

ANTİMİKROBİYAL DİRENCİN BELİRLENMESİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

M. Ufuk HASDEMİR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
ufukhasdemir@marmara.edu.tr

ÖZET

İlaç direnci gösteren bakterilerin sayısı tüm dünyada devamlı olarak artmakta olup bu durum infeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve kontrolünde büyük sorun yaratmaktadır. Bunun üstesinden gelmek üzere yapılan mücadelede, ilaç direncinin hızlı bir şekilde tespit edilmesi, hasta tedavisinin, infeksiyon kontrolünün ve antimikrobiyal yönetiminin doğru yönlendirilmesinde çok önemlidir. Nükleik asit teknolojilerinin başarılı bir şekilde ilaç direncinin tanısında kullanıma girmesi, bu anlamda çok umut verici gelişmelerdir. Bununla birlikte bugüne kadar pazara girmiş nükleik asit tanı testlerinin bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Özellikle karbapenemazlar, genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar, çoklu ilaç efluks sistemleri gibi birçok direnç determinantını bir arada bulundurma potansiyeli olan Gram negatif bakterilerde, nükleik asit tanı testlerinin sonuçları her zaman fenotipik direnç testi sonuçları ile uyum göstermemektedir. Nükleik asit tanı teknolojilerine ek olarak direnç geni ekspresyonunu da saptayabilen proteomik yaklaşımlı testlerin (MALDI-TOF MS, Mikroakışkan teknolojisi) geliştirilmesi, yakın gelecekte infeksiyon hastalıklarının kontrolünde daha doğru yaklaşımların yapılmasına imkan tanıyacaktır.

Anahtar sözcükler: antimikrobiyal ilaç direnci, MALDI-TOF MS, nükleik asit testleri

SUMMARY

Molecular Methods for Detection Antimicrobial Resistance

Drug resistant bacteria are continuously increasing throughout the world and have become great concern in the treatment and control of infectious diseases. Among the actions taken to struggle with this problem, rapid detection of drug resistance is considered to have significant benefits in improving patient treatment, infection control and antimicrobial stewardship. In this context, successful incorporation of tests based on nucleic acid diagnostic technologies holds much promise. However, nucleic acid diagnostic tests introduced so far to the market also have some limitations. In particular, these tests are not sufficient for detection of all resistance genes in Gram negative bacteria which potentially possess multiple drug resistant determinants such as carbapenemases, extended spectrum beta-lactamases, multi-drug efflux pumps. Moreover, the results of these rapid tests are not always consistent with the results of phenotypic resistance tests. In addition to nucleic acid diagnostic technologies, improvements in proteomic based technologies (MALDI-TOF MS, Microfluidics technology) which have potential to detect gene expression will provide us more accurate approaches to control infectious diseases in the near future.

Keywords: antimicrobial drug resistance, MALDI-TOF MS, nucleic acid tests

İnfeksiyon hastalıkları ile mücadelede günümüzde karşı karşıya olduğumuz başlıca sorun, bakterilerdeki antimikrobiyal ilaç direncinin neden olduğu tedavi başarısızlıklarıdır. Özellikle çoklu antimikrobiyal ilaç direncinin genetik transfer mekanizmaları aracılığı ile bakteriler arasında hızla yayılması, yeni direnç mutasyonlarının ortaya çıkışı, kromozomal direnç genlerinin ekspresyonunu düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, antimikrobiyal ilaç direncindeki hızlı artışın başlıca nedenleri olup

yeni antimikrobiyal keşfi ya da geliştirilmesindeki duraksama sorunu çok daha ciddi bir tehdit haline getirmektedir. Antimikrobiyal ilaç direncinin üstesinden gelmek ancak i) direncin hızlı ve doğru olarak saptanması, ii) geniş çaplı surveians ve infeksiyon kontrolü, iii) doğru antimikrobiyal yönetimi, iv) yeni antimikrobiyallerin ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi hedeflerini mutlaka içine alan kompleks stratejilerin hayata geçirilmesiyle mümkün olacaktır. Bunlar arasında antimikrobiyal direnci-

