

Выявление венгерского пандемического клона MRSA в России

О.Е. Хохлова^{1,2}, Вей-Чун Хунг⁴, В. Хигучи⁴, Т. Такано⁴,
О.В. Перьянова^{1,2}, А.Б. Салмина³, Т. Ямамото^{2,4}

¹ Кафедра микробиологии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого (КрасГМУ), Красноярск, Россия

² Российско-Японский центр микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней, Красноярск, Россия

³ Отдел международных отношений КрасГМУ, Красноярск, Россия

⁴ Отделение бактериологии, кафедра контроля инфекционных болезней и международной медицины Медицинского Университета, Ниигата, Япония

Начиная с 1961 г., пандемические клоны метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* распространились во всем мире, вызывая тяжелые нозокомиальные инфекции. Венгерский клон с генотипом ST 239 и стафилококковой хромосомной кассетой *mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec-SCCmec*) III типа принадлежит к таким распространенным во всем мире клонам и является преобладающим в России. В данном исследовании предложен метод быстрого скрининга венгерского клона при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции (М-ПЦР). Результаты ПЦР показали, что среди десяти основных пандемических клонов MRSA только венгерский клон имеет уникальную комбинацию генов *стафилококковых энтеротоксинов* (SE) – *sea*, *sek* и *seq* (что может ассоциироваться с высокой степенью тяжести инфекции и

иммунодепрессии) и гена адгезии – *cap* (коллаген – адгезин). Основываясь на изучении генов вирулентности, созданы праймеры для М-ПЦР, необходимые для обнаружения генов *sea*, *seq* и *cap*. В М-ПЦР также использовали праймеры для обнаружения *mecA* гена с целью дифференциации MRSA от MSSA и специфического для *S. aureus* термостабильного гена нуклеазы – *nuc* для дифференциации MRSA и MSSA от коагулазонегативных стафилококков (CNS). В результате М-ПЦР позволила быстро и точно дифференцировать венгерский клон MRSA из России.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, венгерский клон MRSA, гены вирулентности, мультиплексная полимеразная цепная реакция (М-ПЦР).

Контактный адрес:

Ольга Евгеньевна Хохлова

660022 г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1.

Кафедра микробиологии КрасГМУ

Тел.: (391) 2201361

Эл. почта: khokhlovaol@mail.ru

Detection of Hungarian Pandemic MRSA Clone in Russia

O.E. Khokhlova^{1,2}, Wei-Chun Hung³, W. Higuchi³, T. Takano³, O.V. Peryanova^{1,2}, A.B. Salmina¹, T. Yamamoto^{2,3}

¹ Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

² Russia-Japan Center of Microbiology, Epidemiology and Infectious Diseases, Krasnoyarsk, Russia

³ Division of Bacteriology, Department of Infectious Disease Control and International Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

Since 1961, pandemic methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clones causing severe nosocomial infections have been distributed worldwide. The Hungarian clone having ST239 genotype and Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type III is one of the common epidemic clones and prevalent in Russia. The rapid screening assay for Hungarian ST239-III clone using multiplex polymerase chain reaction (PCR) was proposed in this study. The PCR assay showed that the only Hungarian clone (of 10 common pandemic MRSA clones) carries a unique set of genes encoding staphylococcal enterotoxins (SE) – *sea*, *sek* and *seq* (it may result in severe infec-

tion and immunosuppression) and *can* (collagen-adhesin) gene. Specific primers and probes for three virulence genes (*sea*, *seq*, *can*) were designed for multiplex PCR. Primers for *mecA* gene (to distinguish between MRSA and MSSA) and *S. aureus*-specific nuclease gene *nuc* (to distinguish between MRSA/MSSA and coagulase-negative staphylococci) were also used. This multiplex PCR assay rapidly and accurately detected Hungarian clone from Russia.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, Hungarian clone, virulence genes, multiplex PCR.

Метициллинорезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) были выделены в 1960-х годах и стали одними из основных возбудителей нозокомиальных инфекций [1]. Ограниченное число подобных клонов MRSA распространились во всем мире как пандемические клоны [2, 3], включая Венгерский тип ST 239 и SCCmec тип III, который является основным MRSA клоном в России, так же как и в некоторых других европейских и азиатских странах [4].

