

Detección de la resistencia a meticilina e identificación de *Staphylococcus* spp. en hemocultivos positivos amplificando los genes *mecA* y *nucA* con el sistema LightCycler®

Maite Ruiz-Pérez de Pipaón^a, María José Torres-Sánchez^b, Luis Antonio Arroyo-Pedrero^a, Trinidad Prados-Blanco^a, José Carlos Palomares-Folía^{b,c} y Javier Aznar-Martín^{a,b}

^aServicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. ^bDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. ^cServicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de Valme. Sevilla. España.

INTRODUCCIÓN. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia del sistema LightCycler® para la detección de *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa-negativos (ECN), y la identificación de resistencia a meticilina directamente en botellas Bactec de hemocultivos positivos.

MÉTODOS. Se procesaron 131 botellas de hemocultivos positivos en los que se observaron cocos grampositivos en racimos tras la tinción de Gram y 40 botellas con microorganismos diferentes a estafilococos. Para la extracción del ADN se utilizó el sistema automático MagNA Pure LC (Roche Diagnostic). Los cebadores y las sondas de hibridación se diseñaron para la amplificación y detección de las secuencias específicas de un fragmento de 408 pb del gen *mecA* y de un fragmento de 279 pb del gen *nucA*.

RESULTADOS. Todas las botellas con cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), sensible a meticilina (SASM) o ECN resistentes a meticilina (ECNRM) fueron correctamente identificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes *nucA* y *mecA*. Una botella con un cultivo mixto de SASM y ECNRM dio resultados positivos para ambos genes. Las 21 botellas con cepas de ECN sensible a meticilina (ECNSM) fueron correctamente identificadas con el gen *nucA*, pero dos de ellas fueron positivas para el gen *mecA*. La sensibilidad y la especificidad fueron del 100% para el gen *nucA*, y del 100 y 97,5%, respectivamente, para el gen *mecA*. **CONCLUSIÓN.** Este es un método sensible y específico para la identificación de estafilococos en hemocultivos, y permite también la identificación de cepas resistentes a meticilina en un tiempo máximo de 3 h a partir de la visualización de la tinción de Gram.

Palabras clave: Sistema LightCycler®. *Staphylococcus aureus*. Estafilococos coagulasa-negativos.

Correspondencia: Dra. M. Ruiz-Pérez de Pipaón.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío.
Avda. Manuel Siurot, s/n. 41013 Sevilla. España.
Correo electrónico: maite.ruiz.sspa@juntadeandalucia.es

Manuscrito recibido el 7-9-2004; aceptado el 11-1-2005.

Detection of methicillin resistance and identification of *Staphylococcus* spp. from positive blood culture bottles using the *mecA* and *nucA* genes with the LightCycler® System

INTRODUCTION. The aim of this study was to evaluate the feasibility of detecting *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci (CoNS) and of identifying methicillin resistance directly in positive BACTEC blood culture bottles using the LightCycler® system.

METHODS. One hundred thirty-one positive blood culture bottles in which Gram-positive cocci in cluster were observed after Gram staining and 40 positive bottles with microorganisms other than staphylococci were studied. A molecular assay based on an automated DNA extraction protocol with a MagNA Pure LC instrument was used. Oligonucleotide primers and fluorescence-labeled hybridization probes were designed for amplification and sequence-specific detection of both a 408-pb fragment within the *mecA* gene and a 279-pb fragment within the *S. aureus*-specific *nucA* gene.

RESULTS. All the bottles that yielded methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) or methicillin-resistant CoNS (MRCoNS) strains were correctly identified by the *nucA* and *mecA* PCR assays. One bottle that yielded a mixed culture of MSSA and MRCoNS gave positive results for both genes. In the 21 bottles with methicillin-susceptible CoNS (MSCoNS), *nucA* PCR were negative, but two of these bottles gave positive results for the *mecA* gene. The sensitivity and specificity of the *nucA* gene assay were 100%. The sensitivity and specificity of the PCR assay for detection of methicillin resistance with the *mecA* gene were 100% and 97.5%, respectively.