nin saptanması alanında yapılan çalışmaların, hastanın uygun antimikrobiyal en kısa zamanda alabilmesi için direnci hızlı ve doğru olarak saptayan nükleik asit tanı (NAT) testleri geliştirmeyi hedeflemesi çok normaldir. Nükleik asit tanı testleri arasında klasik hibridizasyon ve DNA dizi analizi yöntemleri, antimikrobiyal ilaç direncinin genetik determinantlarını saptamak üzere uzun zamandır bilinmekle birlikte bu yöntemlerin zaman alıcı ve zahmetli olmaları rutin laboratuvarlarda kullanımlarını engellemiştir. Bu yazıda esas olarak klinik önemi olan bakterilerde hızlı antimikrobiyal direnç tanısı yapabilmek amacıyla son yıllarda geliştirilen gerek nükleik asit, gerekse protein bazlı yöntemlerin günümüzdeki uygulamaları, direnç tanısındaki yeri ve gelecekteki yaklaşımların neler olabileceği irdelenecektir.

Rutin Uygulamada Yer Alan PCR-bazlı Nükleik Asit Testleri (NAT) ve 'Microarray'

Bugüne kadar bakterilerde antimikrobiyal ilaç direncini saptamak üzere geliştirilen NAT testleri, esas olarak nükleik asit amplifikasyon (PCR) prensibine dayalı olup bu teknolojinin farklı tiplerini baz almaktadır. Bu testlerin geliştirilmesindeki temel amaç sadece hastanın uygun tedaviyi zamanında almasını değil aynı zamanda uygun olmama riski olan ampirik antimikrobiyal reçetelemeyi azaltmayı ve dolayısıyla toplam antimikrobiyal tedavi süresini ve maliyetini azaltmayı hedeflemektedir^(8,26,31). Bu anlamda çok umut verici gözükken ve bugüne kadar pazara giren NAT testlerinin büyük çoğunluğu esas olarak Gram pozitif bakterilerde ilaç direncini saptamak üzere geliştirilmişlerdir⁽²⁵⁾. Bunun asıl nedeni Gram pozitif bakterilerde direnç genleri çeşitliliğinin daha az olması dolayısıyla teknik olarak daha sorunsuz şekilde geliştirilebilme potansiyeline sahip olmalarıdır. Günümüzde stafilkoklarda metisilin direncine yol açan *mecA* ve/veya ilişkili sekansları, enterokoklarda vankomisin direnci ile ilişkili *vanA* ve *vanB* genlerini saptayabilen çeşitli klasik ve real-time PCR testleri mevcut olup bunlardan bazıları direkt olarak klinik örnekte iki saatten daha az bir sürede MRSA varlığını saptayabilmektedir^(1,10,13,21,25,29,32,33). Bu ticari sistemlere örnek olarak BD GeneOhm MRSA assay ve VanR assay

(Becton Dickonson); GeneXpert sistemi MRSA test ve *vanA/vanB* test (Cepheid) verilebilir. Çok merkezli bir çalışma GeneXpert'in, MRSA saptamadaki duyarlılığının oldukça yüksek (% 93) olduğunu göstermektedir⁽³²⁾. Enterokoklarda da vankomisin direnç determinantları *vanA* ve *vanB*'yi saptayan ticari testler mevcut olup bu testlerin özellikle *vanB* tipi direnci saptamadaki özgüllüklerinin düşük olduğu ileri sürülmektedir^(1,10,21,29).