Для точного определения генотипа MRSA клонов необходимо проводить генотипирование (например, ST-типирование), что требует много времени и является дорогостоящим. В данной работе предложено использовать мультиплексную ПЦР (М-ПЦР) для выявления пяти генов, с целью быстрого скрининга венгерского пандемического клона MRSA.

Материал и методы исследования

В работе использовали девять пандемических MRSA клонов, включая нью-йоркский/японский клон (ST5/SCCmecII), педиатрический клон (ST5/SCCmecIV или IVa), EMRSA-15 (ST22/SCCmecIV), EMRSA-16 (ST36/SCCmecII), берлинский клон (ST45/SCCmecIVa), венгерский клон (ST239/SCCmecIII), бразильский клон (ST239/SCCmecIIIA), иберийский клон (ST247/SCCmecIA) и архаический клон (ST250/SCCmecI). Они были любезно предоставлены Н. de Lencastre (Университет Рокфеллера, США). Клинические

штаммы MRSA из России являются частью лабораторной коллекции Университета г. Ниигата (Япония). Также использовался MSSA штамм ATCC 29213. Устойчивые к метициллину штаммы *S. epidermidis* (MRSE) KE1 и *S. epidermidis* ATCC 14990 были использованы как коагулазонегативные (CNS).

Для культивирования бактерий использовали бульон LB (Difco, Детройт, MI). Посевы инкубировали при температуре 37 °C до фазы логарифмического роста. В качестве плотной питательной среды использовали питательный агар (Eiken Chemical, Токио).

ПЦР исследование 18 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE) – *tst* (токсин синдрома токсического шока 1), *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*, 2 генов адгезии *cna* (коллагеновый адгезин) и *bbp* гена (адгезин костного сиалопротеина) было проведено с использованием праймеров, представленных в табл. 1 [5, 6]. В данном ПЦР исследовании гены адгезии *cna* и *bbp* были выбраны, потому что только некоторые клоны MRSA несут в себе эти гены [5].

Праймеры, используемые в М-ПЦР, представлены в табл. 1. Праймеры для выявления генов энтеротоксинов *sea* и *seq* были разработаны на основе изучения последовательностей генома MW2 (банк генов, № NC-003923) и USA300 (банк генов, № NC-007793) соответственно. Праймеры для выявления генов *cna*, *bbp* и *mecA* были разработаны на основе

Таблица 1. Праймеры, использованные для проведения ПЦР и М-ПЦР

Изучаемые гены	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Размер продукта ПЦР, пн
1	2	3	4
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)			
Стафилококковые энтеротоксины			
<i>tst</i>	TST-3	5'-AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445
	TST-6	5'-ATCGAACTTTGGCCCATACTTT	
<i>sea</i>	SEA-3	5'-CCT TTGGAAACGGTTAAAAACG	127
	SEA-4	5'-TCTGAACTTCCCATCAAAAAC	
<i>seb</i>	SEB-1	5'-TCGCATCAAACGACAAACG	477
	SEB-4	5'-GCAGGTA CTCTATAAGTGCCTGC	
<i>sec</i>	SEC-3	5'-CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271
	SEC-4	5'-TCAAAATCGGATTAACATTATCC	
<i>sed</i>	SED-3	5'-CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	319
	SED-4	5'-TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	
<i>see</i>	SEE-3	5'-CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAAACAAGC	178
	SEE-2	5'-TAACTTACCGTGGACCCTTC	
<i>seg</i>	SEG-1	5'-AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642
	SEG-2	5'-AACTTATATGGAACAAAAGGTA CTAGTTC	
<i>seh</i>	SEH-1	5'-CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	376
	SEH-2	5'-CATCTACCCAAACATTAGCACC	
<i>sei</i>	SEI-1	5'-CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	576
	SEI-2	5'-AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	
<i>sej</i>	ZDR	5'-GAGCTCTCAATAAATTTGAGCACC	1731
	ZID	5'-TCTAGAATAGTAGGTTCTGCTCTT	
<i>sek</i>	sek-F	5'-GGTGTCTCTAATAGTGCCAG	284
	sek-R	5'-TCGTTAGTAGCTGTGACTCC	
<i>sel</i>	sel-F	5'-ATCAATGGCAAGCATCAAACAG	264
	sel-R	5'-TGGAAGACCGTATCCTGTG	
<i>sem</i>	mpSEM-1	5'-CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	300
	mpSEM-2	5'-TTCAGTTTCGACAGTTTGTGTGCAT	
<i>sen</i>	mpSEN-1	5'-ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT	680
	mpSEN-2	5'-AACTCTGCTCCCACTGAAC	
<i>seo</i>	mpSEO-1	5'-AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGGTAGAG	180
	mpSEO-2	5'-ATCTTTAAATTCAGCAGATATCCATCTAAC	
<i>sep</i>	sep-F	5'-CTGAATTGCAGGAACTGCT	187
	sep-R	5'-CAAGTTTTCTGTGGCGGTTA	
<i>seq</i>	seq-F	5'-TCTAGCATATGCTGATGTAGG	383
	seq-R	5'-CAATCTCTTGAGCAGTTAC(C/T)TC	
<i>seu</i>	PSE2	5'-TAAAATAAATGGCTCTAAAATTGATGG	790
	PSE4	5'-CGTCTAATTGCCACGTTATATCAGT	

