

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ'NDEKİ DOMİNANT METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞUNUN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TİPLENDİRİLMESİ*

M. Cem ERGON, Meral BİÇMEN, Zeynep GÜLAY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Hastanesi'nde hakim olan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) klon/klonlarının dünyada iyi bilinen klonların bazıları ile ilişkisinin DNA Sma I makrorestriksiyon analizi (PFGE), ribozomal-spacer (RS) PZR, SCCmec tipi belirlenmesi, multiloküs sekans tiplendirme (MLST) ve spa tiplendirme yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 2002-2003 yıllarında DEÜ hastanesinde yatan farklı hastalardan gönderilen kan kültürlerinden izole edilen ve *S.aureus* izolatları arasında en sık görülen antibiyogram profilini taşıyan dokuz MRSA suşu alınmıştır. PFGE ile bu MRSA izolatlarının aynı veya çok benzer klonal özellikler taşıdığı gözlemlenmiştir. SCCmec analizi ve MLST ile de bu klonun, ülkemizde daha önce de bildirilmiş olan ST239-MRSA-III klonunun (Brezilya klonu) bir üyesi olduğu saptanmıştır. SCCmec tipi Tip III olmakla beraber kontrollerden farklı bir patern taşımaktaydı (Tip III varyantı). İzolatların spa paterni WGKAQQ (t030) olarak saptanmıştır. Çalışmada ayrıca pvl geni de araştırılmış ve bu gen MRSA izolatlarının hiçbirinde bulunmamıştır.

Anahtar sözcükler: klonal ilişki, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, multiloküs sekans tiplendirme, pvl geni, SCCmec, spa tiplendirme

SUMMARY

Molecular Typing of the Dominant Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strain at Dokuz Eylül University Hospital

In our study, the relation of the dominant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone/clones in Dokuz Eylül University (DEU) Hospital with some of the well known clones of the world was investigated by DNA Sma I macro restriction analysis (PFGE), ribosomal-spacer (RS) PCR, SCCmec typing, multilocus sequence typing (MLST) and spa typing. Nine MRSA isolates which had the most leading antibiogram profile of *S.aureus* isolates and which were isolated from blood cultures of different patients who hospitalized in DEU between 2002-2003 years. These MRSA isolates exhibited the same or very similar clonal properties, by PFGE. The dominant clone was thought to be the member of ST239-MRSA-III clone (Brazilian clone) by SCCmec analysis and MLST, which was also reported from Turkey, previously. Although SCCmec type was Type III, it had different pattern from the controls (Type III variant). spa pattern of the isolates were detected as WGKAQQ (t030). The existence of pvl gene was also investigated and found negative for all MRSA isolates.

Keywords: clonal relation, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multilocus sequence typing, pvl gene, SCCmec, spa typing

GİRİŞ

Antibiyotiklerin çoğuna dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının ortaya çıkışı ve tüm

dünyada hızlı yayılışı stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir sorun oluşturmuştur⁽¹²⁾. Tedavide problem yaratan direnç özellikleri içerisinde kuşkusuz en önemlisi metisilin

İletişim adresi: Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR
Tel.: (0232) 412 45 03, GSM: (0505) 678 30 84
e-posta: zeynepgulay62gmail.com

Alındığı tarih: 26.03.2010, revizyon kabulü: 31.03.2010

*32.Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur. Sözlü Sunum: S30 (12-16 Eylül 2006, Antalya)

direncidir. Son 10 yıl içinde, metisilin direncinin, metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarının “Staphylococcal Cassette Chromosome” *mec* (*SCCmec*) adlı genetik elemanı edinmeleri ile geliştiği ortaya çıkarılmıştır. Gerçekte *SCC*’ler, stafilokok türleri arasında bir genetik aktarım aracı olan genomik bir adadır. *SCCmec* ise, metisilin direnci taşıyan özel bir *SCC* tipidir⁽¹⁵⁾.

