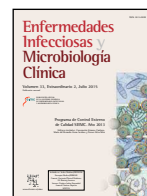




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas

Jesús Oteo* y María Belén Aracil

Laboratorio de Antibióticos, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

SARM
Resistencia enterobacterias
BLEE
Carbapenemasas

La resistencia a múltiples antibióticos en bacterias patógenas aumenta la morbilidad de los pacientes infectados y es una grave amenaza para la salud pública por su capacidad de diseminación. Por ambos motivos, la detección rápida de las bacterias multirresistentes es crucial. Los métodos de diagnóstico microbiológico convencionales requieren al menos 48-72 h, por lo que se necesitan otros procedimientos que permitan agilizar la obtención de resultados. En los últimos años se ha extendido el uso de técnicas basadas en medios de cultivo selectivos y diferenciales, así como el de otras técnicas fenotípicas. Sin embargo, la capacidad de detectar los genes de resistencia y la rapidez en la obtención de resultados han convertido los métodos moleculares en técnicas de referencia. Esta revisión aborda los diferentes métodos moleculares de detección de los genes que codifican algunos de los mecanismos de resistencia a antibióticos con mayor impacto a nivel clínico y epidemiológico en el momento actual: a) la resistencia enzimática a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro en enterobacterias, principalmente β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas, y b) la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, extended spectrum β -lactamases and carbapenemases

ABSTRACT

Keywords:

MRSA
Resistance enterobacteriaceae
ESBL
Carbapenemases

Multi-drug resistance in bacterial pathogens increases morbidity and mortality in infected patients and it is a threat to public health concern by their high capacity to spread. For both reasons, the rapid detection of multi-drug resistant bacteria is critical. Standard microbiological procedures require 48-72 h to provide the antimicrobial susceptibility results, thus there is emerging interest in the development of rapid detection techniques. In recent years, the use of selective and differential culture-based methods has widely spread. However, the capacity for detecting antibiotic resistance genes and their low turnaround times has made molecular methods a reference for diagnosis of multidrug resistance. This review focusses on the molecular methods for detecting some mechanisms of antibiotic resistance with a high clinical and epidemiological impact: a) Enzymatic resistance to broad spectrum β -lactam antibiotics in Enterobacteriaceae, mainly extended spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemases; and b) methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El aumento de la resistencia combinada a múltiples antibióticos en algunas de las principales bacterias patógenas en humanos supo-

ne una importante amenaza para la salud pública y para la salud individual de los pacientes¹. Las infecciones producidas por bacterias con multirresistencia a antibióticos (BMR) son más difíciles de tratar, generan una demora en el inicio de un tratamiento antibiótico eficaz y, como consecuencia, presentan una peor evolución y una mayor morbilidad que las producidas por bacterias sensibles a los antibióticos^{1,2}. Además, muchas de las BMR más prevalentes presentan una alta capacidad de diseminación epidémica, no solo intrahospita-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jesus.oteo@isciii.es (J. Oteo).

laria sino también inter- y extrahospitalaria^{3,4}. La contención de esta expansión es una de las prioridades de salud pública reconocida por las principales instituciones nacionales e internacionales⁵.

Por tanto, una detección precoz de las infecciones por BMR es esencial por un doble motivo: asistencial y de salud pública. Desafortunadamente, los procedimientos estándar de microbiología requieren de unos tiempos de incubación y crecimiento bacteriano que pueden retrasar los resultados de sensibilidad a antibióticos alrededor de 48-72 h desde la siembra de la muestra clínica⁶. Además, la lectura interpretativa del antibiograma no siempre permite deducir el mecanismo molecular que subyace, y otras pruebas fenotípicas muy orientativas, como el uso de inhibidores de ciertos enzimas como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas del tipo AmpC o carbapenemasas de clase A y clase B^{7,8}, requieren otras 24 h.

Por tanto, es necesario el uso de otros procedimientos microbiológicos que permitan obtener resultados en menos tiempo. En los últimos años se ha extendido el uso de métodos basados en medios de cultivo cromogénicos, selectivos y diferenciales, que permiten la diferenciación de cepas bacterianas productoras de ciertos mecanismos de resistencia⁹⁻¹¹. Sin embargo, la capacidad de detectar los genes resistencia y la rapidez en la obtención de resultados han convertido los métodos moleculares en técnicas de referencia.

Esta revisión aborda los diferentes métodos moleculares de detección de los genes que codifican algunos de los mecanismos de resistencia a antibióticos con mayor impacto en los ámbitos clínico y epidemiológico en el momento actual: a) la resistencia enzimática a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro en enterobacterias, principalmente BLEE y carbapenemasas, y b) la resistencia a metilina en *Staphylococcus aureus*. En ambos casos, la presencia de estos mecanismos se asocia con una alta frecuencia de resistencia a otros antibióticos, por lo que su detección suele ser también un indicador indirecto de la presencia de multiresistencia o incluso, en el caso de las carbapenemasas, de resistencia extensa o panresistencia a antibióticos.