Продолжение табл. 1 на с.

1	2	3	4
Адгезины			
<i>cna</i>	<i>cnaF</i>	5'-GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423
	<i>cnaF</i>	5'-AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	
<i>bbp</i>	<i>bbpF</i>	5'-AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575
	<i>bbpR</i>	5'-ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	
Мультиплексная ПЦР			
<i>cna</i>	<i>cna-QF1</i>	5'-GGGAATAAATCAACGAATGTTACGG	461
	<i>cna-QR1</i>	5'-ACTTCTTCCTTACCATGCTCTTG	
<i>sea</i>	<i>sea-F1</i>	5'-CTTGTAATGGTAGCGAGAA	373
	<i>sea-R1</i>	5'-CGGTCAATCGATTATTATCATG	
<i>nuc</i>	<i>nuc1</i>	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT	279
	<i>nuc2</i>	5'-AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC	
<i>seq</i>	<i>seq-F2</i>	5'-CGCTTCAAGGAGTTAGTTCT	210
	<i>seq-R2</i>	5'-CTAAATTTTGATTCGCCAAC	
<i>mecA</i>	<i>mecA-QF2</i>	5'-GGGATCATAGCGTCATTATTCC	141
	<i>mecA-QR2</i>	5'-CGATGCCTATCTCATATGC	

изучения последовательностей генома ST30, SA-MRSA штамма NN1 (банк генов, №№ AB266874, AB246401 и AB245470 соответственно). Праймеры для выявления гена *nuc* были необходимы для дифференциации MRSA и MSSA от CNS, как было описано ранее [7].

Режим амплификации для всех праймеров включал начальный цикл при 94 °C в течение 3 мин. Следующие этапы амплификации включали: денатурацию ДНК при 94 °C в течение 90 с, отжиг при 55 °C – 60 с, синтез – в течение 60 с при 72 °C (30 циклов) и завершающий цикл в течение 10 мин при 72 °C. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с использованием этидия бромид. В качестве контроля молекулярной массы использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich Japan, Токио).

Мультилокусное секвенирование (MLST) было использовано для выявления принадлежности штаммов к определенной клональной группе на основании сравнения частичных нуклеотидных последовательностей 7 стафилококковых генов [8]. Аллельные профили исследованных штаммов сопоставляли с таковыми из международной базы данных (<http://www.mlst.net/>). Полученные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST для определения принадлежности ST к определенному клональному комплексу (CC). Типы SCCmec (I-VIII) были определены с помощью ПЦР с использованием референтных штаммов [9, 10].

Результаты исследования и их обсуждение

У референтных штаммов девяти пандемических клонов MRSA были изучены 18 генов энтеротоксинов и два гена адгезии (*cna* и *bbp*) с помощью ПЦР (табл. 2). У венгерского клона выявлена уникальная комбинация четырех генов – *sea*, *sek*, *seq* и *cna*. Гены *sek* и *seq* были определены у архаичного и венгерского клонов. В то же время венгерские и бразильские клоны, принадлежащие к ST239, имеют различные наборы генов вирулентности. Бразильский клон имеет только ген *cna*.