Günümüze kadar sekiz farklı *SCCmec* tipi tanımlanmıştır⁽¹³⁾. *SCCmec*, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve düzenleyici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşur. *ccr*, *SCCmec* hareketinden sorumlu rekombinazları kodlar⁽¹⁵⁾. Bunların yanı sıra, *SCCmec* J (“junkyard”) bölgesini içerir⁽¹⁶⁾. Yine günümüze kadar, sınıf A’dan sınıf E’ye kadar beş farklı *mec* gen kompleksi tanımlanmıştır^(16,19). *ccr* gen kompleksi, *ccrA*, *ccrB* ve *ccrC* olarak adlandırılan üç farklı rekombinaza sahiptir ve rekombinazlar ayrıca farklı allel tipleri (*ccrA1-A4* ve *ccrB1-B4*) içermektedir^(7,15). *SCCmec*, bu allotiplerin farklı kombinasyonları ve *mec* gen sınıflarına göre adlandırılır. Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV, Tip V, Tip VI, Tip VII ve Tip VIII *SCCmec*, sırasıyla sınıf B *mec* ve tip 1 *ccr*, sınıf A *mec* ve tip 2 *ccr*, sınıf A *mec* ve tip 3 *ccr*, sınıf B *mec* ve tip 2 *ccr*, sınıf C2 *mec* ve tip 5 *ccr*, sınıf B *mec* ve tip 4 *ccr*, sınıf C1 *mec* ve tip 5 *ccr*, sınıf A *mec* ve tip 4 *ccr* gen komplekslerinden oluşmaktadır⁽¹³⁾. Tip I, II ve III *SCCmec* daha çok hastane infeksiyonlarından elde edilen MRSA izolatlarında bulunurken, Tip IV ve V toplumdaki elde edilenlerde bulunmaktadır⁽⁷⁾.

Multiloküs sekans tiplendirme (MLST) ve *spa* tiplendirme yöntemleri *S.aureus* izolatlarının evrimsel ilişkisini araştırmada özgün, hızlı ve tekrarlanabilir yeni tekniklerdir^(11,22,27).

MRSA, Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Hastanesi’nde de önde gelen hastane infeksiyonu etkenlerindedir. DEÜ hastanesinde 2003-2009 yılında yatan hastaların kültürlerinde üreyen *S.aureus* izolatlarının yaklaşık % 50’si metisiline dirençlidir. Daha önceki bir çalışmamızda hastanemizdeki elde edilen MRSA izolatlarının AP-PCR ile tek bir klona ait olduğu belirlenmiştir (Tuba Atay, Zeynep Gülay tez çalışması).

Bu çalışmada, 2003-2004 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde hakim olan metisilin dirençli MRSA klon/klon-

larının dünyada iyi bilinen klonların bazıları ile ilişkisinin DNA *Sma* I makrorestriksiyon analizi, ribozomal-spacer (RS) PZR, multipleks PCR ile *SCCmec* tipi belirlenmesi, multiloküs sekans tiplendirme ve *spa* tiplendirme yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda, bir sitotoksin olan Panton Valentine lökositini (PVL) kodlayan *pvl* geni varlığı da araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 2003-2004 yıllarında DEÜ hastanesinde yatan farklı hastalardan gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *S.aureus* izolatları arasında en sık görülen antibiyogram profilini taşıyan, dokuz MRSA (veya heteroMRSA) suşu seçilmiştir. İzolatların tümü vankomisin, trimetoprim-sülfametoksazol duyarlı ve oksasilin, eritromisin, gentamisin ve siprofloksasin dirençliydi. İzolatların tür tanımlaması ve oksasilin/metisilin direnci *mecA/nuc* multipleks PZR ile doğrulanmıştır^(4,5).

Tüm PZR yöntemleri için DNA ekstraksiyonu Kobayashi ve ark.⁽¹⁷⁾’nin önerdiği yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre, önce bir stafilokok kolonisi TNE tamponu içerisinde (10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) çözülmüştür. Beş dakika 10000 devirde santrifüjasyondan sonra üst kısım atılmış ve pellet 10 µl akromopeptidaz (10000 U/ml; Sigma) ile çözülmüş ve 37°C’de 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda, bakteri çözeltisine 50 µl 0.5 M KOH ilave edilmiş ve aynı şartlarda beş dakika daha bekletildikten sonra nötralizasyon amacıyla 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 6.7) ilave edilmiştir. Beş dakika 10000 devirde santrifüjasyondan sonra supernatant kısmı kalıp DNA olarak kullanılmıştır⁽¹⁷⁾.

Çalışmada, DNA makrorestriksiyon analizi için Bannerman ve ark.⁽³⁾ tarafından önerilen *Sma* I restriksiyon yöntemi uygulanmıştır. PFGE için Chef DR III (Biorad) cihazı kullanılmış ve NCTC 8325, EMRSA 15 ve EMRSA 16 suşları karşılaştırma amacı ile çalışmaya dahil edilmiştir.