Resistencia enzimática a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro en enterobacterias: β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas

Las enterobacterias son una de las principales causas de infección, tanto nosocomial como adquirida en la comunidad, en humanos. En conjunto representan el grupo de bacterias patógenas aisladas con más frecuencia en infecciones de orina y bacteriemias¹². El rápido aumento en la prevalencia de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, sobre todo debido a la expansión de las BLEE del tipo CTX-M, en la última década ha limitado el uso de estos antibióticos en el tratamiento empírico frente a las infecciones producidas por enterobacterias¹¹. La frecuente asociación de producción de BLEE con resistencia a otros antibióticos, como fluorquinolonas y aminoglucósidos, ha reducido el abanico terapéutico ascendiendo a los antibióticos carbapenémicos a tratamiento de primera opción en las infecciones invasivas por estas bacterias. El aumento del consumo de antibióticos carbapenémicos ha llevado en pocos años a la aparición de cepas resistentes frente a ellos y, como consecuencia, resistentes a la práctica totalidad de antibióticos disponibles¹³. La principal causa de resistencia a antibióticos carbapenémicos en enterobacterias es la producción de carbapenemasas^{14,15}. Las alternativas terapéuticas en estos casos son muy escasas y casi nunca óptimas e incluyen colistina, tigeciclina, fosfomicina o los mismos carbapenémicos, siempre que presenten concentraciones mínimas inhibitorias < 8 mg/l¹⁶.

En este contexto, las BLEE y las carbapenemasas cumplen los criterios de alto impacto clínico y epidemiológico y, por tanto, son uno de los objetivos prioritarios en la implementación de diagnósticos moleculares.

Características ideales de los métodos moleculares de detección rápida de β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas

El retraso en el diagnóstico y en el tratamiento dirigido de las infecciones producidas por enterobacterias multiresistentes tiene importantes repercusiones clínicas y epidemiológicas^{1,2,17}: a) aumento del fracaso terapéutico; b) incremento de la morbimortalidad; c) aumento de los días de hospitalización, y d) mayor posibilidad de disseminación y de generar brotes hospitalarios. Todo ello lleva, además, implícito un aumento de los costes sanitarios¹².

Un sistema molecular de detección rápida de mecanismos de resistencia debe priorizar los que suponen una mayor amenaza por su prevalencia y por el nivel de resistencia que generan. En este sentido, los genes que codifican BLEE del tipo CTX-M y SHV^{18,19} y carbapenemasas del tipo OXA-48, VIM y KPC^{3,15} deberían ser, según datos epidemiológicos actuales, las principales dianas de estos métodos en España. Aunque con un impacto epidemiológico menor, otros mecanismos como las BLEE del tipo TEM y las carbapenemasas del tipo IMP, NDM y GES pueden generar brotes locales y/o ser importados de otros países donde son más prevalentes, por lo que su inclusión mejoraría la sensibilidad de cualquier sistema de detección rápida. En cualquier caso, el gran dinamismo de estos mecanismos de resistencia requiere de herramientas versátiles que puedan ser adaptadas fácilmente a las variaciones evolutivas que se vayan generando.

Un método ideal debería incluir varias dianas en una sola reacción, ser de fácil aprendizaje y manejo, facilitar la obtención de resultados sensibles y específicos con rapidez y ser coste-efectivo⁶.

En la detección de BLEE es importante tener en cuenta la existencia de variantes alélicas de genes como *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, en los que dichas variantes, a veces con modificaciones en solo 1-3 nucleótidos, condicionan su actividad BLEE²⁰. La gran diversidad existente en los genes que codifican BLEE del tipo CTX-M²¹, clasificados en diferentes grupos según su secuencia de aminoácidos, obliga a un diseño que incluya iniciadores y/o sondas específicos para cada uno de ellos, para evitar una disminución en la sensibilidad del método. No obstante, las BLEE de los grupos CTX-M-1 (principalmente CTX-M-15) y CTX-M-9 (principalmente CTX-M-9 y CTX-M-14) representan más del 90% de las BLEE de la familia CTX-M circulantes actualmente en España^{13,18,19}. La detección de la carbapenemasa OXA-48 requiere de iniciadores lo suficientemente específicos que la diferencien, y por tanto eviten un déficit en la especificidad del método, de otras abundantes β -lactamasas del tipo OXA sin actividad carbapenemasa²².

