

Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional

Gabriel Acosta-Pérez, PhD,⁽¹⁾ Gabriela Rodríguez-Ábrego, MC,⁽²⁾ Ernesto Longoria-Revilla, M Sc,⁽³⁾ María Eugenia Castro-Mussot, PhD.⁽³⁾

Acosta-Pérez G, Rodríguez-Ábrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot ME. Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. *Salud Publica Mex* 2012;54:1-6.

Acosta-Pérez G, Rodríguez-Ábrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot ME. Evaluation of four methods for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at a regional hospital in Mexico. *Salud Publica Mex* 2012;54:1-6.

Resumen

Objetivo. Investigar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) en aislados clínicos y determinar la concordancia entre los métodos de detección de MRSA en un laboratorio con recursos y personal limitado. **Material y métodos.** Se analizaron 140 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras clínicas de diferentes departamentos mediante pruebas convencionales: producción de β -lactamasa, sensibilidad a oxacilina con MIC-Vitek 2-XL, ChromID MRSA, difusión en agar para discos de 30 μ g de cefoxitina, detección de PBP2a y PCR para el gen *mecA*. Se determinó el índice kappa de Cohen, para evaluar la concordancia entre los diferentes métodos utilizados. **Resultados.** La prevalencia encontrada fue de 90.7%. La sensibilidad y especificidad para los diferentes métodos de detección fue: difusión en disco para cefoxitina 97 y 92% respectivamente, MIC Vitek 2-XL 97 y 69%, ChromID MRSA 97 y 85% y detección de PBP2a 98 y 100%. **Conclusiones.** Todos los métodos son muy buenos para la detección de MRSA; la elección en el uso de cada método dependerá de la infraestructura de cada laboratorio.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*; prevalencia; vigilancia; resistencia; México

Abstract

Objective. To estimate the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in clinical isolates and to compare different methods for detection of MRSA in a lab with limited available personnel and resources. **Material and Methods.** 140 *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in several departments were assayed for β -lactamase production, MIC-Vitek 2 oxacillin, ChromID MRSA, disk diffusion in agar for cefoxitin 30 μ g and PBP2a detection. The results of conventional tests were compared with the "gold standard" PCR test for *mecA* gene. Cohen's kappa index was also calculated in order to evaluate the intra assay agreement between the used methods. **Results.** The found prevalence was 90.7%. Sensitivity and specificity were: disk diffusion for cefoxitin 97 and 92% respectively, MIC Vitek 2-XL 97 and 69%, ChromID MRSA 97 and 85%, and PBP2a detection 98 and 100%. **Conclusions.** All methods are very good for detecting MRSA, choosing a method to use will depend on each laboratory infrastructure.

Key words: *Staphylococcus aureus*; prevalence; surveillance; resistance; Mexico

(1) Laboratorio de Microbiología, Hospital General Regional No. 1, Instituto Mexicano del Seguro Social. México DF, México.

(2) Servicio de Epidemiología Hospitalaria. Hospital General Regional No.1, Instituto Mexicano del Seguro Social. México DF, México.

(3) Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México DF, México.

Fecha de recibido: 3 de mayo de 2011 • Fecha de aceptado: 5 de octubre de 2011

Autor de correspondencia: Dr. Gabriel Acosta-Pérez. Laboratorio de Microbiología. Hospital General Regional No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Gabriel Mancera 222, col. Del Valle. 03100, México DF, México.