Çok çeşitli ilaç direnç determinantını bir arada bulundurma potansiyeli yüksek olan ve gen ekspresyonlarının düzenlenmesini kompleks regülasyon sistemlerinin kontrol ettiği Gram negatif bakterilerde ilaç direncini saptayacak PCR bazlı bir teknolojinin multipleks kapasitesinin çok yüksek olması şarttır. Şimdiye kadar geliştirilen testlerin büyük çoğunluğu *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* gibi Gram negatif bakterilerde sefalosporinaz ve karbapenemaz direncinden sorumlu başlıca enzimleri, KPC, NDM, IMP, VIM, AmpC, TEM, SHV, OXA, kodlayan genleri saptamaktadır^(2,4,7,11,19,22,25,31). Tablo 1'de, Gram negatif bakterilerde direnç genlerini saptamak üzere geliştirilmiş test sistemlerinden bazıları yer almaktadır^(24,30,31). Bunlardan Curetis Unyvero sistemi, beta-laktamazlara ilaveten florokinolon direnç mutasyonlarını ve integron göstergelerini ayrıca makrolid direnç genlerini de saptama kapasitesindedir. Komplementer oligonükleotidler kullanarak çok sayıda hedef nükleik asit dizisini aynı anda saptama potansiyelinden dolayı 'Microarray' teknolojisi, antimikrobiyal direncinin tanısında umut verici bir yöntemdir. β -laktamaz genlerini saptamak üzere geliştirilen Check-MDR CT 102 array (Check-Points Health BV) ve Check-Points ESB/L/KPC array (Check-Points Health BV) ticari 'microarray' testlerine örnek olarak verilebilir^(18,23,25). Real-time PCR'ın 'microarray' yöntemi ile combine edildiği yeni bir çalışmada, ventilatör ilişkili pnömonilerde direkt klinik örnekten β -laktamaz direnci ile ilişkili 24 direnç geninin yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptanabildiği bildirilmiştir⁽³⁾. Antimikrobiyal direncin saptanmasında nükleik asit bazlı teknolojiler çeşitli avantajlara sahip olmalarına karşın fenotipik direnç sonuçları ile her zaman uyum göstermemekte-

Tablo 1. Gram negatif bakterilerde antimikrobiyal direnç determinantlarını hedefleyen NAT sistemlerine örnekler.

Test Adı (Üretici)	Sonuç alma süresi	Teknoloji	Analitik özgüllük/duyarlılık	Tanım, uygulama ve kısıtlılıklar
Gram Negatif Kan Kültür Testi (Nanosphere)	2 s	PCR amplifikasyonunu takiben lam üzerindeki immobilize, yakalayıcı proba konjuge altın- nanopartiküllerle hibridizasyon	Veri yok	FDA onaylı, dokuz bakteri türü veya cinsi saptama, altı beta-laktamaz geni (KPC, NDM, CTX-M, VIM, IMP, OXA) saptama
Kan Kültürü Tanımlama Paneli (Biofire Diagnostics)	2 s	Nested multipleks PCR amplifikasyonu ve takiben erime eğrisi analizi ile saptama	% 88- % 100/ % 85-% 100	FDA onaylı, 24 bakteri ve mantar patojeni saptama, üç direnç geni (KPC) saptama, örnek işlem hacmi kısıtlılığı
UnyveroTM P50 Pneumonia (Curetis)	4 s	Multipleks end-point PCR ve takiben membran üzerindeki olio problemlerle hibridize ampikonun saptanması	% 72.3- % 100/ % 55-% 100	CE-IVD etiketli solunum örnekleri için tam entegre test, 17 bakteri ve mantar patojeni saptama, 22 antibiyotik direnç genini (bla _{TEM} , bla _{SHV} , bla _{CTX-M} , bla _{DHA} , bla _{EBC} , bla _{OXA-51} , bla _{KPC} , gyrA83, gyrA87, parC, int1, sul1
GeneXpert MDRO Assay (Cepheid)	<1 s	Multipleks real-time PCR	% 99- % 99.4/ % 93.4-% 100	Rektal sürüntü örneklerinde karbapenemaz üreten bakterilerle kolonize hastaları saptamak üzere tasarlanmıştır. Üç karbapenemaz (KPC, NDM, VIM) saptar.

dirler. Bunun başlıca nedeni özellikle Gram negatif bakterilerde direnç determinantlarının çeşitliliğinin fazlalığıdır. Ayrıca bu testlerin bir diğer kısıtlılığı, yeni ortaya çıkması muhtemel direnç determinantlarını kapsamamaları olup fenotipe yansıyan yeni bir direnç mekanizması varlığında bu testlerle yalancı negatif sonuç alınma riskinin olmasıdır. Öte yandan, direnç geninin eksprese olmadığı ve klinik olarak anlamlı ilaç direncinin ortaya çıkmadığı durumlarda, sadece geni saptamak üzere geliştirilmiş bir NAT testi ile alınacak pozitif sonucun in vivo etkin olabilecek bir ilacın kullanımını kısıtlama riski de vardır. NAT testlerinin analitik duyarlılık ve özgüllüklerini değerlendiren çalışmaların sayısı da oldukça azdır^(25,31).

