suis</i>	2.152	1307
32	ATCC36001	肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.352	1313
33	CMCC31210	肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.888	1313
34	CMCC32210	化脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.589	1314
35	ATCC19395	支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	2.395	520
36	ATCC14647	念珠状链杆菌 <i>Streptobacillus moniliformis</i>	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2.094	34105
37	ATCC7715	牛棒状杆菌 <i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>	2.087	36808
38	CMCC65013	鼠棒状杆菌 <i>Corynebacterium kutscheri</i>	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	2.21	35755
39	ATCC700819	空肠弯曲菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	2.509	197
40	ATCC7966	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.246	644

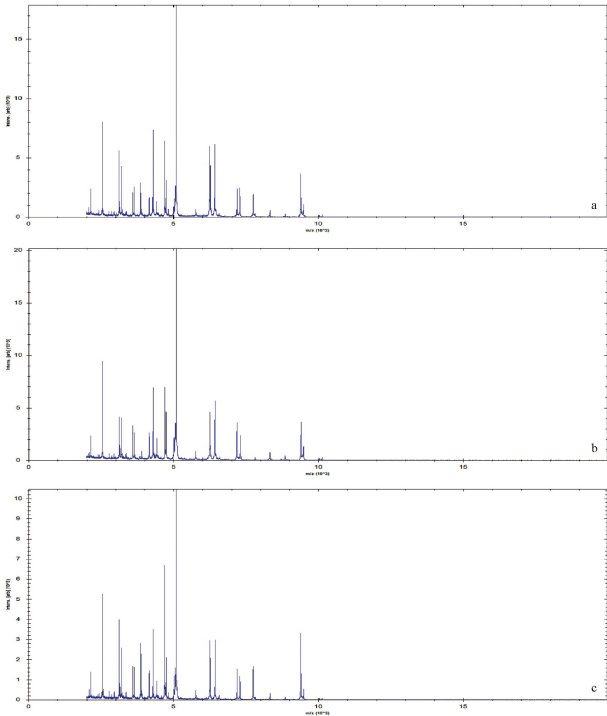
注:a:2.300~3.000 极可能的菌种鉴定;2.000~2.299 可靠的菌属鉴定,可能的菌种鉴定;1.700~1.999 可能的菌属鉴定;0.000~1.699 不可靠的鉴定。
Note. a, Identification of 2.300~3.000 highly probable species. 2.000~2.299 secure genus and probable species. 1.700~1.999 probable genus. 0.000~1.699 unreliable identification.

表 2 分离株鉴定结果汇总

分离菌 Isolates strain	结果准确率 Result accuracy
沙门氏菌 <i>Salmonella</i> isolates	4/4
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> isolates	21/21
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates	32/32
嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> isolates	241/315
多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella. multocida</i> isolates	2/2
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolate	1/1
肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates	1/3
产酸克雷伯杆菌 <i>Klebsiella oxytoca</i> isolate	1/1
志贺菌 <i>Shigella flexneri</i> isolate	0/1
辛氏鲍特杆菌 <i>Bordetella hinzii</i> isolate	1/1
牛棒状杆菌 <i>Corynebacterium bovis</i> isolates	2/2
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i> isolate	1/1

表 3 嗜肺巴斯德杆菌鉴定结果

鉴定结果 Best match	鉴定菌数 Number of isolates
嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i>	241
乙酸钙不动杆菌 <i>Acinetobacter calcoaceticu</i>	1
尿性囊肿芽单胞菌 <i>Blastomonas ursincola</i>	3
溶血嗜血杆菌 <i>Haemophilus haemolyticus</i>	2
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i>	13
副溶血嗜血杆菌 <i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	2
副流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1
皮氏嗜血杆菌 <i>Haemophilus pittmaniae</i>	44
神话猪乳杆菌 <i>Lactobacillus saerimneri</i>	4
金黄奈瑟氏球菌 <i>Neisseria flavescens</i>	1
格里苍白杆菌 <i>Ochrobactrum grignonense</i>	1
放射根瘤菌 <i>Rhizobium radiobacter</i>	1
先兆鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas aurantiaca</i>	1



注：a：ATCC12555；b：ATCC 35149；c：北京流行株。

图 1 嗜肺巴斯德杆菌 ATCC12555、ATCC35149 和北京流行株质谱峰图

Note. a, ATCC12555. b, ATCC 35149. c, Beijing epidemic strains.