CONCLUSION. This is a sensitive and highly specific method for identifying staphylococci in positive blood cultures, allowing discrimination between methicillin-susceptible and -resistant strains in less than 3 hours after Gram stain.

Key words: LightCycler® system. *Staphylococcus aureus*. Coagulase-negative staphylococci.

Introducción

Staphylococcus aureus es un patógeno responsable de una gran variedad de cuadros clínicos graves, como infecciones óseas, neumonía, septicemia y endocarditis. El tratamiento de elección para estas infecciones lo constituyen los antibióticos betalactámicos, asociados en ocasiones a aminoglucósidos¹. Así mismo, los estafilococos coagulasa-negativos (ECN) continúan siendo una causa importante de bacteriemias en pacientes hospitalizados^{2,3}. Desde la introducción de la meticilina en la práctica clínica en 1961, la incidencia de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) ha aumentado de forma gradual y las infecciones nosocomiales causadas por este agente se han convertido en un grave problema en todo el mundo^{1,4}. La resistencia a meticilina presenta incluso mayor prevalencia en ECN, sobre todo en las infecciones hospitalarias³. En los pacientes con infecciones por *S. aureus*, la identificación precoz de los SARM tiene importantes implicaciones para el tratamiento y manejo de los mismos al ser los glucopéptidos los fármacos de elección para estas infecciones¹.

Las bacteriemias por *S. aureus* a menudo implican una situación médica comprometida; sin embargo, el significado clínico de los ECN aislados en hemocultivos en ocasiones no está bien definido ya que pueden ser contaminantes⁵. Por consiguiente, cuando se observan en la tinción de Gram de botellas de hemocultivos cocos grampositivos en racimos, se plantean dos interrogantes: diferenciar si el microorganismo es *S. aureus* o ECN y si el microorganismo es sensible o no a la meticilina⁶. En el laboratorio clínico, *S. aureus* se identifica por sus características de crecimiento y la detección de la actividad catalasa y coagulasa. Las pruebas convencionales de sensibilidad, por dilución en agar, difusión en disco y métodos de cribado en medio sólido detectan de forma fiable la resistencia a meticilina u oxacilina siempre que se realicen de acuerdo con las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{7,8}. Sin embargo, estas pruebas convencionales de sensibilidad son lentas, en ocasiones la expresión fenotípica de la resistencia a meticilina *in vitro* es heterogénea y, a veces, difícil de inducir, por lo que se pueden producir falsos negativos⁹. Además, los sistemas comerciales rápidos disponibles para la detección de la coagulasa pueden mostrar un resultado falso negativo o ininterpretar con algunas cepas de *S. aureus*¹⁰, al igual que las pruebas rápidas de detección de resistencia a meticilina, especialmente en el caso de los ECN¹¹. Si el microorganismo está en cultivo puro, la identificación por las técnicas convencionales requiere entre 18-24 h y las pruebas de sensibilidad de 6 a 10 h adicionales, por lo que una disminución de estos tiempos tendría una gran relevancia clínica.

El gen *nucA* de *S. aureus*, que codifica una termonucleasa extracelular, tiene secuencias específicas de especie que han permitido el diseño de cebadores para la identificación de *S. aureus*^{12,13}. Por otro lado, el principal determinante de resistencia a meticilina en estafilococos, el gen *mecA*, está presente tanto en *S. aureus* como en ECN^{14,15}. Ambos genes se han utilizado para la rápida identificación de *S. aureus* resistente a meticilina a partir de subcultivos en medio sólido¹⁶ y también directamente en botellas de hemocultivos utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real¹⁷.