Çoklu ilaç direnci ile günümüzde çok önemli bir halk sağlığı problem haline gelen *Mycobacterium tuberculosis*'te de rifampisin ve isoniazid direncinin hızlı tanısı tedavinin yönlendirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. NAT testleri, *M.tuberculosis*'te primer ilaç direncini saptamada da umut verici testler olup bu alanda pazara giren ticari testler genellikle 'line probe assays' (PCR bazlı), 'molecular beacon-based real time-PCR' ve pirosekanslama prensibine dayalı olarak geliştirilmişlerdir^(9,16). Klinik örnekte *M.tuberculosis* varlığını ve rifampisin direncini iki saat gibi kısa bir sürede saptayan 'Line probe assays' testlerine örnek olarak INNO-LipA®Rif.

TB (Innogenetics, Belgium), Genotype® MTBDR ve ikinci jenerasyon Genotype® MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Germany) verilebilir. Rifampisin direncine ek olarak Genotype® MTBDR, *katG* mutasyonlarını; Genotype® MTBDRplus da hem *katG* hem de *inhA* mutasyonlarını saptamaktadır. Real time-PCR bazlı testlere örnek olarak da balgam örneğinde *M.tuberculosis* ve aynı zamanda rifampisin direncini saptayan geneXpert® MTB/Rif TB (Cepheid, CA) testi verilebilir. Tüm bu hızlı NAT testlerinin, *M.tuberculosis*'te primer ilaç direncinin saptanmasında önemli avantajları var olsa da bunların duyarlılık ve özgüllüklerinin fenotipik duyarlılık testleri ile birlikte değerlendirildiği çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bununla ilgili geniş çaplı bir literatür taramasında, genotipik testlerin bazı avantajları üzerinde durulmakta ancak bu testlerin tek başlarına yeterli olamayabilecekleri vurgulanmaktadır.

Antimikrobiyal İlaç Direncinin Saptanmasında Yeni ve Geliştirilmekte Olan Teknolojiler

Antimikrobiyal ilaç direncinin hızlı ve doğru olarak saptanması için geliştirilen ve geliştirilmekte olan yeni teknolojiler de mevcuttur. Bunlar arasında dirençten sorumlu mRNA transkriptlerinin saptanmasına yönelik nükleik asid sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) teknolojisinin, direnç geni ekspresyonunu belirle-

mesi nedeniyle fenotipik direnç varlığını saptamada oldukça güvenli ve umut verici olduğu ileri sürülmektedir. Bu teknolojiyi kullanan ticari testlere örnek olarak saf kültürden blaKPC saptayan Nuclisens EasyQKPC test (BioMérieux) verilebilir⁽²⁸⁾.

Nükleik asit ve proteinlerin birlikte analizi-ne olanak sağlayan ve 'Matrix-assisted desorption ionization-time of flight mass spectrometry' (MALDI-TOF MS), RNA sekanslamayı baz alan tüm genom sekans transkriptomik teknolojisi, Mikroakışkanlar (Microfluidics) teknolojisi, ilaç direncinin saptanmasında fenotipik direnç ile korelasyonu yüksek, umut verici diğer teknolojilerdir.

MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS, molekül tanımlamasını, bakterinin içinde bulunduğu kristalize bir matrisin lazer ile ışınlanması sonrası vakumlu bir tüp içinden geçen iyonların uçuş zamanına göre yapar. Bu yöntem ilk olarak bakteri tanımlaması yapmak üzere mikrobiyolojide kullanım alanı bulmuştur. Yeni olarak bakterilerde antimikrobiyal direncini saptamak üzere de mikrobiyolojide kullanımına dair umut verici çalışmalar vardır. MALDI-TOF MS ile direnç saptama en yaygın olarak, dirençli ve duyarlı izolatlar arasındaki spektra farkı ortaya konarak yapılmaktadır^(14,25,31). *Escherichia coli*, *K.pneumonia*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*'de karbapenemaz (NDM-1, KPC-2, KPC-3, VIM-1, IMP-7, OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-162) üretimini saptamak üzere meropenem, ertapenemin indikatör antibiyotikler olarak kullanıldığı MALDI-TOF MS metodu ile yapılan yeni çalışmalar, bu yöntemin karbapenemaz saptamadaki duyarlılığının ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğunu ortaya koymaktadır^(5,15,17). Kempf ve arkadaşlarının⁽¹⁷⁾ imipenemi kullanarak MALDI-TOF MS ile yaptığı bir çalışmada, OXA-23 ve OXA-24 üreticisi *A.baumannii* izolatları dahil birçok karbapenemaz üreticisi Gram negatif bakteri doğru olarak tesbit edilmiştir. Karbapenemaz saptanmasında geliştirilmeye açık olan MALDI-TOF MS metodunun şu an rutin uygulamadaki kısıtlılıkları arasında, direkt klinik materyalden karbapenemaz üretimini saptamak üzere valide olmaması ve sonuçların yorumlanmasında gösterdiği zorluklar