Figure 1 MALDI-TOF MS spectrum of *Pasteurella pneumophila* ATCC12555, ATCC35149 and Beijing epidemic strains

3 讨论

本次研究所用菌株包括了大部分实验动物常见的可培养病原菌,还特别列入了几株国际实验动物科学理事会(ICLAS)检测目录中的细菌,用以评价质谱方法检测这些病原菌的效果。实验动物宿主涉及常规啮齿类、兔、鸡、鱼、犬、猴、猪等。

微生物质谱鉴定系统结果的可靠性依赖于相关菌株的基础数据库^[15]。本次研究中,鼠伤寒沙门氏菌、志贺菌、假结核耶尔森氏菌、肺炎克雷伯杆菌、支气管鲍特杆菌和嗜肺巴斯德杆菌的标准菌株鉴定出现错误。特别是对志贺菌的鉴定全部有误,错误结果主要为与大肠杆菌的混淆,与报道一致^[7],需要补充数据库才能加以区分。

本研究使用了 315 株嗜肺巴斯德杆菌分离株,主要分离自北京地区的实验动物。嗜肺巴斯德杆菌在实验动物中感染率高,尚缺乏针对性的质谱鉴定研究。本结果显示,Bruker Biotyper 系统及其原有数据库对嗜肺巴斯德杆菌鉴定准确率尚可,大部分菌株可鉴定到种,错误结果可鉴定到科水平。最新分类研究已将嗜肺巴斯德杆菌的 Jawetz 和 Heyl 生物型重新分类并命名为 *Rodentibacter pneumotropicus* 和 *Rodentibacter heylii*^[16] 两种菌。通过分析二者质谱峰图(见图 1),可见 Heyl 型与 Jawetz 型存在明显差异,前者在 3900 m/z 和 7800 m/z 两处的峰明显高于后者。北京地区流行株应属于 Heyl 型,其质谱峰图与 Heyl 型更为相近,与生化结果、PCR 方法,以及分子分型^[17]的鉴定结果相符。通过重新自定义数据库,即可快速区分嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 和 Heyl 生物型,即区分 *R. pneumotropicus* 和 *R. heylii*,为二者的鉴别检测提供依据。鉴于伯杰细菌鉴定手册暂未改版,各种自动细菌鉴定系统对嗜肺巴斯德杆菌的分类也未做修改,检测结果仍定义为嗜肺巴斯德杆菌。

质谱检测方法与自动生化鉴定系统、PCR 方法相比具有不可比拟的优势,不同品牌的质谱系统数据分析和统计方法各不相同,但都需要依靠庞大的专有数据库才能确保鉴定的准确性。因此对于实验动物病原菌的鉴定,还需在检测中不断收集更多的菌株补充和完善数据库。目前国产微生物鉴定质谱仪与进口品牌鉴定效果已无明显差距^[15],相信随着本土菌株数据库不断丰富和完善,质谱检测将会逐步普及,并成为实验动物病原菌检测的重要手段。

参考文献:

- [1] Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(1): 74-82.
- [2] Zhu W, Sieradzki K, Albrecht V, et al. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species [J]. J Microbiol Methods, 2015, 117: 14-17.
- [3] Szabados F, Woloszyn J, Richter C, et al. Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 7): 787-790.
- [4] Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra [J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(11): 1066-1071.
- [5] Zhou C, Tao L, Hu B, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of beta-hemolytic streptococci [J]. J Thorac Dis, 2015, 7(4): 591-595.
- [6] Oumeraci T, Jensen V, Talbot SR, et al. Comprehensive MALDI-TOF biotyping of the non-redundant Harvard *Pseudomonas aeruginosa* PA14 transposon insertion mutant library [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117144.
- [7] Paauw A, Jonker D, Roeselers G, et al. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(4-5): 446-452.
- [8] Lasch P, Drevinek M, Nattermann H, et al. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics [J]. Anal Chem, 2010, 82(20): 8464-8475.
- [9] Alibi S, Ferjani A, Gaillot O, et al. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches [J]. Pathol Biol (Paris), 2015, 63(4-5): 153-157.
- [10] Theel ES, Schmitt BH, Hall L, et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3093-3095.
- [11] Zangenah S, Güleriyüz G, Boräng S, et al. Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF-a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(2): 96-98.
- [12] Frey J, Kuhnert P. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1247: 235-243.