Correo electrónico: microbiol.inmuno@gmail.com

Un fenómeno creciente es la resistencia de los gérmenes a los antibióticos convencionales y es considerado un problema de salud pública debido a las implicaciones que en los últimos años ha tenido la aparición de bacterias multirresistentes, lo que ha dificultado el tratamiento de las infecciones y reducido las opciones terapéuticas. Esto es particularmente cierto para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Este microorganismo es uno de los principales causantes de infecciones tanto nosocomiales como comunitarias. Es el agente etiológico de varias patologías que incluyen infecciones de tejidos blandos y piel, bacteremias, endocarditis, así como infecciones del sistema nervioso central y del tracto genitourinario.¹⁻⁵

La causa de la resistencia a la meticilina y a todos los β -lactámicos es el gen *mecA*, que codifica para la proteína de 78 kDa: PBP2a (*penicillin binding protein 2a*), y está situado en un elemento genético móvil denominado SCCmec (*staphylococcal cassette chromosome mec*). Hasta ahora se han descrito siete diferentes tipos de este gen.⁶ En ausencia de la PBP2a, los antibióticos β -lactámicos se unen a la PBP nativa de la pared celular bacteriana, lo que resulta en la interrupción de la síntesis de la peptidoglicana. En los MRSA, la PBP2a está presente pero posee tan baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos que no existe interrupción en la síntesis de peptidoglicanas.⁷ En las infecciones por MRSA, el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) recomienda no administrar ningún antibiótico β -lactámico debido a que en la práctica se han observado fallas en la terapéutica.⁸

Desde su primera aparición en el Reino Unido en 1961, los MRSA se han distribuido por todo el mundo y su prevalencia en los últimos 40 años se ha incrementado, sin embargo, esto varía entre países. En Europa, la prevalencia reportada oscila entre 25 y 50%.⁹⁻¹¹ En 1991, Tomasz y col. describieron cuatro clases fenotípicas de resistencia sobre la base de la CMI (concentración mínima inhibitoria) *in vitro* para meticilina. Tres de éstas fueron heterogéneas (clase 1-3) y una homogénea. Las CMI para las clases 1-3 se encuentran entre 1.5 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que para la clase 4 son $>100 \mu\text{g}/\text{ml}$.¹² Ello implica que pueden existir colonias que muestren un fenotipo de la clase heterogénea y que sean erróneamente clasificadas como sensibles, lo que crea la necesidad de contar con metodología adecuada para la correcta identificación de estas cepas.

Debido a la enorme disparidad de reactivos existente en los hospitales de primero, segundo y tercer nivel de la institución estudiada, se planteó el objetivo de determinar la prevalencia de MRSA en aislados clínicos mediante diferentes métodos diagnósticos, así como su sensibilidad y especificidad, y la concordancia entre dos rangos en categorías mutuamente exclusivas, mediante

el índice kappa, con la finalidad de identificar la mejor opción para el trabajo diario en los hospitales.

Aunque en el plano internacional existen múltiples trabajos en los que se comparan diversos métodos de detección de MRSA contra el estándar de oro, que es la PCR para el gen *mecA*,¹³ en México no hay un solo trabajo reportado bajo las condiciones de los laboratorios clínicos de las instituciones del sector salud.

Material y métodos

Este proyecto fue evaluado y avalado por el Comité local de investigación y ética reunido el día 11 de diciembre de 2008 registrado con el número R-2008-3609-31.

Cepas bacterianas. Se estudiaron 140 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras clínicas del laboratorio de bacteriología médica del Hospital General Regional No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la Ciudad de México. Las cepas se identificaron mediante la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y coagulasa, entre enero y febrero de 2009 y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso. Se cultivaron a 37°C en medio Columbia suplementado con 5% de sangre de carnero, para después ser comprobadas con la tinción de Gram y la prueba de catalasa, antes de ser estudiadas con la finalidad de verificar la pureza de las cepas. Las cepas usadas como controles en todos los experimentos incluyen MSSA ATCC 25923 (β -lactamasa negativa) y la MRSA ATCC 43300.