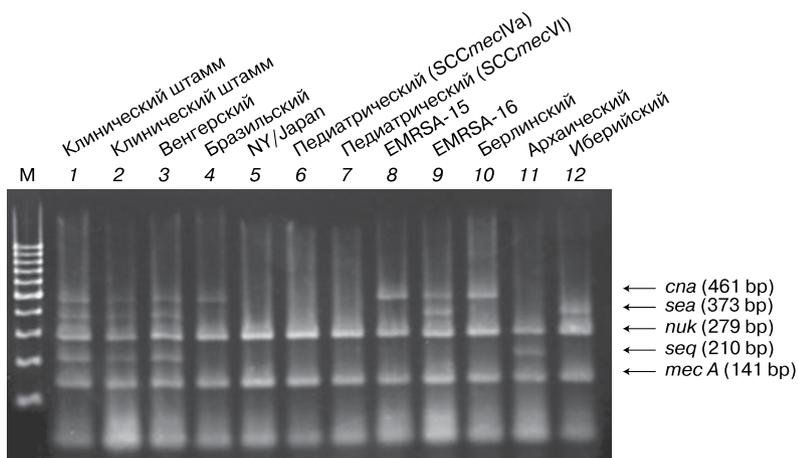
Для специфической детекции венгерского MRSA клона с помощью М-ПЦР выявляли три гена – *sea*, *seq* и *cna*, что было связано с особенностями набора генов вирулентности. Определение гена *mecA* включено в исследование для дифференциации MRSA от MSSA и гена *nuc* для дифференциации MRSA (или MSSA) от коагулазонегативных стафилококков. Таким образом, если в М-ПЦР выявляли пять вышеуказанных генов, то результаты оценивали как положительные, и исследуемый штамм относили к венгерскому клону MRSA; если выявляли 4 и менее генов, то результаты оценивали как отрицательные.

Результаты М-ПЦР, используемой для определения пяти генов, характерных для венгерского клона, приведены на рисунке (А, линия 3); размеры продуктов ПЦР составили: 461 bp для *cna*, 373 bp для *sea*, 279 bp для *nuc*, 210 bp для *seq* и 141 bp – для *mecA*. У других восьми пандемических клонов MRSA выявили четыре и меньше полос (см. рисунок А, линии 4–12). Штамм MSSA ATCC 29213 дал

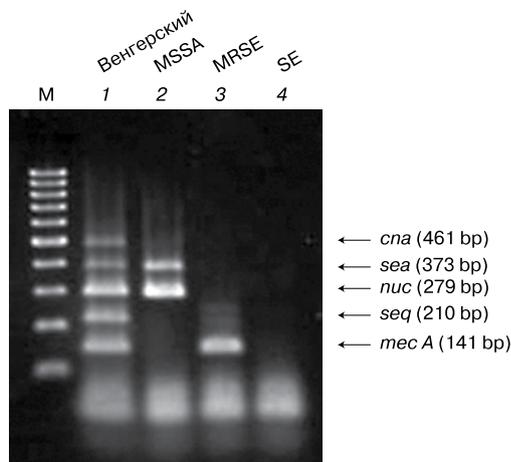
Таблица 2. Характеристика пандемических клонов (штаммов) MRSA

Тип гена	Архаиче- ский	Иберий- ский	Венгер- ский	Бразиль- ский	Нью-йоркский/ японский	Педиатри- ческий	Педиатри- ческий	Эпидемиче- ский штамм MRSAa-15	Эпидемиче- ский штамм MRSA -16	Берлин- ский
	(COL)	(HPV107)	(ANS46)	(HU25)	(BK2464)	(BM18)	(HDE288)	(HAR22)	(HAR24)	(HAR38)
Типы:										
CC	8	8	8	8	5	5	5	22	30	45
ST	250	247	239	239	5	5	5	22	36	45
SCCmec	I	IA	III	IIIА	II	IVa	VI	IV	II	IVa
Стафилококковые энтеротоксины:										
<i>tst</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>sea</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>seb</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sec</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>sed</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>see</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>seg</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>seh</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sei</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>sej</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sek</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>sel</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>sem</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>sen</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>seo</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>sep</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>seq</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>seu</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Адгезины:										
<i>сна</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>bbp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Примечание: «+» – наличие гена, «-» – его отсутствие.



А



Б

Результаты использования М-ПЦР для выявления пяти генов, характерных для венгерского пандемического клона MRSA.