RS-PCR, 16 S_rRNA-23 S_rRNA’ya özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁽¹⁸⁾.

Kontrol suşları olarak NCTC 10422 (PR 108i), EMRSA 15 (PR 15), EMRSA 16 (PR 16) kullanılmıştır.

SCC*mec* tiplerinin belirlenmesi amacı ile Oliveira ve Lancastre⁽²⁴⁾'ın multipleks PZR ve Ito ve ark.⁽¹⁴⁾'nın yöntemleri uygulanmıştır.

Multipleks PZR yönteminde, farklı SSC*mec* tip ve alt tiplerine özgü sekiz çift primer ve ayrıca internal kontrol olarak *mecA*'ya özgü primerler kullanılmıştır. Sınıf A ve B *mec* gen kompleksi ve tip 1-3 *ccr*'yi saptamak için Ito yöntemi kullanılarak uygun primer çiftleri ile beş farklı PZR uygulanmıştır. Farklı tiplerin temsilcisi olarak NCTC 10422 (Tip I SSC*mec*), Mu50 (Tip II), EMRSA 1 (99.3234.F) (Tip III) ve EMRSA 15 (009521.M) (Tip IV) çalışmaya dahil edilmiştir.

MLST analizi için, yedi metabolik gene ait 402-516 baz çiftlik DNA fragmanları (*arc*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi*) çoğaltılmış ve dizi analizi uygulanmıştır. Diziler, MLST web sitesi (www.mlst.net) aracılığı ile her loküsteki bilinen aleller ile karşılaştırılmıştır. Alel profilleri belirlenmiş ve filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir^(9,22,27).

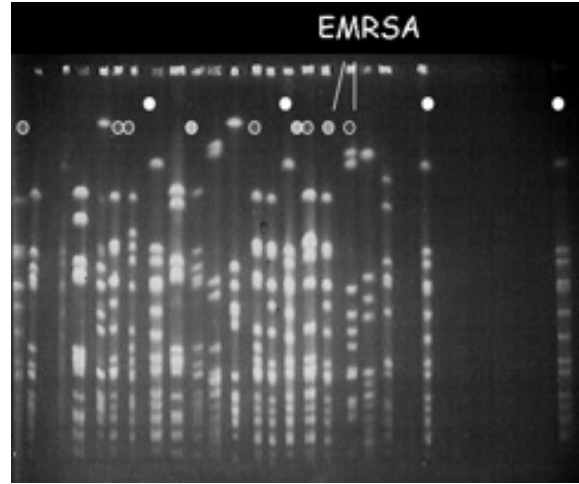
spa tiplendirmesi için Protein A genine ait polimorfik X bölgesindeki 24 baz çiftlik tekrarlardan oluşan kısa dizi tekrarları (SSR) çoğaltılmış ve dizi analizi uygulanmıştır^(1,25). Diziler DNA Star programı ve Ridom veritabanı kullanılarak bilinen dizilerle karşılaştırılmıştır.

pvl geninin araştırılması amacı ile *pvl/nuc* multipleks PZR yapılmış ve pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla E16 (98.1695.K) ve NCTC 10422 izolatları kullanılmıştır⁽²⁰⁾.

BULGULAR

Çalışmada yer alan MRSA izolatları arasında PFGE ile dört farklı patern saptanmasına rağmen esas olarak bir klonal tip ve bunun bir alt tipinin (patern X ve X') hakim olduğu görülmüştür. Bunun dışında tek bir MRSA izolatında ikinci bir patern (Y) saptanmıştır. Gerek predominant patern, gerekse Y paterni, özellikle İngiltere'de sık görülen EMRSA 15 ve EMRSA 16 suşları ile NCTC 8325 standart suşunun makrorestriksiyon paternlerinden farklı bulunmuştur (Şekil 1). Bu paternlerin İskoçya MRSA