En este trabajo se ha evaluado la utilidad de la técnica de PCR en tiempo real para identificar *S. aureus* y detectar la resistencia a meticilina tanto en *S. aureus* como en ECN, directamente en botellas Bactec de hemocultivos positivos. Para ello se han utilizado secuencias específicas de los genes *nucA* y *mecA* y la tecnología LightCycler®.

Material y métodos

Aislamientos clínicos

Se estudiaron 33 cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina y 18 cepas de SARM, aisladas de diferentes pacientes, empleadas para la validación de la técnica molecular, y 171 microorganismos aislados de los hemocultivos positivos empleados en el estudio.

Identificación bacteriana y pruebas de sensibilidad

La caracterización fenotípica de los aislados se realizó mediante tinción de Gram, actividad de la catalasa y reacción de la coagulasa, determinada esta última por una prueba de aglutinación de látex con el kit Pastorex Staph Plus (Sanofi Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, Francia). La identificación y pruebas de sensibilidad se hicieron con el sistema semiautomatizado Walk-Away MicroScan® (Dade-Behring), y mediante difusión en agar con un disco de 1 µg de oxacilina por el método Kirby-Bauer, de acuerdo con las normas del NCCLS⁸.

Hemocultivos

Durante los meses de junio y julio de 2002 se analizaron 171 botellas de hemocultivos positivos (Bactec 9240 Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), enviadas al Servicio de Microbiología de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla obtenidas de 74 pacientes y que correspondían a 83 episodios febriles. Los hemocultivos se procesaron siguiendo los procedimientos habituales que incluyen tinción de Gram e inoculación en diferentes medios sólidos. En 131 botellas se observaron cocos grampositivos en racimos en la tinción de Gram, e inmediatamente se alicuotó 1 ml de su contenido, conservándose a -70 °C para su posterior utilización en las técnicas moleculares. En los restantes 40 hemocultivos positivos se visualizaron en la tinción de Gram: 13 bacilos gramnegativos, cuatro bacilos grampositivos, 20 cocos grampositivos en cadenas, dos diplococos grampositivos y un diplococo gramnegativo.

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de una alícuota de 100 µl de la sangre congelada y se llevó a cabo en el sistema automático MagNA Pure LC¹⁸ utilizando el kit MagNA Pure LC Total DNA Isolation (Roche Molecular Biochemicals). Una vez extraído, el ADN se resuspendió en un volumen final de 100 µl, utilizándose 2 µl en la reacción de PCR.

La especificidad de la nueva técnica molecular se determinó con ADN extraído por el método rápido de ebullición¹⁶ a partir de las 33 cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM) y las 18 cepas de SARM.

Amplificación por PCR

Los cebadores y las sondas de hibridación, diseñadas para la amplificación y detección de un fragmento de 408 pb del gen *mecA*¹⁶ y de un fragmento de 279 pb del gen *nucA* específico de *S. aureus*^{12,13} fueron elaboradas por TIB MolBiol (Berlín, Alemania). La secuencia de nucleótidos y su posición se muestran en la tabla 1. Además, fue incluida una pareja de cebadores para la β-globina humana (KM38-GH20) como control interno de la amplificación del ADN y descartar la presencia de inhibidores de la reacción.

La mezcla de reacción para la amplificación del gen *nucA* contenía 2 µl de 10x LightCycler® DNA Master Hybridation Probes (Roche Mo-

TABLA 1. Secuencias de nucleótidos de los cebadores y las sondas de hibridación usados en la PCR con el sistema LightCycler®