только две полосы (*sea* и *nuc*), штамм MRSE KE1 – только одну полосу (*mecA*) и у штамма SE ATCC 14990 не обнаружено ни одной из полос (см. рисунок Б, линии 2–4).

По результатам М-ПЦР два штамма из России были отнесены к венгерскому клону (см. рисунок А, линии 1 и 2). Для более точной идентификации было проведено генотипирование этих двух штаммов: оба штамма принадлежали к группе ST239 (CCS) и типу SCCmecIII, что также свидетельствует об их принадлежности к венгерскому клону.

S. aureus, включая MRSA, остается одним из важнейших возбудителей инфекций кожи и мягких тканей (буллезный импетиго, абсцессы, фурункулез, раневые инфекции, «синдром ошпаренной кожи»); инфекций мочевыводящих путей; инвазивных инфекций (бактериемия, сепсис, остеомиелит, острый эндокардит, постстернотомический медиастинит, пневмония); токсинобусловленные заболевания, такие как синдром токсического

шока (TSS) или экзантемическая болезнь новорожденных (NTED), пищевые токсикоинфекции [11, 12]. Традиционные факторы риска развития инфекций, вызванных MRSA, включают инвазивные медицинские манипуляции, иммунодефицитные состояния [13], пожилой возраст (65 и более лет), наличие в анамнезе MRSA-инфекций и бактерионосительство MRSA [14]. MRSA – причина генерализованных инфекций в лечебных учреждениях.

Инвазивные MRSA-инфекции являются жизнеугрожающими и во многих странах рассматриваются как серьезная проблема. Например, в США в 2005 г. насчитывалось 94360 таких больных, из них 18 650 летальных исходов [15].

В современных условиях нозокомиальные инфекции, вызванные MRSA, ассоциированы с несколькими пандемическими клонами, включая нью-йоркский/японский, педиатрический, бразильский, венгерский, иберийский, EMRSA-15, EMRSA-16. Архаический клон считается родоначальником MRSA. Из перечисленных клонов бразильский (ST239: SCCmecIII/IIIA) распространен преимущественно в Южной Америке (Аргентина, Уругвай, Чили), в Европе (Португалия, Германия, Чехия) и в странах Азии. Венгерский клон (ST239: SCCmecIII) распространен в таких странах, как Тайвань, Китай, Индия, Польша и Норвегия [1, 4, 16]. Венгерский клон был выявлен в Венгрии в 1993 г. Данный клон был доминирующим в 1994–1998 гг., однако практически исчез в 2003–2004 гг. и в настоящее время вытеснен южным германским (ST228: SCCmecI) и нью-йоркским/японским (ST5: SCCmecII) клонами [4].

Для больных с MRSA-инфекциями быстрое определение данной инфекции и адекватный выбор терапии являются очень важными [13]. В данной работе предложено использовать М-ПЦР для быстрой детекции венгерского клона MRSA, который является доминирующим в России (неопубликованные данные). Для этого изучены гены вирулентности разных клонов MRSA и установлено, что комбинации четырех генов (*sea*, *sek*, *seq*, *cna*) или даже трех генов (*sea*, *seq*, *cna*) были специфическими для венгерского клона.

MRSA, продуцирующие энтеротоксин, кодируемый геном *sea* (в комбинации с *sec*-геном), вызывают синдром токсического шока [17], пищевые токсикоинфекции и антибиотикассоциированную диарею (в комбинации с LukE-D-генами) [18]. Кроме того, они вызывают такие тяжелые инфекции, как септический шок или инвазивные инфекции [19]. Два других гена энтеротоксина (*sek* и *seq*) входят в состав островков патогенности SaPI3 [20] и SaPI5, характерных для ST8 MRSA-клона (USA300) [21], а также в геном бактериофага ϕ Sa3mw [MW2] клона MRSA ST1 (USA400) [22]. Результатом действия энтеротоксинов, закодированных в данных двух генах, является иммуносупрессия хозяина, которая способствует колонизации и передаче инфекции, что, в свою очередь, играет роль в эволюции MRSA [23]. Заслуживает внимания тот факт, что у бразильского клона (ST239:SCCmecIII/IIIА), который считается родственным венгерскому клону (ST239:SCCmecIII), отсутствовали гены энтеротоксинов (*sea*, *sek* и *seq*). Это можно объяснить географическими различиями в распространении венгерского клона (который распространен в Южной Америке и Европе, в частности в Португалии, Германии и Чехии) и бразильского клона (который распространен на Тайване, в Китае, Индии, России и Европе, в частности в Польше и Норвегии) [1, 4]. В Японии сейчас в основном распространен нью-йоркский/японский клон, а венгерский клон не выявлен [24].