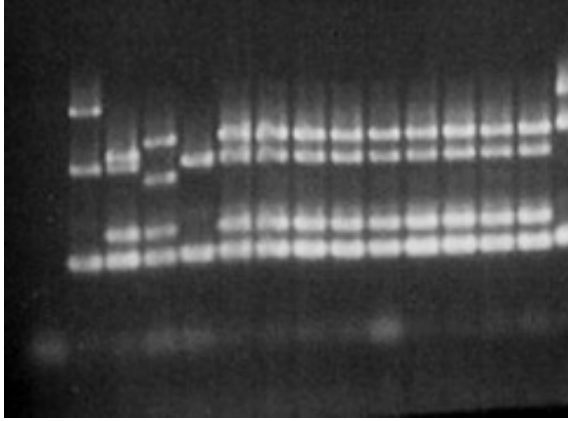
Referans Laboratuvarı arşivlerinde yer alan İspanya, Brezilya ve Macaristan klonlarından da farklı olması nedeniyle bu izolatlar arşive "İzmir klonu" olarak eklenmiştir. Biri dışında tüm MRSA izolatları, RS-PZR ile PR 109 paternine benzer bir ribozomal ara bölge paterne sahipti. PFGE ile Y paterni gözlenen izolatın yine arşiv suşları ile karşılaştırıldığında, bilinen tiplerden farklı bir RS-PZR paterni (PR X) olduğu görülmüştür. Jelde yer alan MSSA izolatları ise, PR 127 IV/VII, PR 127 i ve PR 107/III RS-PCR paternlerine sahipti.



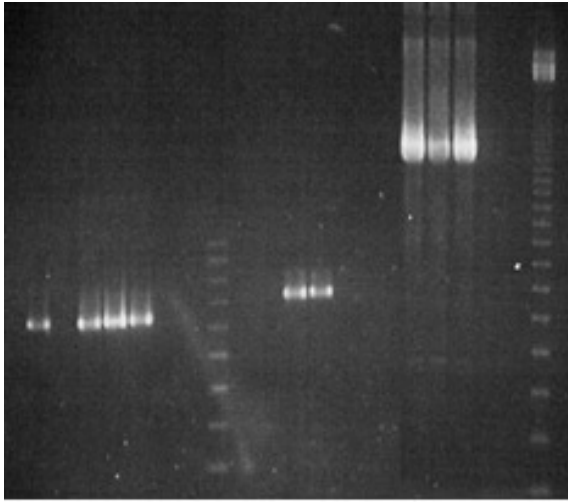
Şekil 1. Kan kültürlerinden izole edilen MRSA ve MSSA izolatlarının PFGE paternleri. Patern X: 1., 6., 14. ve 17. sırada; X':12. ve 16. sırada; Patern Y: 7.sırada; NCTC 8325: 3., 8., 15., 22. ve 29. sıralarda; EMRSA 15: 18. sırada; EMRSA 16: 19. sırada; PF105: 20. sırada yer almaktadır. Diğer MRSA izolatları h-MRSA olup 5. ve 11. sıralardadır.

Oliveira yöntemiyle multipleks PZR kullanılarak SSC*mec* tipleri incelendiğinde, DEÜ izolatlarının, Tip II ve Tip III'ün her ikisine de ait olan bantlar içerdiği belirlenmiştir (Şekil 2). *mecA* bandı (162 bp) tüm izolatlar ve kontrollerde saptanmıştır. Oliveria yöntemi ile belirgin bir sonuç elde edilemediği için *mec* sınıf ve *ccr* gen kompleksi tipleri Ito yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla hakim klonal grubu temsil eden üç izolat seçilmiştir. Bu izolatlarda sınıf A *mec* ve tip 3 *ccr* saptanmıştır. Sonuç olarak, izolatların SSC*mec* tipinin bildirilmiş olanlardan farklı bir Tip III varyantı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Hakim MRSA klonunun MLST alel profili, sekans tipinin (ST) ST239 olduğunu gösteren 2-3-1-1-4-4-3 olarak saptanmıştır.



Şekil 2. Oliveira multipleks PZR sonuçları: 1.-4. sıralar sırasıyla Tip I-IV SCCmec pozitif kontrol suşları; 5.-13. sıralar DEÜ izolatları.



Şekil 3. Ito tiplendirme yönteminden bazı seçilmiş sonuçlar. İlk beş sıra sınıf A mec-PZR pozitif kontrol ve DEÜ suşları pozitif; DNA ladder; ikinci beş sıra sınıf B mec-PZR sadece pozitif kontrollerin bantları pozitif; tip 3 ccr-PZR'de üç DEÜ suşunda da 1600 bp'lik pozitif bant görülmektedir.

spa tipi, WGKAQQ paterni olarak belirlenmiştir. "Ridom StaphType" programı kullanılarak r15 r16 r02 r24 r24 *spa* tekrarları elde edilmesi nedeniyle, hakim olan klonun *spa* tipinin t030 olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada, DEÜ MRSA izolatlarının hiçbirinde *pvl* geni saptanmamıştır.