Detección de β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas por métodos moleculares

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de ADN mediante PCR convencional es el método precursor de los sistemas moleculares para la detección de genes de resistencia^{23,24}. Permite la identificación de un solo gen y requiere de iniciadores específicos para la diana buscada. Aunque es posible distinguir variantes alélicas muy similares con el diseño de iniciadores que incluyan los lugares de variación, en general, para la caracterización de variantes alélicas específicas se requiere una posterior secuenciación del amplicón obtenido. Por otra parte, mediante una PCR convencional simple con iniciadores degenerados se pueden detectar diferentes variantes de una misma familia, por ejemplo para la detección de los diferentes grupos de BLEE de la familia CTX-M²⁴.

La utilización de PCR múltiples permite la caracterización de diferentes mecanismos en una sola reacción de amplificación, circunstancia especialmente útil en el estudio de β -lactamasas de amplio espectro debido a su diversidad. Requiere de varios pares de iniciadores que sean altamente específicos de la diana a amplificar, que tengan condiciones de amplificación semejantes y que amplifiquen fragmentos de tamaños diferentes que permitan su fácil diferencia-

ción²⁵. En la última década se han propuesto diferentes PCR múltiples para la detección de genes que codifican enzimas plasmídicas del tipo AmpC^{26,27}, BLEE^{27,28} y carbapenemasas²⁷⁻³³. Se han descrito diferentes limitaciones a algunas de estas técnicas, entre las que destacan el tamaño poco discriminativo de los amplicones, que dificulta su diferenciación²⁶, la utilización de diferentes condiciones de amplificación que obliga a realizar varias PCR múltiples en paralelo²⁸, la amplificación cruzada con genes de β -lactamasas cromosómicas intrínsecas de determinadas especies²⁶⁻²⁸ y, en general, la inclusión de un número limitado de genes, con frecuencia agrupados por familias como carbapenemasas de clase A³¹ o de clase B³².

La detección por PCR es una técnica rápida, barata y fácil de aplicar y optimizar sobre cultivo bacteriano, donde el número de copias de la diana es muy alto. Sin embargo, la presencia de inhibidores como heparina (sangre), uratos (orina) o polipéptidos (heces) disminuye su sensibilidad sobre muestra clínica³⁴.

Las técnicas de PCR en tiempo real³⁵⁻³⁹ permiten la detección simultánea del proceso de amplificación exponencial mediante la emisión de fluorescencia⁴⁰. Estas técnicas permiten acelerar el proceso de detección⁴¹, ya que no necesitan de electroforesis en gel de agarosa para visualizar los resultados, son más sensibles y específicas que las PCR convencionales^{38,39} y pueden permitir la detección de variantes alélicas⁴². En general, las características de las PCR en tiempo real facilitan su aplicación para fines diagnósticos incluso sobre muestras clínicas^{38,39,43}. Recientemente se han comercializado diferentes sistemas basados en PCR múltiples^{30,44} y algunos permiten el diagnóstico rápido de BLEE y carbapenemasas^{30,39,42,45-47} (tabla 1), en general con una alta sensibilidad y especificidad^{39,42}.

Otros métodos de detección molecular de β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas

Existen otros métodos moleculares alternativos a los métodos basados en PCR. El *microarray* es una metodología muy útil para analizar un gran número de genes en un mismo ensayo⁴⁸⁻⁵⁰ y poder detectar variaciones nucleotídicas de un alelo⁴⁹. Es una tecnología versátil, fácil de aplicar y de actualizar. Un primer *microarray* comercial para la detección de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} demostró una alta sensibilidad y especificidad^{50,51}. Posteriormente, esta misma plataforma se ha utilizado para diseñar *microarrays* que incluyen genes que codifican AmpC plasmídicas⁵² y carbapenemasas⁵³⁻⁵⁶.

Las técnicas basadas en la espectrofotometría de masas (MALDI-TOF) permiten detectar la disminución de la cantidad de un antibiótico o la aparición de proteínas secundarias derivadas de su hidrólisis⁵⁷⁻⁵⁹. Son técnicas rápidas y baratas, pero en general aportan poco en comparación con otras determinaciones fenotípicas como el CarbaNP recientemente descrito⁶⁰, y hay poca información sobre su especificidad y sensibilidad. Se están desarrollando otras posibles aplicaciones de esta tecnología, como la detección del pico específico de masa atómica correspondiente a cada β -lactamasa⁶¹, pero se requiere una muy alta resolución para distinguir entre los diferentes tipos.