Identificación. Se corrieron pruebas de identificación y sensibilidad utilizando tarjetas Vitek GPI y GPS-61 del sistema automatizado Vitek 2-XL bajo las condiciones del fabricante. Se tomaron las lecturas automáticamente cada 15 minutos, en ambos casos. Los puntos de corte utilizados para cepas sensibles a oxacilina fueron $\leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ y $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ para cepas resistentes, de acuerdo con las recomendaciones de la CLSI.⁸

Detección de β -lactamasa. A todas las cepas se les determinó la producción de β -lactamasa mediante el uso de una cefalosporina cromogénica comercial denominada Cefinace bajo las condiciones del fabricante.

Prueba de difusión en disco para cefoxitina. La prueba de susceptibilidad a cefoxitina se realizó con discos de cefoxitina de 30 μg sobre placas de agar Mueller-Hinton de acuerdo con las especificaciones de la CLSI. Las placas se incubaron 18 h a 35°C y los halos de inhibición se midieron en mm. Los puntos de corte para cefoxitina fueron los reportados por la CLSI: resistente $\leq 21 \text{ mm}$ y sensible $\geq 22 \text{ mm}$.⁸

Detección de PBP2a. Se utilizó la prueba Slidex MRSA detection que se basa en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales

contra PBP2a y se siguieron las especificaciones del fabricante.

ChromID MRSA. Paralelamente a las otras pruebas, se inocularon placas de medio cromogénico para MRSA con cada uno de los aislados estudiados y las cepas control. Se incubaron a 35°C durante 24 h, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la detección del gen *mecA* se prepararon suspensiones de cultivos de 20 horas con 350 millones/ml de cada aislado y cepas control de *S. aureus*; se llevaron a 10 minutos de ebullición y se centrifugaron durante 2 minutos a 12 000 rpm para utilizar 5 ml de sobrenadante conteniendo ADN bacteriano. Se realizó la PCR con las siguientes secuencias como iniciadores: *mecA* plus: (5'-TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG-3') y *mecA* minus: (5'-CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG-3'). El producto de PCR generado tiene un tamaño de 310 pb. Cada muestra también se probó con la secuencia de 370 pb del gen ribosomal 16S; los iniciadores fueron: 16S plus: (5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3') y 16S menos (5'-AAC TGG AAG AAG GTG GGG AT-3'). Se utilizaron el Master Mix kit y un termociclador. Las reacciones se corrieron bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 52°C y 30s a 72°C, y la extensión final fue de 5 min a 72°C. Los productos resultantes se visualizaron en geles de agarosa a 2% con bromuro de etidio, bajo luz ultravioleta. Se incluyeron controles positivo y negativo en cada PCR. Los datos se tabularon y se analizaron con el programa SPSS.

Análisis estadístico. Se utilizó el índice kappa como coeficiente de concordancia para escalas nominales que mide la confiabilidad y validez del diagnóstico. Se utilizó una tabla de contingencia 2x2, donde las celdas diagonales a y d representan concordancia, y las b y c representan discordancia. El índice kappa corrige el porcentaje de concordancia entre intervalos tomando en cuenta la proporción de concordancia esperada al azar.

$k = \text{concordancia observada} - \text{concordancia al azar} / 1 - \text{concordancia al azar} = \text{Po} - \text{Pc} / 1 - \text{Pc}$. Un valor de 0 para k indica no concordancia y un valor de 1 indica concordancia perfecta. Un buen método diagnóstico exhibe buena concordancia; los criterios para la interpretación de la fuerza de concordancia del índice kappa van de acuerdo con el valor de k: < 0.20 pobre, 0.21-0.40 débil, 0.41-0.60 moderada, 0.61 - 0.80 buena, 0.81- 1.00 muy buena.

Resultados

De los 140 aislados de *S. aureus*, se identificaron por PCR 127/140 (90.7%) como portadores del gen *mecA* (MRSA)

y 13/140 (9.3%) fueron negativas para el gen (MSSA). Se encontró que 131/140 (93%) de las cepas de *S. aureus* fueron productoras de β -lactamasa.