TARTIŞMA

MRSA izolatlarının epidemiyolojik ilişkilerini araştırmak için; salgın, hastane infeksiyonları gibi kısa süreli olaylarda PFGE, AP-PZR

ve ribozomal spacer PZR yöntemleri önerilirken, evrimsel ilişkilerin incelenmesi için ise MLST, *spa* VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats") ve SCCmec tiplendirme yöntemleri önerilmektedir^(8,12). Avrupa MRSA izolat koleksiyonu ile yapılan bir çalışmada PFGE, *spa* tiplendirme ve MLST/ SCCmec tiplendirme yöntemlerinin ayırt etme gücü sırası ile % 91.9, % 91.3 ve % 89.5 olarak belirlenmiştir⁽⁶⁾.

Çalışmamızda yer alan hastanemize ait MRSA izolatları arasında hakim olarak saptanan tek klonal tipin ST239-MRSA-III (Brezilya) klonunun üyesi olduğu sonucuna varılmıştır. Hakim izolatın SCCmec tipinin daha önce bildirilen Tip III A ve B'den farklı bir Tip III varyantı olduğu belirlenmiştir. Tip III SCCmec'in taşıdığı direnç mekanizmaları ile konağa seçici bir avantaj sağlaması, bu klonunun hastanemizdeki hakimiyetinin nedeni olabilir. Çalışmada yer alan suşlar tam olarak ülkemizdeki izolatları temsil etmemekle birlikte MRSA izolatları, makrorestriksiyon paternleri, RS-PZR ve SCCmec tiplerine göre EMRSA 1, 15 and 16 suşlarından farklı bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada, altı coğrafik bölgeden elde edilmiş olan MRSA izolatlarının klonal ilişkisi PFGE, *spa* tiplendirme ve MLST ile araştırılmıştır⁽²⁾. Bu çalışmada 54 MRSA izolatının 53'ü yakın ilişkili bulunmuş ve hakim olan klonun *spa* tipi t030 olarak belirlenmiştir. Sık gözlenen PFGE paternlerinden yapılan MLST incelemesinde, tüm paternler ST239 olarak saptanmış ve SCCmec tiplendirme ile Tip III elementi tüm MRSA izolatlarında gösterilmiştir. Ayrıca hiçbir MRSA izolatında *pvl* geni saptanmamıştır⁽²⁾. Sonuçlarımız Türkiye genelini yansıtan bu çalışmadaki bulgular ile paraleldir.

Danimarka'da yapılan bir çalışmada, toplumda kazanılmış MRSA izolatlarının çoğunluğunun bir klona ait olduğu gözlenmiş ve hakim klonun *spa* tipinin t070 (UJGBBPB), SCCmec tipinin Tip IV ve sekans tipinin de ST 80 olduğu belirlenmiştir. Hastane kökenli MRSA izolatlarında ise sekiz farklı PFGE paterni saptanmış ve klonlardaki bu çeşitlilik hastane infeksiyonlarının kontrolündeki başarıya bağlanmıştır. Aynı çalışmada hakim klon ile aynı paterni taşıyan tüm toplumda kazanılmış MRSA izolatlarında

pvl geni saptanmış olup bu izolatların elde edildikleri örneklerin çoğunluğunun deri ve yumuşak doku olduğu belirtilmiştir. Hastane kökenli MRSA izolatlarında ise *pvl* geni düşük oranlarda saptanmış ve bu durum izolatların daha çok deri ve yumuşak doku dışındaki örneklerden izole edilmesine bağlanmıştır⁽¹⁰⁾. Avustralya'da yapılan bir çalışmada ise toplum kökenli MRSA izolatlarının çoğunluğunda *pvl* geni saptanmıştır⁽²³⁾. Çalışmamızda *pvl* genine sahip olan MRSA bulunmamasının nedeni izolatların tümünün kan örneklerinden elde edilmesi ve tümünün hastane kökenli olması olabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada hem toplum hem de hastane kökenli MRSA izolatlarında, ilk önce toplum kökenli olarak bildirilmiş USA 300 klonunun hakim olduğu saptanmış ve hastanede yatan hastaların da aynı klon ile enfekte olmaları, hastanede yayılımdan çok, kişilerin önceden kolonize olmalarına bağlanmıştır⁽²¹⁾.