Otros métodos alternativos para la detección molecular de BLEE y carbapenemasas de reciente desarrollo incluyen la amplificación isotérmica mediada por bucle (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP)⁶²⁻⁶⁴; la cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizada (*denaturing high-performance liquid chromatography*, dHPLC)^{65,66}; el *FilmArray*, que permite detectar la presencia de diferentes ácidos

Tabla 1

Métodos comerciales para la detección molecular de β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas

Método	Diana	Nombre	Compañía
PCR múltiple más hibridación	TEM, SHV, CTX-M, OXA	Hyplex ESBL	Amplex Diagnostic
	KPC, IMP, VIM, NDM y OXA-48 like	Hyplex Superbug	Amplex Diagnostic
	OXA-23, OXA-24 y OXA-51 like	Hyplex CarboxA	Amplex Diagnostic
NASBA (amplificación simple a tiempo real)	KPC	NucliSENS EasyQ KPC Test	bioMérieux
PCR múltiple a tiempo real	KPC, NDM, OXA-48, VIM, CTX-M-1, CTX-M-9	eazyplex® Superbug CRE	Amplex Diagnostic
	KPC, NDM, OXA-48, VIM, OXA-23, OXA-40 y OXA-58 (A) o OXA-181 (B)	eazyplex® SuperBug complete A and B	Amplex Diagnostic
	TEM, SHV, CTX-M	PCR Check-MDR ESBL kit	Checkpoints Health BV
	KPC, IMP, OXA-48 like, VIM y NDM	PCR Check-MDR Carba kit	Checkpoints Health BV
	KPC, IMP-1, OXA-48 like, VIM, NDM	PCR Xpert Carba-R Assay	Cepheid/Werfen
	CTX-M, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM	PCR ePlex BCID-GN	GenMark Dx/Werfen
	ADN de <i>Escherichia coli</i> , CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9	PCR RealCycler CTXE	Progenie Molecular/Werfen
	CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9	PCR RealCycler BLACTX	Progenie Molecular/Werfen
	AmpC de los grupos ACC, EBC, CIT y DHA	PCR RealCycler AMPC	Progenie Molecular/Werfen
	IMP, VIM	PCR RealCycler IMVI	Progenie Molecular/Werfen
	KPC, NDM-1	PCR RealCycler KPND	Progenie Molecular/Werfen
	VIM, OXA-48 like, KPC	PCR RealCycler OXVIKP	Progenie Molecular/Werfen
	Diseños "in house"	Real Time Ready (Light Cycler). Compatible con PCR simples o múltiples a tiempo real	Roche Applied science
LAMP	Diseños "in house"	OC-SENSOR System. Compatible con PCR simples o múltiples a tiempo real	Eiken Chemical Co., Ltd.
Microarray	TEM, SHV, CTX-M, IMP, KPC, OXA-48 like	Check-MDR CT102	Checkpoints Health BV/HAIN Lifescience
	SHV, CTX-M, AmpC, carbapenemasas	Check-MDR CT103	Checkpoints Health BV/HAIN Lifescience
	KPC, OXA-48 o VIM/NDM	Check-Direct CPE	Checkpoints Health BV/HAIN Lifescience
	OXA, GIM, KPC, BLEE	Identibac CarbDetect AS-1 Kit	Alere Technologies GmbH

BLEE: β -lactamasas de espectro extendido; LAMP: *loop-mediated isothermal amplification*; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 2Métodos comerciales para el diagnóstico molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM)

Microorganismo detectado	Muestra	Método	Compañía	Diana	Plataforma de análisis
SARM	Nasal	BD GeneOhm MRSA BD GeneOhm MRSA ACT	Becton Dickinson	SSCmec- <i>ofrX</i>	SmartCycler System/PCR en tiempo real
SARM	Nasal	BD MAX MRSA	Becton Dickinson	SSCmec- <i>ofrX</i>	BD MAX System/PCR en tiempo real
SARM	Nasal	Xpert MRSA	Cepheid	Lugar de inserción (<i>attBsc</i>) del SCCmec	GeneXpert DX System/PCR en tiempo real
SARM	Nasal	MRSA Advanced Test	Roche	SSCmec- <i>ofrX</i>	LightCycler/PCR en tiempo real
SARM	Nasal	NucliSENS EasyQ MRSA	bioMérieux	SSCmec- <i>ofrX</i> <i>mecA</i>	EasyQ System (NASBA)
SARM y <i>Sau</i>	Herida	Xpert MRSA/SA SSTI	Cepheid	<i>spa</i> SSCmec <i>mecA</i>	GeneXpert DX System/PCR en tiempo real
SARM y <i>Sau</i>	Nasal	Xpert SA Nasal Complete	Cepheid	<i>spa</i> SSCmec <i>mecA</i>	GeneXpert DX System/PCR en tiempo real
SARM y <i>Sau</i>	Diversas HP	GENOMERA™ MRSA/SA	Abacus diagnostica	<i>mecA</i> Fragmento ADN específico de <i>Sau</i>	PCR más hibridación
SARM y <i>Sau</i>	HP	Xpert MRSA/SA Blood Culture	Cepheid	<i>spa</i> SSCmec <i>mecA</i>	GeneXpert DX System/PCR en tiempo real
SARM y <i>Sau</i>	HP	BD GeneOhm StaphSR	Becton Dickinson	<i>nuc</i> Lugar de inserción (<i>attBsc</i>) del SCCmec	SmartCycler System/PCR en tiempo real
SARM y <i>Sau</i>	HP	BC-GP*	Nanosphere	<i>gyrB</i> de <i>Sau</i> <i>mecA</i>	Microarray
SARM	Diversas	Genotype MRSA Direct	HainLifeSciences	Genes específicos de especie <i>mecA</i> <i>mecC</i>	PCR más hibridación en tira
SARM	Nasal	BD MAX™ MRSA XT	Becton Dickinson	<i>mecA</i> <i>mecC</i> Varios tipos SSCmec- <i>ofrX</i>	BD MAX System/PCR en tiempo real