Oligonucleótidos	Secuencia	Gen diana	Posición nucleótidos	Acceso GenBank.	Referencia
mec-F	CAAGATATGAAGTGGTAAATGGT	<i>mecA</i>	1471-1493	X52593	16
mec-R	TTTACGACTTGTGCATACCATC	<i>mecA</i>	1879-1857	X52593	16
mec-HP-2	6FAM-ACCCAGTACAGAXTCCTTCAATCTATAGCG-Ph	<i>mecA</i>	1720-1739	X52593	16
nucA-F	AGCCAAGCCTTGACGAACAAAGC	<i>nucA</i>	765-789	V01281	12, 13
nucA-R	GCGATTGATGGTGATACGGTT	<i>nucA</i>	511-490	V01281	12, 13
nuc-FLU	TGCTTCAGGACCATATTCTACACCTT- FLU	<i>nucA</i>	630-600	V01281	12, 13
nuc-LCR	Red 640-TAGGATGCTTGTTCAGGTGTATCAACCA-Ph	<i>nucA</i>	575-605	V01281	12, 13

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; FAM: 6-carboxil-fluoresceína; FLU: fluoresceína; X: 6-carboxil-tetrametil-rodamina (TAMRA); Red 640: LightCycler®-Red 640-N-hidroxisuccinamida éster; Ph: 3'-fosfato.

TABLA 2. Resultados de los métodos clásicos de identificación de las 172 cepas aisladas en 171 botellas de hemocultivos

Cepas	Sensibilidad a meticilina	Número de botellas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sensible	41*
<i>S. aureus</i>	Resistente	22
<i>S. epidermidis</i>	Sensible	15
<i>S. epidermidis</i>	Resistente	42*
<i>S. haemolyticus</i>	Resistente	4
<i>S. hominis</i>	Sensible	3
<i>S. simulans</i>	Sensible	3
<i>S. simulans</i>	Resistente	1
<i>S. warneri</i>	Resistente	1
<i>Escherichia coli</i>	NP	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NP	2
<i>E. cloacae</i>	NP	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NP	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NP	1
<i>S. enterica</i> serogrupo D	NP	1
<i>Serratia marcescens</i>	NP	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	NP	1
<i>C. propinquum</i>	NP	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	NP	2
<i>Leuconostoc</i> spp.	NP	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	NP	2
<i>E. faecium</i>	NP	1
<i>E. casseliflavus</i>	NP	1
<i>Streptococcus bovis</i> grupo II	NP	6
<i>S. agalactiae</i>	NP	1
<i>S. pyogenes</i>	NP	4
<i>Abiotrophia</i> spp.	NP	2
<i>S. pneumoniae</i>	NP	2
<i>Neisseria meningitidis</i>	NP	1

*Una botella contenía una población mixta de *S. aureus* sensible a meticilina y ECN resistente a meticilina.

NP: no procede.

TABLA 3. Resultados de la PCR de los genes *nucA* y *mecA* de 171 botellas de hemocultivos

Identificación convencional	<i>nucA</i>		<i>mecA</i>	
	PCR (+)	PCR (-)	PCR (+)	PCR (-)
SARM	22	0	22	0
SASM	40	0	0	40
ECNRM	0	47	47	0
SASM + ECNRM*	1	0	1	0
ECNSM	0	21	2	19
Otros	0	40	0	40

*Las dos cepas se aislaron de la misma botella.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; SASM: *S. aureus* sensible a meticilina; ECNRM: estafilococo coagulasa-negativo resistente a meticilina; ECNSM: estafilococo coagulasa-negativo sensible a meticilina.

lecular Biochemicals), 4 mM MgCl₂ (concentración final), 0,5 μM de cada uno de los cebadores nucA-F y nucA-R, 0,2 μM de cada una de las sondas de hibridación nuc-FLU y nuc-LCR, y 2 μl de ADN, en un volumen final de 20 μl. Las condiciones de reacción fueron una primera desnaturización a 95 °C durante 10 s, seguido de un protocolo de amplificación de 40 ciclos que consistían en calentamiento a 20 °C/s hasta 95 °C, enfriamiento a 20 °C/s hasta 55 °C, manteniendo esta temperatura durante 10 s, y calentamiento a 20 °C/s hasta 72 °C manteniéndola 15 s. La emisión de fluorescencia se midió en cada ciclo al final de la fase de desnaturización utilizando el canal de lectura F2. Esto fue seguido de un programa de fusión de 50 °C a 80 °C a 0,1 °C/s con monitorización continua de la emisión de fluorescencia.