Onyeddi ülkeye ait toplumda kazanılmış PVL pozitif MRSA izolatlarının klonal incelemesinde, *spa* tip t044, ST80 ve SCC*mec* Tip IV en sık saptanan genetik belirteçler olmuştur. Çalışmada, daha önce Avrupa klonu olan ST80, Amerika Birleşik Devletleri klonu olan ST8 ile ST1 ve Pasifik ülkeleri klonu olan ST30 klonlarının kıtalar arası yayılımının gerçekleştiği bildirilmektedir⁽²⁶⁾.

Onbir Avrupa ülkesine ait hastane kökenli MRSA izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin araştırıldığı çalışmada en sık *spa* t051 ve ST247 klonu belirlenmiştir⁽⁶⁾. Çalışmamızda saptanan *spa* t030 ve ST239 ise bu çalışmada daha az gözlenmiştir. Bu durumun nedeni bölgesel özellikler ve hastane infeksiyonlarına karşı alınan önlemlerdeki farklılıklar olabilir.

Çalışmamızda hastanemiz genelinde tek bir MRSA klonunun gösterilmiş olması hastane infeksiyonlarının yayılımında alınması gereken önlemlere dikkat çekmektedir. MRSA ile gelişen hastane infeksiyonlarının yayılımının araştırılmasında ve klonal ilişkiyi belirlemede moleküler yöntemler önem taşımaktadır. Bu yöntemler ile elde edilen veriler hastane infeksiyonlarının önlenmesinde yol gösterici olacaktır.

Teşekkür: Bu çalışmanın PFGE, MLST ve *spa* analizi

kısımları Zeynep Gülay tarafından Glasgow, İskoçya ve Londra, İngiltere'de yapılmıştır. Çalışmamıza katkılarından ve bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlamalarından dolayı, İskoç MRSA Referans Laboratuvarından Dr. Donald Morrison ve Londra Imperial College Tıp Fakültesi'nden Benjamin Short ve Prof. Dr. Mark C. Enright'a, izolatların toplanmasındaki katkılarından dolayı da Tuba Vilken (Bio,MSc)'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H et al: High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study, J Clin Microbiol 2006;44(2):619-21.
2. Alp E, Klaassen CH, Doganay M ve ark: MRSA genotypes in Turkey: persistence over 10 years of a single clone of ST239, J Infect 2009;58(6):433-8.
3. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM: Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*, J Clin Microbiol 1995;33(3):551-5.
4. Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC: Detection of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance, J Antimicrob Chemother 1996;37(1):53-63.
5. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA: Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene, J Clin Microbiol 1992;30(7):1654-60.
6. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB et al: Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection, J Clin Microbiol 2007;45(6):1830-7.
7. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE: The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Clin Microbiol Infect 2007;13(3):222-35.
8. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG: Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, J Clin Microbiol 2000;38(3):1008-15.
9. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(11):7687-92.

10. Faria NA, Oliveira DC, Westh H et al: Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection, *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1836-42.
11. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM et al: Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15(1): 60-4.
12. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T: The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Trends Microbiol* 2001;9(10):486-93.
13. 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(12):4961-7.
14. Ito T, Katayama Y, Asada K et al: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1323-36.
15. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(6):1549-55.
16. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecl deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(7):1955-63.
17. Kobayashi N, Wu H, Kojima K et al: Detection of mecA, femA, and femB genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction, *Epidemiol Infect* 1994;113(2):259-66.
18. Kumari DN, Keer V, Hawkey PM et al: Comparison and application of ribosome spacer DNA amplification with pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *J Clin Microbiol* 1997;35(4):881-5.
19. Lim TT, Chong FN, O'Brien FG, Grubb WB: Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their mec regions, *Pathology* 2003;35(4):336-43.
20. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F et al: Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia, *Clin Infect Dis* 1999;29(5):1128-32.
21. Liu C, Graber CJ, Karr M et al: A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005, *Clin Infect Dis* 2008;46(11):1637-46.
22. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E et al: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):3140-5.
23. O'Brien FG, Lim TT, Chong FN et al: Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia, *J Clin Microbiol* 2004;42(7):3185-90.
24. Oliveira DC, 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(7):2155-61.
25. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO et al: Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains, *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3556-63.
26. Tristan A, Bes M, Meugnier H et al: Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006, *Emerg Infect Dis* 2007;13(4):594-600.
27. Urwin R, Maiden MC: Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology, *Trends Microbiol* 2003;11(10):479-87.