sayılabilir. MALDI-TOF MS'in, MRSA ve MSSA ayırımındaki yerini belirlemek üzere de 2000'den bu yana çeşitli çalışmalar yapılmıştır. MALDI-TOF MS'in 'Protein Chip Array' ile kombine edilerek bir proteinin spesifik hedefine bağlanmasının sağlandığı 'surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight (SELDI-TOF) MS metodunun başarıyla MRSA, MSSA ayırımını yapabildiği gösterilmiştir^(14,27). Griffin ve arkadaşlarının⁽¹²⁾ *E.faecium*'da vankomisin direncini saptamak üzere yaptıkları bir çalışmada da, MALDI-TOF MS yönteminin *van-B* tipi glikpeptid direncini % 96.7 duyarlılık ve % 98.1 özgüllükle saptadığı gösterilmiştir. Tüm bu umut verici çalışmalara rağmen MALDI-TOF MS'in antibiyotik direnç tanısında mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanıma girmesi daha zaman alacak gözükmektedir.

Mikroakışkan Teknolojisi

Biyomühendislik ve nanoteknolojideki gelişmeler antibiyotik direncini saptamada kullanılan moleküler yöntemlerin minyatürleştirilmesini sağlamış olup tek bir çip üzerinde bakteri kültürü, nükleik asit hibridizasyon, amplifikasyon ve deteksiyon yapılabilmektedir. Choi ve arkadaşları⁽⁶⁾, mikroakışkan agaroz kanalları olan bir sistemde antibiyotiklerin varlığında bakteri üremesinin takip edilerek 3.5 saat gibi kısa bir sürede antimikrobiyal direncin saptanabileceğini hatta yaklaşık MİK tayini yapılabileceğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada da 16S rRNA'nın elektrokimyasal kantitasyonu yapılarak antibiyotik varlığında bakteri üremesi değerlendirilmiştir⁽²⁰⁾.

SONUÇ

Bu yazıda söz edilen yöntemlerin hepsinde bakterilerde antimikrobiyal direncin saptanma süresini kısaltmak amaçlanmaktadır. Bununla birlikte bu yöntemlerin bir çoğunun duyarlılık ve özgüllükleri net olarak ortaya konulamamış olup yine bir çoğunun klinik validasyonları tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Ayrıca yeni direnç mekanizmalarına bağlı direncin saptanmasında da bu yöntemler yetersiz kalmaktadır. Tüm bu dezavantajlarına karşın erken doğru tedavi için sahip oldukları potansiyel ve dolayısıyla sağlık ilişkili harcamaları

azaltma avantajları dikkate alındığında antimikrobiyal direncin saptanmasında yeni yöntemlerin geliştirilmesine devam edilmesi şarttır.