Para la detección del gen *mecA* se usó una sonda TaqMan marcada con un marcador de fluorescencia¹⁶. El volumen final de reacción fue de 20 μl, que contenía 2 μl de la mezcla 10x LightCycler® DNA Master Hybridation Probes (Roche Molecular Biochemicals), 4 mM MgCl₂ (concentración final), 0,5 μM de cada uno de los cebadores mecF y mecR, 0,1 μM de la sonda de hibridación mec-HP-2, y 2 μl de ADN. Las condiciones de reacción fueron una primera desnaturización a 95 °C durante 10 s, seguido de un protocolo de amplificación de 40 ciclos que consistían en calentamiento a 20 °C/s hasta 95 °C, enfriamiento a 20 °C/s hasta 50 °C, manteniendo esta temperatura durante 10 s, y calentamiento a 20 °C/s hasta 72 °C manteniéndola 15 s. La emisión de fluorescencia se midió en cada ciclo al final de la fase de elongación utilizando el canal de lectura F1.

Resultados

En primer lugar se evaluó la técnica de PCR en tiempo real con los genes *nucA* y *mecA* en 51 cepas de *S. aureus* aisladas a partir de muestras clínicas. La sensibilidad y especificidad fueron ambas del 100%, detectándose el gen *nucA* en todas las cepas estudiadas y el gen *mecA* en los 18 SARM. Posteriormente, se realizó el estudio con las 171 botellas de hemocultivos positivos. La identificación con los métodos convencionales de las cepas aisladas en las botellas de hemocultivos se presenta en la tabla 2. En todas las muestras la amplificación del gen de la β-globina fue positiva, indicando la ausencia de inhibidores en la reacción de amplificación. En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos en los 171 hemocultivos con la PCR en tiempo real y los genes *nucA* y *mecA*. Las 22 botellas de hemocultivos de las que se aislaron SARM fueron correctamente identificadas, siendo la PCR positiva para ambos genes. Las 41 botellas que contenían *S. aureus* sensible a meticilina fueron positivas para el gen *nucA* y negativas para el gen *mecA*. Las 48 botellas que contenían ECN resistentes a meticilina fueron correctamente identificadas por PCR, con resultados negativos para el gen *nucA* y positivos para el *mecA*. Sin embargo, en una bote-

lla con un cultivo mixto de SASM y ECN resistente a meticilina se detectó amplificación de ambos genes. Por lo tanto, en hemocultivos con cultivos mixtos de *Staphylococcus* spp. la interpretación de las técnicas de amplificación puede ser confusa.

En todas las botellas con ECN sensibles a meticilina la PCR del gen *nucA* fue negativa y la amplificación del gen *mecA* fue negativa en todas excepto en dos de ellas. Después de realizar la prueba de la coagulasa en tubo y el método del disco difusión se confirmó que ambas cepas eran ECN sensibles a meticilina y se consideraron como falsos positivos de la técnica de PCR. No se detectó amplificación de los genes estudiados en ninguno de los hemocultivos en los que se aislaron especies diferentes a *Staphylococcus* spp. (tabla 3).

La sensibilidad y la especificidad de la PCR en tiempo real del gen *nucA* fue del 100%, identificando todos los *S. aureus* correctamente. En la evaluación de la detección de la resistencia a meticilina mediante PCR del gen *mecA* en botellas que contenían *S. aureus* y ECN, la prueba convencional de sensibilidad, con el disco de oxacilina de 1 µg de acuerdo con las normas del NCCLS⁸, se consideró como el método de referencia. La sensibilidad y la especificidad de la técnica de PCR en tiempo real fueron del 100 y 97,5%, respectivamente.