*Verigene Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test.

HP: hemocultivos positivos; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; *Sau*: *Staphylococcus aureus*.

nucleicos de una muestra sin procesar⁶⁷; el análisis de polimorfismos de fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism*, AFLPs), que posee un alto poder de detección de la variabilidad genética^{68,69}, y los ensayos de amplificación-mutación (*mismatch amplification mutation assay*, MAMA), que mediante PCR aleloespecíficas permiten la amplificación de secuencias que difieren en tan solo un par de bases⁷⁰⁻⁷².

Como se ha ido reflejando en el texto, numerosos métodos moleculares de detección rápida se han comercializado en los últimos años para la detección de BLEE y carbapenemasas, basados principalmente en PCR en tiempo real y *microarrays*. La tabla 1 resume algunos de los principales métodos comerciales disponibles.

Resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*

S. aureus es uno de los principales patógenos bacterianos implicados en infecciones sistémicas con una alta morbilidad⁷³. Según un informe publicado recientemente por el European Center for Diseases Control and Prevention (ECDC)¹², *S. aureus* es el segundo patógeno bacteriano en infección nosocomial tras *Escherichia coli*, con un 15,9% de los casos. El primer caso de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) se describió a principios de los años sesenta del pasado siglo; 20 años después, las cepas de SARM se habían extendido convirtién-

dose en una de las principales amenazas en el campo de las infecciones intrahospitalarias. Según datos de la red EARS-Net del ECDC, la prevalencia de SARM en bacteriemias en España fue del 24,2% en 2012 (http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx).

El control de la diseminación de SARM, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, es en la actualidad una prioridad mundial de salud pública. La detección rápida de la colonización o infección por SARM es un elemento clave en los programas de control de la infección nosocomial. El cribado de colonización por SARM al ingreso hospitalario es, por ejemplo, la base de la política de control “*search and destroy*” desarrollada con éxito en países como Países Bajos y Noruega⁷⁴.

Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina sobre cultivo bacteriano por métodos no moleculares

El cultivo bacteriano, junto con el estudio de sensibilidad a oxacilina o cefoxitina, continúa siendo el método de referencia para la detección de SARM. Sin embargo tarda unas 48-72 h en aportar resultados, tiempo en el que un paciente colonizado por SARM no sujeto a precauciones de contacto puede estar diseminándolo. La siembra de la muestra clínica directamente en medios cromogénicos, técnica utilizada

con frecuencia con buenos resultados^{9,10}, acorta significativamente el tiempo de diagnóstico, pero sigue requiriendo de una incubación de 18-24 h. Además, la especificidad variable de estos métodos aconseja una confirmación por otras técnicas⁹. Existen diferentes métodos de diagnóstico rápido, moleculares y no moleculares, para la detección/confirmación de SARM sobre un cultivo bacteriano puro. Entre los no moleculares, la detección de la proteína PBP2a mediante técnicas de aglutinación con látex ha demostrado ser coste-efectiva y tener una buena sensibilidad y especificidad, aunque pueden darse falsos negativos⁷⁵⁻⁷⁷. El estudio de los patrones de proteínas mediante espectrofotometría de masas (MALDI-TOF) también se ha utilizado para el diagnóstico de SARM⁷⁸, aunque la distinción entre los patrones de SARM y *S. aureus* sensible a meticilina ha demostrado ser compleja⁷⁸.

Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina por métodos moleculares

Los métodos moleculares para la detección de SARM, basados principalmente en la detección por PCR de genes resistencia (*mecA*, *mecC*) y genes específicos de especie, han experimentado un gran auge en los últimos años^{48,79-87}. Aunque muchos de ellos pueden utilizarse sobre cultivo bacteriano, la posibilidad de aplicarse directamente de muestra clínica permite acortar el tiempo de obtención de resultados a un intervalo de 1-4 h⁸⁸. El desarrollo inicial de estas técnicas iba dirigido a muestras nasales, por lo que eran especialmente útiles en estudios de colonización^{87,88}. La posibilidad creciente de ser utilizadas en otras muestras como faringe, heridas, piel, etc., e incluso sobre hemocultivos positivos amplía exponencialmente su utilidad^{48,89}.