Prueba de difusión en disco para cefoxitina. 124/140 cepas fueron resistentes a cefoxitina. Los diámetros de las zonas de inhibición entre las cepas MRSA y MSSA fueron muy distintos. Para los MSSA estuvieron entre 22-34 mm y para los MRSA se encontraron entre 6 y 20 mm. La prueba de difusión para cefoxitina (Kirby-Bauer) mostró una sensibilidad de 97%, una especificidad de 92% y un porcentaje de concordancia del índice kappa de 0.77% que significa una fuerza de concordancia buena (cuadro I). Tres cepas portadoras del gen *mecA* fueron sensibles por este método (cuadro II).

ChromID MRSA. 125/140 cepas crecieron en este medio de cultivo. La sensibilidad obtenida con la prueba ChromID MRSA fue de 97%, y la especificidad de 85%; el porcentaje de concordancia observado para kappa fue sustancial, con un valor de 0.76, que es bueno (cuadro I). Tres cepas que no crecieron en este medio mostraron el gen *mecA* (cuadro II). Una cepa que creció en este medio fue negativa para el gen *mecA* (cuadro II).

Detección de PBP2a. 124/140 cepas expresaron la proteína PBP2a. El método de detección de PBP2a detectó todos los aislados *mecA* positivos en un periodo de 20 a 30 minutos, excepto por tres cepas *mecA* positivas en las que no se encontró la PBP2a (cuadro II). Todas las cepas *mecA* negativas también resultaron negativas para PBP2a. Este método mostró 98% de sensibilidad y 100% de especificidad, con un valor de k de 0.88, que es muy bueno (cuadro I).

Vitek 2-XL. 127/140 cepas fueron resistentes a oxacilina por este método. Todos los aislados MSSA fueron ChromID MRSA negativos, y las CMI para oxacilina de todos los aislados MSSA se encontraron entre 0.25 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$. Todas las cepas MRSA aisladas mostraron concentraciones de oxacilina mayores a $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. Este método mostró 97% de sensibilidad, con especificidad de 69%. El porcentaje de concordancia observado para el índice kappa fue sustancial, con un valor de 0.66, que es bueno (cuadro I). En el cuadro II se muestran los resultados de 11 cepas con discrepancias. Todos los ensayos mostraron resultados satisfactorios con las cepas de referencia.

Discusión

La utilización de cefoxitina en lugar de oxacilina como antibiótico de elección tiene la ventaja de ser mejor inductor de la expresión del gen *mecA*, y más sensible con las poblaciones MRSA de bajo nivel de resistencia, clasificadas erróneamente como MSSA.¹⁴⁻¹⁵ En las prue-

Cuadro I

EVALUACIÓN DE LA CONCORDANCIA DIAGNÓSTICA DE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE AISLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-RESISTENTE (MRSA) MEDIANTE ÍNDICE KAPPA. HOSPITAL GENERAL REGIONAL NO. 1 DR. CARLOS MACGREGOR SÁNCHEZ NAVARRO. ENERO-FEBRERO 2009.

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	kappa	ES	Significancia P
Kirby-Bauer	97% 123/127	92% 12/13	0.77	0.087	0.001
Vitek 2	97% 123/127	69% 9/13	0.66	0.112	0.001
ChromID MRSA	97% 123/127	85% 11/13	0.76	0.093	0.001
Slidex MRSA	98% 124/127	100% 13/13	0.88	0.070	0.001

Kappa: Índice de concordancia kappa

ES: Error estándar

ChromID MRSA: Medio cromogénico para MRSA

Slidex MRSA: Kit de detección de PBP2a

Cuadro II

CARACTERÍSTICAS DE 11 AISLADOS ERRÓNEAMENTE CLASIFICADOS MEDIANTE VITEK 2 O CHROMID MRSA. HOSPITAL GENERAL REGIONAL NO. 1 DR. CARLOS MACGREGOR SÁNCHEZ NAVARRO. ENERO-FEBRERO 2009.