Discusión

La identificación de *S. aureus* basada exclusivamente en los métodos convencionales fenotípicos puede producir errores diagnósticos. Las técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos podrían ser más sensibles, especialmente en la detección de bacteriemias en pacientes con tratamiento antimicrobiano¹⁹, en los que los hemocultivos podrían ser negativos.

La detección del gen *nucA* se ha utilizado con fines diagnósticos para la identificación de *S. aureus* por varios autores^{13,20,21}, y nuestros resultados confirman su utilidad. Cuando se aplicó directamente en botellas de hemocultivos positivos, fue igualmente eficaz, no obteniéndose ningún resultado positivo cuando se aplicaron a botellas de hemocultivos que contenían microorganismos distintos de *S. aureus*.

En otros estudios se ha utilizado la amplificación del gen *sa442* para la identificación de *S. aureus*, a partir de botellas de hemocultivos con resultados idénticos a los nuestros¹⁹, o con una sensibilidad ligeramente inferior¹⁷. Hay que tener presente que la utilización de diferentes medios de hemocultivos, con distinta composición, podría tener como consecuencia la presencia de sustancias inhibidoras de la PCR. En nuestro caso la sensibilidad fue del 100%, y puede deberse, a diferencia de los dos trabajos antes mencionados, a la utilización de un sistema de extracción automática que posee en principio una mayor reproducibilidad de la extracción del ADN.

Algunos autores consideran como técnica de referencia para la determinación de la resistencia a meticilina la detección del gen *mecA*¹⁰, ya que muchas cepas de estafilococos expresan el gen *mecA* de forma heterogénea, y sólo unas pocas colonias de una población bacteriana pueden ser PBP2a (proteína producto de la expresión del gen *mecA* y que determina la resistencia a meticilina) positivas, siendo esta heterogeneidad más común en cepas de ECN que

en cepas de *S. aureus*. Esto hace que la detección fenotípica de la resistencia a la meticilina sea en ocasiones problemática, especialmente en ECN. El método de difusión en disco y el sistema Walk Away mostraron resultados equivalentes para la identificación de las cepas que poseían el gen *mecA*, y sólo 2 de 69 cepas de ECN (2,9%) no fueron reconocidas como tal. Si se considera la detección del gen *mecA* como el método de referencia, estas dos cepas deberían ser consideradas resistentes, siendo falsos negativos del método fenotípico. A pesar de que se han descrito otros mecanismos de resistencia a meticilina, está demostrado que la concentración inhibitoria mínima (CIM) de oxacilina para los ECN que no poseen el gen *mecA* es pocas veces mayor o igual a 4 µg/ml^{22,23}. Al igual que Grisold et al²⁴ en el estudio de aislamientos clínicos, hemos utilizado un sistema automático de extracción de ADN, MagNA Pure, que puede superar los problemas de inhibición encontrados por Shrestha et al¹⁹ en la prueba del gen *mecA* cuando la aplicaban directamente a botellas de hemocultivos positivos.

En nuestro estudio, ninguna de las botellas que contenían microorganismos diferentes a estafilococos obtuvieron resultados positivos, demostrándose la elevada especificidad de nuestra técnica de PCR. En todas las cepas de SASM se obtuvieron resultados positivos para el gen *nucA* y resultados negativos para el gen *mecA*. La PCR identificó una cepa de SASM como un SARM debido a la presencia en la misma botella de una cepa de ECN *mecA* positivo. El estudio que describimos hubiera identificado correctamente que la botella contenía una cepa de *S. aureus* pero la hubiera clasificado de forma inadecuada como resistente. Por lo tanto, creemos que el subcultivo de rutina de los hemocultivos positivos en medios de cultivo selectivos y no selectivos deber seguir haciéndose para identificar los cultivos mixtos. Una limitación de este estudio es que las botellas que contengan *Micrococcus* spp. deberían resultar negativas para el gen *nucA*, y podrían ser identificados como ECN. Este hecho tiene poca relevancia desde el punto de vista clínico porque estas especies son consideradas en la mayoría de las ocasiones contaminantes de los hemocultivos. En estos casos habría que esperar al resultado del subcultivo para su correcta identificación, y así determinar su significado clínico en función no sólo del resultado de la PCR para los genes *nucA* y *mecA*, sino también del número de botellas positivas y del contexto clínico del paciente.