KAYNAKLAR

- Birgand G, Ruimy R, Schwarzing M et al. Rapid detection of glycopeptide-resistant enterococci: impact of decision-making and costs, *Antimicrob Res Infect Control* 2013;2(1):30-4.
<http://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-2-30>
- Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray sysem, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74(4):349-55.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.013>
- Bogaerts P, Hamels S, de Mendonca R et al. Analytical validation of a novel high multiplexing real-time PCR array for the identification of key pathogens causative of bacterial ventilator-associated pneumonia and their associated resistance genes, *J Antimicrob Chemother* 2012;68(2):340-7.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks392>
- Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired ampC in Enterobacteriaceae, *J Microbiol Methods* 2010;82(2):229-33.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.06.006>
- Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance in 1 to 2.5 hours, *J Clin Microbiol* 2011;49(9): 3321-4.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00287-11>
- Choi J, Jung YG, Kim J et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system, *Lab Chip* 2013;13(2):280-7.
<http://dx.doi.org/10.1039/c2lc41055a>
- Cunningham SA, Noorie T, Meunier D, Woodford N, Patel R. Rapid and simultaneous detection of genes encoding Klebsiella pneumonia carbapenemase (blaKPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (blaNDM) in Gram-negative bacilli, *J Clin Microbiol* 2013;5(4):1269-71.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03062-12>
- Enne VI. Reducing antimicrobial resistance in the community by restricting prescribing: can it be done? *J Antimicrobi Chemother* 2010;65(2):179-82.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp443>
- Folkvardsen DB, Svensson E, Thomsen VQ et al. Can molecular methods detect 1 % isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis? *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1596-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00472-13>
- Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert vanA/vanB molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(3):273-6.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1306-y>
- Geyer CN, Reisbig MD, Hanson ND. Development of a TaqMan multiplex PCR assay for detection of plasmid-mediated ampC β -lactamase genes, *J Clin Microbiol* 2012;50(11):3722-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02038-12>
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak, *J Clin Microbiol* 2012;50(9):2918-31.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01000-12>
- Grobner S, Dion M, Plante M, Kempf VA. Evaluation of the BD GeneOhm StaphSR assay for detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus isolates from spiked positive blood culture bottles, *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1689-94.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02179-08>
- Hrabák J, Chudáková E, Walková 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(1):103-14.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-12>
- Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudáková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *J Clin Microbiol* 2011;49(9):3222-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00984-11>
- Kalokhe AS, Shafiq M, Lee JC et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing, *Am J Med Sci* 2013;345(2):143-8.
<http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31825d32c6>
- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C. Rapid detection of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *PLoS*

- One 2012;7(2):e31676.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031676>
18. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M et al. Integrated detection of extended-spectrum- β -lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes, *J Clin Microbiol* 2010;48(2):460-71.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00765-09>
 19. Lerner A, Romano J, Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y. Rectal swabs are suitable for quantifying the carriage load of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(3):1474-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01275-12>
 20. Mach KE, Mohan R, Baron EJ. A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples, *J Urol* 2011;185(1):148-53.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2010.09.022>
 21. Mak A, Miller MA, Chang G, Monczak Y. Comparison of PCR and culture for screening of vancomycin-resistant enterococci: highly disparate results for vanA and vanB, *J Clin Microbiol* 2009;47(12):4136-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01547-09>
 22. 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(4):906-9.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr563>
 23. 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(8):3086-92.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01298-09>
 24. Nanosphere. Gram-negative Blood Culture. <http://www.nanosphere.us/product/gram-negative-blood-culture> (20 January 2014, date last accessed).
 25. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Pe-a R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing, *J Antimicrob Chemother* 2013;68(12):2710-7.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt253>
 26. Ridge KW, Hand K, Sharland M et al. Antimicrobial resistance, "Annual report of the Chief Medical Officer Volume Two 2011" s.73-86, Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance, London: Department of Health (2013).
 27. Shah HN, Rajakaruna L, Ball G et al. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis, *Syst Appl Microbiol* 2011;34(1):81-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.002>
 28. Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T et al. Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (blaKPC), *J Clin Microbiol* 2012;50(8):2783-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00284-12>
 29. Stamper PD, Cai M, Lerna C, Eskey L, Carroll KC. Comparison of the BD GeneOhm VanR assay to culture for identification of vancomycin-resistant enterococci in rectal and stool specimens, *J Clin Microbiol* 2007;45(10):3360-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01458-07>
 30. Tenover FC, Canton R, Kop J. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO Assay, *J Clin Microbiol* 2013;51(11):3780-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01092-13>
 31. Tuite N, Reddington K, Barry T, Zumla A, Enne V. Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother* 2014.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku083>
 32. Wolk DM, Picton E, Johnson D et al. Multicenter evaluation of the Cepheid Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares, *J Clin Microbiol* 2009;47(3):758-64.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01714-08>
 33. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Loite T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5026-33.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.10.5026-5033.2005>