Num. de aislado	Cefinase	Kirby-Bauer ^a (mm)	Vitek-2 ^b (µg/ml)	ChromID MRSA	Slidex MRSA	mecA	Pb. fenotipo
26	(+)	20 (R)	0.25 (S)	S	(-)	(-)	BORSA
28	(+)	6 (R)	0.25 (S)	S	(+)	(+)	MRSA heterogéneo
29	(+)	23 (S)	≥4 (R)	R	(-)	(-)	MSSA
31	(-)	24 (S)	≥4 (R)	S	(-)	(-)	MSSA
39	(+)	6 (R)	≥4 (R)	S	(+)	(+)	MRSA
64	(+)	30 (S)	≥4 (R)	R	(-)	(+)	MSSA
67	(+)	34 (S)	2.0 (S)	S	(-)	(+)	MSSA
92	(+)	30 (S)	0.25 (S)	S	(-)	(+)	MSSA
113	(+)	24 (S)	≥4 (R)	S	(-)	(-)	MSSA
118	(+)	28 (S)	0.25 (S)	R	(+)	(+)	MRSA
121	(+)	25 (S)	≥4 (R)	R	(-)	(-)	MSSA

^aR, cefoxitina (≤ 21 mm indica resistencia)

^bR, oxacilina (CMI ≥ 4 µg/ml indica resistencia)

ChromID MRSA: Medio cromogénico para MRSA

Slidex MRSA: Detección de PBP2a

bas de este estudio se encontraron cuatro cepas (26, 64, 67, 92) que muestran inconsistencias en los resultados. Tres de ellas (cepas 64, 67, 92) presentan el gen *mecA*, pero no expresan la proteína PBP2, no crecen en el medio cromogénico y son sensibles para la prueba de

difusión en disco. Aunque genotípicamente estas cepas se comportan como MRSA, desde el punto de vista epidemiológico deben considerarse como MSSA. La cepa 26 se comporta como MSSA ya que no tiene el gen *mecA*, no expresa la PBP2a, no crece en el medio cromogénico y

muestra una concentración de 0.25 µg/ml de oxacilina, pero en la prueba de difusión en disco para cefoxitina es resistente. Probablemente, esta cepa posee un fenotipo de clase BORSA o conocidas como cepas hiperproductoras de β-lactamasa. El efecto inductor de la cefoxitina en lugar de la oxacilina favorece su reconocimiento como MRSA.¹⁴⁻¹⁶ No se encontraron áreas de inhibición en disco, lo que conduce a pensar que las poblaciones MRSA en nuestro hospital son homogéneas y por lo tanto las CMI en estas cepas podrían estar por arriba de los 800 µg/ml.¹²

En las pruebas Vitek y ChromID MRSA se encontró una sensibilidad de 97% y una especificidad de 69 y 85% respectivamente. En los presentes hallazgos existen cuatro cepas (29, 31, 113 y 121) que de manera consistente son negativas para *mecA* y PBP2a, y sensibles por Kirby-Bauer con disco de cefoxitina. La CMI encontrada en estas cepas fue ≥ 4 µg/ml. Debido a que de manera consistente estas cepas se comportan fenotípicamente como MSSA, bien podrían estar mal clasificadas por parte del equipo Vitek como MRSA. Aunque las pruebas Vitek y Chromo ID MRSA presentan la sensibilidad y especificidad más bajas de los métodos probados, los resultados se pueden obtener a partir de las 7 h de incubación con el equipo Vitek-2, lo que representa una enorme ventaja con respecto a los otros métodos. Estos resultados están en concordancia con lo reportado internacionalmente.^{14,17}

La detección de PBP2a por el método de látex mostró una sensibilidad de 98%, consistente con el reportado por otros autores que encontraron 97-100% de sensibilidad, con una especificidad de 100%.¹⁸ La prueba de aglutinación en látex Slidex MRSA es muy sencilla de realizar y proporciona excelentes resultados en sensibilidad y especificidad, sin embargo, no es de fácil incorporación en un laboratorio de diagnóstico clínico debido al costo aproximado de 75 pesos MN (US\$ 6) por prueba, lo que podría impactar en el limitado presupuesto de los laboratorios en países en desarrollo, aunque el beneficio clínico puede rebasar su costo, como se ha observado en otros estudios.