Esta es la primera vez que dos pruebas de PCR en tiempo real usando los genes *nucA* y *mecA* combinadas con un protocolo automático de extracción de ADN con el sistema MagNA Pure LC se han aplicado directamente en botellas de hemocultivos positivos para la identificación y detección de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina. La información proporcionada por estas pruebas podría ayudar en la práctica clínica en la rápida identificación de las bacteriemias por *S. aureus* y ECN detectando simultáneamente la resistencia a meticilina, y así modificar si fuera necesario la terapia antimicrobiana 24-36 h antes, tiempo mínimo necesario para obtener resultados con las pruebas convencionales de identificación y sensibilidad.

En conclusión, creemos que este protocolo de extracción de ADN combinado con dos pruebas de PCR en tiempo real aplicado directamente a hemocultivos positivos es un método rápido y seguro que podría ser introducido en la rutina del laboratorio clínico, ya que su duración es de 3 h una vez realizada la tinción de Gram.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido en parte financiado por la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI-C03/14).

Bibliografía

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998;339:520-32.
2. National Nosocomial Infection Surveillance (National Nosocomial Infection Surveillance) System report, data summary from January 1990 to May 1999, issued June 1999. Am J Infec Control. 1999;27:520-32.
3. Marshall SA, Wilke W, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bloodstream infections: Frequency of occurrence of antimicrobial susceptibility, molecular (*mecA*) characterization of oxacillin-resistance in SCOPE program. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;30:205-14.
4. Benner EJ, Kayser FH. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 1968;11:741-4.
5. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev. 1997;10:444-65.
6. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev. 1993;6:428-42.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M27A6. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh Informational Supplement. M100-S14 OO-S 11. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.
9. Ribeiro J, Vieira FD, King T, D' Arezzo JB, Boyce JM. Misclassification of susceptible strains of *Staphylococcus aureus* as methicillin-resistant *S. aureus* by a rapid automated susceptibility testing system. J Clin Microbiol. 1999;37:1619-20.
10. Hussain Z, Stoakes L, John MA, Garrow S, Fitzgerald V. Detection of methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, Slide Agglutination, Disk diffusion, and a commercial Method. J Clin Microbiol. 2002;40:2251-3.
11. Wilkerson M, McAllister S, Miller JM, Heiter BJ, Bourbeau PP. Comparison of five agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1997;35:148-51.
12. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J Clin Microbiol. 1992;30:1654-60.
13. Palomares C, Torres MJ, Torres A, Aznar J, Palomares JC. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. Diag Microbiol Infect Dis. 2003;45:183-9.
14. Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH, et al. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Gene. 1990;94:137-8.
15. Ubukata K, Nonoguchi R, Song MD, Matsuhashi M, Konno M. Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:170-2.
16. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol. 2000;38:2429-33.
17. Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:4529-31.
18. Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofe E, Santner BI, Marth E. Fully automated nucleic acid extraction. MagNA Pure LC. Clin Chem. 2001;47:124-6.
19. Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Isada CM, Procop GW. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from Bact/Alert blood culture bottles by using the LightCycler System. J Clin Microbiol. 2002;40:2659-61.
20. Hein I, Lehner A, Riek P, Klein K, Brandl E, Wagner M. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. Appl Environ Microbiol. 2001;67:3122-6.
21. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1989;36:618-23.
22. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre V, Fitzgerald V, El Sayed S, et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2000;38:752-4.
23. Louie L, Majury A, Goodfellow J, Louie M, Simor AE. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2001;39:4149-51.
24. Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2392-7.