El primer diseño de PCR para la detección del gen *mecA* se publicó en 1991⁹⁰. Los primeros protocolos utilizados para la detección de SARM en muestra clínica se basaban en PCR múltiples que incluían iniciadores de *mecA* y otros que amplificaban genes específicos de especie como el gen *nuc* o el SA442^{80,81}. Sin embargo, la posible presencia de *S. aureus* y de *Staphylococcus coagulans* negativos (SCN) en una misma muestra dificulta la interpretación de los resultados obtenidos por estas técnicas aumentando la frecuencia de falsos positivos⁹¹. Este problema se corrigió con el desarrollo de PCR para la amplificación del fragmento de unión entre el extremo derecho del casete cromosómico *SCCmec* que contiene el gen *mecA* y el fragmento *orfX* específico de *S. aureus* (*SSCmec-orfX*)^{82,83}. Se han desarrollado diferentes ensayos comerciales basados en este principio^{84,85} (tabla 2), que han demostrado una alta sensibilidad y especificidad comparados con métodos convencionales de cultivo y antibiograma^{48,92}. Sin embargo se han descrito resultados falsos positivos en relación con la detección de casetes *SCCmec* que han perdido el gen *mecA*^{93,94}, o bien por la presencia de un fragmento *orfX* análogo al de *S. aureus* en SCN^{83,95}. Por otra parte, la alta diversidad en las secuencias del fragmento diana de la unión *SCCmec-orfX*^{96,97} y la aparición de nuevas variantes *mec*, como el gen *mecC* recientemente descrito⁹⁸, generan la aparición de falsos negativos con estas técnicas. Además se han detectado nuevas mutaciones en las PBP 1, 2 y 3 de *S. aureus* relacionadas con la resistencia a meticilina en ausencia de genes *mec*⁹⁹. La verdadera prevalencia de todas estas variantes, que condicionan la sensibilidad y especificidad de los métodos basados en la detección de *SCCmec-orfX*, no está bien estudiada pero se deben considerar para el desarrollo de nuevos métodos moleculares.

Algunas de las nuevas aproximaciones incluyen la detección de ambos tipos de genes *mec*, *mecA* y *mecC*, más genes específicos de *S. aureus* como el *spa* o el SA443¹⁰⁰ o las diferentes variantes del extremo derecho de *SCCmec*¹⁰¹.

Sistemas comerciales de detección molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas comerciales para la detección molecular de SARM. La tabla 2 muestra un

resumen de los principales métodos comerciales disponibles especificando algunas de sus características básicas, como las dianas que utilizan y la muestra sobre la que se pueden aplicar. Aunque numerosos estudios han demostrado una alta sensibilidad y especificidad para la mayoría de estos métodos en comparación con sistemas basados en el cultivo^{48,87,89}, la naturaleza de las dianas de cada uno de ellos condiciona la presencia de falsos positivos y negativos, según se ha mencionado previamente. El desarrollo de sistemas totalmente automatizados con poco requerimiento técnico que pueden ser utilizados al lado del paciente (*point of care tests*) permite la toma de decisiones terapéuticas o de control de la infección casi inmediata⁴⁸. Sin embargo, su alto coste, la necesidad de formar a personal clínico, no de laboratorio, en su uso y la ausencia de validación e interpretación por expertos cualificados son cuestiones que hay que considerar en su aplicación.

Conclusiones

La implementación de métodos moleculares de detección rápida de mecanismos de resistencia está generando una mejoría en el tratamiento y control de las infecciones producidas por BMR. El desarrollo de estos sistemas debe basarse en una adecuada vigilancia epidemiológica que permita conocer las diferentes variantes de los genes/diana que utilizan para garantizar el mantenimiento de su eficacia. De igual forma, la interpretación de los resultados obtenidos debe realizarse en consonancia con dicha situación epidemiológica y con el conocimiento detallado de las dianas incluidas en estos métodos. En cualquier caso, solo el aislamiento de las BMR permite la realización de estudios de clonalidad y estudios de sensibilidad detallados que permiten conocer el nivel de resistencia y la existencia de sinergias entre distintos antibióticos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. ECDC/EMA Joint Working Group. ECDC/ EMA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2009.
2. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1987-94.
3. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:6344-7.
4. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambi Andrasevi A, Canton R, Carmeli Y, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. Euro Surveill. 2013;18. pii:20525.
5. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2001 (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2)
6. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:179-94.
7. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:90-103.
8. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf
9. Nonhoff C, Denis O, Brenner A, Buidin P, Legros N, Thiroux C, et al. Comparison of three chromogenic media and enrichment broth media for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from mucocutaneous screening specimens: comparison of MRSA chromogenic media. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28:363-9.
10. Malhotra-Kumar S, Abrahantes JC, Sabiiti W, Lammens C, Vercauteren G, Ieven M, et al. Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2010;48:1040-6.

11. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 and SATURN WP1 Study Teams. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1140-6.
12. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013.
13. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23:320-6.
14. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1791-8.
15. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, et al. [The threat of the carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain: Positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:666-70.
16. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:682-707.
17. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1170-5.
18. Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, et al. Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2459-63.
19. Ruiz de Alegría C, Rodríguez-Baño J, Cano ME, Hernández-Bello JR, Calvo J, Román E, et al. *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: microbiological and clinical features. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1134-6.
20. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:933-51.
21. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1-14.
22. Walther-Rasmussen J, Heibly N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:373-83.
23. De Champs C, Chanal C, Sirot D, Baraduc R, Romaszko JP, Bonnet R, et al. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:634-9.
24. Zhou XY, Bordon F, Sirot D, Kitzis MD, Gutmann L. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:1085-9.
25. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16:47-51.
26. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2153-62.
27. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-van Hall MA. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37:356-9.
28. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:490-5.
29. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:119-23.
30. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3115-8.
31. Hong SS, Kim K, Huh JY, Jung B, Kang MS, Hong SG. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. *Ann Lab Med*. 2012;32:359-61.
32. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:321-2.
33. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3877-80.
34. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors- occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113:1014-26.
35. Pobolelova YI, Ulyashova MM, Rubtsova MY, Egorov AM. Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D. *Biochemistry (Mosc)*. 2014;79:566-70.
36. Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMJ Infect Dis*. 2014;14:27.
37. Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, Woodford N, Aliyu SH. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42:352-6.
38. Hindiyyeh M, Smollan G, Grossman Z, Ram D, Robinov J, Belausov N, et al. Rapid detection of *bla_{qac}* carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR assay using bactec blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2480-4.
39. Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*bla_{qac}*). *J Clin Microbiol*. 2012;50:2783-5.
40. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993;11:1026-30.
41. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:906-9.
42. Nijhuis R, Van Zwet A, Stuart JC, Weijers T, Savelkoul P. Rapid molecular detection of extended-spectrum β -lactamase gene variants with a novel ligation-mediated realtime PCR. *J Med Microbiol*. 2012;61:1563-7.
43. Singh K, Mangold KA, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, et al. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2596-600.
44. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, et al. Detection of metallo- β -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods* 2010;83:185-7.
45. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1865-9.
46. Hofko M, Mischnik A, Kaase M, Zimmermann S, Dalpke AH. Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max system. *J Clin Microbiol*. 2014;52:1701-4.
47. Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, Van Zwet A. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77:316-20.
48. Harbarth S, Hawkey PM, Tenover F, Stefani S, Pantosti A, Struelens MJ. Update on screening and clinical diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37:110-7.
49. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC, Jacobs MR, et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type β -lactamase genes in Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2618-22.
50. Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH, Vos P, et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1377-81.
51. Winternans BB, Reuland EA, Winternans RG, Bergmans AM, Kluytmans JA. The costeffectiveness of ESBL detection: towards molecular detection methods? *Clin Microbiol Infect* 2012. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:662-5.
52. Bogaerts P, Hujer AM, Naas T, De Castro RR, Endimiani A, Nordmann P, et al. Multicenter evaluation of a new DNA microarray for rapid detection of clinically relevant *bla* genes from β -lactam-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:4457-60.
53. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1608-13.
54. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:3086-92.
55. Fishbain JT, Sinyavskiy O, Riederer K, Hujer AM, Bonomo RA. Detection of extended-spectrum β -lactamase and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes directly from blood cultures by use of a nucleic acid microarray. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2901-4.
56. Braun SD, Monecke S, Thürmer A, Ruppelt A, Makarewicz O, Pletz M, et al. Rapid identification of carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay. *PLoS One*. 2014;9:e102232.
57. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*. 2012;50:927-37.
58. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:103-14.
59. Oviaño M, Fernandez B, Fernández A, Barba MJ, Mourinho C, Bou G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:1146-57.
60. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1503-7.
61. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stingl CS, et al. A step towards the discrimination of β -lactamase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit*. 2012;18:MT71-7.
62. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:E63.
63. Liu W, Zou D, Li Y, Wang X, He X, Wei X, et al. Sensitive and rapid detection of the new Delhi metallo-beta-lactamase gene by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1580-5.