Коллагенадгезин, кодируемый геном *can*, характерен для *S. aureus* или MRSA, вызывающих повреждение коллагена в пораженных тканях, что способствует развитию пневмонии [25], а также таких инфекций, как остеомиелит [26] и артрит [27].

Основываясь на полученных данных, для детекции венгерского клона MRSA предложено использование М-ПЦР, основанной на выявлении трех генов вирулентности (*sea*, *seq* и *cna*) и двух дополнительных генов *mecA* (для идентификации MRSA) и *nuc* (для дифференциации *S. aureus* от коагулазонегативных стафилококков). Разработанный М-ПЦР позволяет быстро и точно проводить определение венгерского клона MRSA, распространенного в России.

Генотипирование, в частности ST-типирование – это золотой стандарт, позволяющий идентифицировать клоны MRSA. Недостатком его является сложность выполнения во многих клинических лабораториях. М-ПЦР можно проводить с использованием имеющегося в лабораториях оборудования, причем этот метод менее трудоемкий, чем генотипирование.

Выражения признательности

Мы благодарим H. de Lencastre за предоставленные штаммы пандемического MRSA и Lee-Jene Teng – за поддержку в проведении исследования MRSA.

Литература

- Gordon R.J., Lowy F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin. Infect. Dis. 2008; 46(Suppl 5):350-9.
- Noto M.J., Kreiswirth B.N., Monk A.B., Archer G.L. Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2008; 190:1276-83.
- Aires de Sousa M., Conceição T., Simas C. and Lencastre H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. J Clin Microbiol 2005; 43:5150-7.
- Conceicao T., Aires-de-Sousa M., Füzi M., et al. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. Clin Microbiol Infect 2007; 13:971-9.
- Otsuka T., Saito K., Dohmae S., et al. Key adhesin gene in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 2006; 346:1234-44.
- Takano T., Higuchi W., Otsuka T., et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:837-45.
- Zhang K., Sparling J., Chow B.L., et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42:4947-55.
- Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38:1008-15.
- Oliveira D.C., de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:2155-61.
- Higuchi W., Takano T., Teng L.J., Yamamoto T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. Biochem Biophys Res Commun 2008; 377:752-6.
- Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520-32.

12. Takahashi N., Nishida H., Kato H., Imanishi K., Sakata Y., Uchiyama T. Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period. *Lancet* 1998; 351:1614-9.
13. Centers for Disease Control and Prevention. MRSA in Healthcare settings. updated October 3, 2007 (http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_MRSA_spotlight_2006.html)
14. Tacconelli E., Cataldo M.A. Antimicrobial therapy of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8:2505-18.
15. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 2007; 298:1763-71.
16. Robinson D.A., Enright M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3926-34.
17. Czachor J., Herchline T. Bacteremic nonmenstrual staphylococcal toxic shock syndrome associated with enterotoxins A and C. *Clin Infect Dis* 2001; 32:E53-E56.
18. Gravet A., Rondeau M., Harf-Monteil C., et al. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4012-9.
19. Ferry T., Thomas D., Genestier A.L., et al. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. *Clin Infect Dis* 2005; 41:771-7.
20. Yarwood J.M., McCormick J.K., Paustian M.L., et al. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem* 2002; 277:138-47.
21. Diep B.A., Gill S.R., Chang R.F., et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2006; 367:731-9.
22. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002; 359:1819-27.
23. Diep B.A., Carleton H.A., Chang R.F., Sensabaugh G.F., Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2006; 193:1495-503.
24. Takizawa Y., Taneike I., Nakagawa S., et al. Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3356-63.
25. de Bentzmann S., Tristan A., Etienne J., et al. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis* 2004; 190:1506-15.
26. Elasri M.O., Thomas J.R., Skinner R.A., et al. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* 2002; 30:275-80.
27. Patti J.M., Bremell T., Krajewska-Pietrasik D., et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun* 1994; 62:152-61.