En conclusión, se comprobó la existencia de una alta prevalencia de MRSA en las muestras estudiadas en nuestro hospital (90.7%). Además, todos los métodos estudiados son muy buenos para la identificación de MRSA. El PCR para la detección del gen *mecA* requiere equipo, instalaciones adecuadas y personal capacitado para su realización, por lo que su uso solamente es viable en laboratorios de investigación. El sistema Vitek 2-XL, al igual que el kit de detección Slidex MRSA son costosos y requieren instalaciones y personal capacitado para su empleo, pero tienen la ventaja de obtener resultados en un lapso de 7 hr y 20 min., respectivamente. El sistema

Vitek 2-XL es ideal para el trabajo en hospitales de segundo y tercer nivel. Existe una versión más pequeña de este sistema llamado Vitek 2 COMPACT que podría usarse en unidades de medicina familiar. El kit Slidex MRSA se recomienda para aquellas cepas aisladas a partir de líquidos estériles como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquidos peritoneales, etc., por lo que estas pruebas son adecuadas para hospitales de segundo y tercer nivel. El ChromoID MRSA proporciona muy buenos resultados y su utilización sería ideal como prueba de "screening" en la búsqueda de portadores nasales asintomáticos de MRSA en pacientes o en el personal de los hospitales y unidades de medicina familiar. La técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer), usando un disco de cefoxitina de 30 µg, es con mucho la más accesible de todas y tiene una alta sensibilidad y especificidad. Finalmente, se recomienda el uso combinado del sistema Vitek 2-XL conjuntamente con la técnica de Kirby-Bauer, con el disco de cefoxitina de 30 µg, para aquellas cepas identificadas como MSSA por el sistema Vitek 2-XL.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Sligl W, Taylor G, Gibney RN, Rennie R, Chui L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Canadian intensive care unit: Delays in initiating effective therapy due to the low prevalence of infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007;18:139-143.
- Wu CT, Lin JJ, Hsia SH. Cutaneous pustular manifestations associated with disseminated septic embolism due to a Pantón-Valentine leukocidin-producing strain of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Dermatol* 2008; 47:942-943.
- Sayana S, Khanlou H. Meningitis due to hematogenous dissemination of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient living with AIDS. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)* 2008; 7:289-291.
- Resic H, Coric A, Dedeic-Ljubovi A, Hukic M, Advic E, Kukavica N. Prevalence of MRSA infections in patients on hemodialysis. *Med Pregl* 2007; 60 suppl 2:97-100.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *NEJM* 1998; 339:520-532.
- Deurenberg RH, Stobberingh, EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; 8:747-763.
- McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and lactamase regulators. *J Bacteriol* 2001; 183:6862-6868.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement (M100-S17). Wayne, Pa. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- Fluit AC, Wielders CL, Verhoef J. Epidemiology and susceptibility of 3051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY Study. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3727-3732.
- Borg MA, de Kraker M, Scicluna E, Van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Monen J, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and

eastern Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother 2007; 60:1310-1315.

11. Bartels MD, Boye K, Larsen AR, Skov R, Westh H. Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1533-1540.

12. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:124-129.

13. Baddour MM, AbuElkheir MM, Fatani AJ. Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Microbiol 2007; 55:473-479.

14. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microb 2002; 40:2766-2771.

15. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H.

Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:389-392.

16. Fuda C, Fisher JF, Mobashery S. β-Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. Cell Mol Life Sci 2005; 62:2617-2633.

17. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3785-3788.

18. 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; 39:4149-4151