64. Thirapanmethee K, Pothisamutyothin K, Nathisuwan S, Chomnawang MT, Wiwat C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the *bla*_{CTX-M-9} gene for detection of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Immunol. 2014;58:665-56.
65. Xiao W, Stern D, Jain M, Huber CG, Oefner PJ. Multiplex capillary denaturing high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. Biotechniques. 2001;30:1332-8.
66. Xu L, Evans J, Ling T, Nye K, Hawkey P. Rapid genotyping of CTX-M extended-spectrum β -lactamases by denaturing high-performance liquid chromatography. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1446-54.
67. Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, Meyers L, Nilsson K, Jones DE, et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. PLoS One. 2011;6:e26047.
68. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic species 3*) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic species 13TU*). Res Microbiol. 2011;162:393-404.
69. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, Kraker ME, Van der Zee A, Van Burgh S, De Greeff SC, et al. Surveillance and outbreak reports: Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. Euro Surveill. 2014;19:1-12.
70. Cha RS, Zarbl H, Keohavong P, Thilly WG. Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA): Application to the c-H-ras gene. Genome Res. 1992;2:14-20.
71. Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. Biomed Res Int. 2014;2014:601-30.
72. Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. PLoS One. 2012;7:e32866.
73. Gould IM, David MZ, Espósito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012;39:96-104.
74. Bode LG, Wertheim HF, Kluytmans JA, Bogaers-Hofman D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, et al. Sustained low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* upon admission to hospital in The Netherlands. J Hosp Infect. 2011;79:198-201.
75. Bressler AM, Williams T, Culler EE, Zhu W, Lonsway D, Patel JB, et al. Correlation of penicillin binding protein 2a detection with oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and discovery of a novel penicillin binding protein 2a mutation. J Clin Microbiol. 2005;43:4541-4.
76. Jureen R, Bottolfson KL, Grewal H, Digrales A. Comparative evaluation of a commercial test for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. APMIS. 2001;109:787-90.
77. Qian Q, Venkataraman L, Kirby JE, Gold HS, Yamazumi T. Direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in blood culture broth by use of a penicillin binding protein 2a latex agglutination test. J Clin Microbiol. 2010;48:1420-1.
78. Lu JJ, Tsai FJ, Ho CM, Liu YC, Chen CJ. Peptide biomarker discovery for identification of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains by MALDI-TOF. Anal Chem. 2012;84:5685-92.
79. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill F 3rd. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol. 1999;37:2952-61.
80. 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.
81. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1998;36:618-23.
82. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt, Bernier M, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol. 2004;42:1875-84.
83. Cuny C, Witte W. PCR for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne *orfX*. Clin Microbiol Infect. 2005;11:834-7.
84. Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O'Connell B. Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. J Clin Microbiol. 2008;46:3285-90.
85. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2004;42:5578-81.
86. Hirvonen JJ, Kaukoranta SS. GenomEra MRSA/SA, a fully automated homogeneous PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and the marker of methicillin resistance in various sample matrices. Expert Rev Mol Diagn. 2013;13:655-65.
87. Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. Ger Med Sci. 2009;6:7.
88. Tacconelli E, De Angelis G, De Waure C, Cataldo MA, La Torre G, Cauda R. Rapid screening tests for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2009;9:546-54.
89. Palavecino EL. Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens. Methods Mol Biol. 2014;1085:71-83.
90. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29:2240-4.
91. Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, et al. Does nasal colonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* occurs frequently enough to present a risk of false-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* determinations by molecular methods. J Clin Microbiol. 2006;44:229-31.
92. Polisenia J, Chen S, Cimon K, McGill S, Forward K, Gardam M. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review. BMC Infect Dis. 2011;11:336.
93. Deplano A, Tassios PT, Glupczynski Y, Godfroid E, Struelens MJ. In vivo deletion of the methicillin resistance *mec* region from the chromosome of *Staphylococcus aureus* strains. J Antimicrob Chemother. 2000;46:617-20.
94. Corkill JE, Anson JJ, Griffiths P, Hart CA. Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) in a methicillin susceptible (*mecA* gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. J Antimicrob Chemother. 2004;54:229-31.
95. Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D, Schrenzel J. Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2007;45:2011-3.
96. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:4961-7.
97. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Infect Chemother. 2013;45:117-36.
98. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11:595-603.
99. Ba X, Harrison EM, Edwards GF, Holden MT, Larsen AR, Petersen A, et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. J Antimicrob Chemother. 2014;69:594-7.
100. Nijhuis RH, Van Maarseveen NM, Van Hanne E, Van Zwet AA, Mascini EM. A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2014;52:2861-7.
101. Dalpke AH, Hofko M, Stock C, Zimmermann S. Evaluation of the BD Max MRSA XT assay for use with different swab types. J Clin Microbiol. 2014;52:4343-6.