

SỰ HIỆN DIỆN CỦA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ĐỀ KHÁNG METHICILLIN Ở CHÓ TẠI HÀ NỘI

Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Thị Phương, Đào Công Duẩn,
Lê Văn Trường, Vũ Đức Hạnh, Trịnh Đình Thâu
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

MRSA (methicilline - resistant *Staphylococcus aureus*) là nguyên nhân hàng đầu gây nhiễm trùng kế phát trong hệ thống bệnh viện, phòng khám của cả người và động vật. Chúng có khả năng đề kháng cao với rất nhiều loại kháng sinh khác nhau. MRSA có sự lây truyền giữa người và động vật, đặc biệt là giữa người và chó cảnh. Trong nghiên cứu này, 120 mẫu dịch mủ, dử mũi, máu, dịch màng phổi và dịch âm đạo của chó nghi nhiễm MRSA đã được thu thập từ Phòng khám thú y Tap the Petcare (Đan Phượng, Hà Nội) để chẩn đoán phát hiện MRSA bằng kỹ thuật multiplex PCR.

Kết quả nghiên cứu cho thấy có 4/120 (3.33%) mẫu dương tính với MRSA. Các mẫu dương tính với MRSA đều được thu thập từ chó nhập ngoại. Mẫu bệnh phẩm dương tính với MRSA cao nhất là dịch mủ. Bốn chủng MRSA phân lập đã được xác định tính mẫn cảm kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Các chủng MRSA phân lập có tỷ lệ kháng kháng sinh cao hơn so với chủng MSSA (methicilline sensitive *Staphylococcus aureus*). Kết quả kháng sinh đồ chỉ ra rằng MRSA không đề kháng với vancomycin và đề kháng yếu với trimethoprim/sulfamethoxazole. Do đó, có thể sử dụng trimethoprim/sulfamethoxazole và vancomycin để điều trị trong trường hợp chó nhiễm MRSA.

Từ khóa: chó, MRSA, sự hiện diện, nhạy cảm kháng sinh

Prevalence of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs in Ha Noi City

Nguyen Thi Hang, Nguyen Thi Phuong, Dao Cong Duan,
Le Van Truong, Vu Duc Hanh, Trinh Dinh Thau

SUMMARY

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an opportunistic pathogen that infects secondarily for both human and animals in the healthcare centres. MRSA strongly resists to many antibiotics. MRSA can transmit between human and animals, especially between human and pets. In this study, 120 samples including pus, booger, blood, pleural fluids, vaginal fluids from dogs suspecting MRSA infection were collected in Tap the Petcare clinic (Dan Phuong district, Ha Noi City) for detecting MRSA by multiplex PCR.

The studied results indicated that 4/120 (3.33%) collected samples were positive with MRSA. The positive samples were all found in foreign dogs and were not detected in any domestic dog. Among the collected samples, pus fluid accounted for the highest positive rate. The antibiotic susceptibility of four MRSA isolates was determined by agar disc diffusion method. The antibiotic resistant proportion of the MRSA isolates was higher than that of MSSA (methicillin- sensitive *Staphylococcus aureus*). The result of antibiograms indicated that the MRSA isolates did not resist to vancomycin and resisted weakly to trimethoprim-sulfamethoxazole. Therefore, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin can be used for treatment of the MRSA infected dogs.

Keywords: dogs, MRSA, prevalence, antibiotic susceptibility

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hơn 3 thập kỷ qua, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) là nguyên nhân gây nhiễm trùng bệnh viện, phòng khám và nhiễm khuẩn cộng đồng (Vannuffel et al., 1995). MRSA là tụ cầu vàng có khả năng đề kháng với rất nhiều loại kháng sinh. MRSA thường có mặt ở trên da, mũi và không gây ra dấu hiệu lâm sàng trên cơ thể khoẻ mạnh và MRSA sẽ trở thành tác nhân bệnh lý cực kỳ nguy hiểm khi cơ thể người và động vật trong tình trạng ốm yếu. Nhiễm khuẩn MRSA nguy hiểm hơn rất nhiều so với nhiễm khuẩn do các loại tụ cầu khác, bởi vì nó có khả năng đề kháng với rất nhiều loại kháng sinh đang được sử dụng trong hệ thống y tế (Trần Đình Bình và cs., 2012).

MRSA đề kháng với thuốc kháng sinh qua cơ chế sản sinh penicillin-binding 2a protein (PBP2a) thay thế cho penicillin-binding protein (PBP) như vi khuẩn methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA). Trong khi PBP có ái lực với kháng sinh thuộc nhóm β -lactam thì PBP 2a có ái lực rất thấp với nhóm kháng sinh này (Livermore, 2000). PBP2a được mã hoá bởi gen *mecA*, gen này được tìm thấy ở vi khuẩn MRSA mà không tìm thấy ở chủng MSSA (Lee et al., 2004). Gen *mecA* có thể xác định bằng kỹ thuật polymerase chain reaction (PCR). Tuy nhiên *mecA* có thể tìm thấy ở các loài staphylococci khác như *S. epidermidis*, do đó nếu như kết quả phản ứng PCR dương tính với *mecA*, vẫn chưa thể kết luận chính xác MRSA. Do đó, để xác định chính xác MRSA, cần thiết phải sử dụng phương pháp multiplex PCR để xác định ba gen: *mecA*, *nuc* và 16S rARN với các độ dài tương ứng 533 bp, 270 bp và 756 bp. Gen *mecA* là gen chỉ thị vi khuẩn đề kháng với methicillin. Gen *nuc* là vùng gen đặc trưng dùng để phân biệt *S. aureus* và các loài coagulase-negative *S. aureus* (CoNS) khác. Gen 16S rARN được sử dụng như là gen chỉ thị để phân biệt giữa ADN của Staphylococci với các họ khác (Zhang et al., 2004).

MRSA được tìm thấy ở rất nhiều loài động vật, đặc biệt là chó và mèo. Livermore (2000)

đã phát hiện 17% chó và 40% mèo mang trùng MRSA. Nghiên cứu của Lilenbaum và cộng sự năm 1998 đã ghi nhận 25 trường hợp chó nhiễm MRSA. Tuy nhiên chưa có công bố nào về chó nhiễm MRSA ở Việt Nam; trong khi có những nghiên cứu đã chỉ ra tỷ lệ mắc MRSA trên người là rất cao ở Việt Nam (Trần Đình Bình và cs, 2012). Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của MRSA ở chó trên địa bàn thành phố Hà Nội. Đây là kết quả quan trọng nhằm xác định đặc điểm dịch tễ của bệnh, đồng thời cũng để cảnh báo về nguy cơ MRSA có thể truyền lây giữa người và vật nuôi (đặc biệt là chó vì chó là động vật cảnh tiếp xúc thường xuyên với chủ nuôi).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu bao gồm tất cả cá thể chó bệnh được đưa đến khám ở Phòng khám Tapthe Petcare, ở mọi lứa tuổi nghi nhiễm MRSA với các biểu hiện lâm sàng như viêm phổi, ho, có dử mũi, viêm tai có mủ, có các nốt mủ trên da và kẽ móng chân.

2.2. Nội dung

- Xác định tỷ lệ chó nhiễm MRSA tại Bệnh viện Thú y Tapthe Petcare (Phố Mới-Thọ Xuân-Đan Phượng-Hà Nội) bằng kỹ thuật multiplex PCR.

- Điều tra một số đặc điểm dịch tễ học của bệnh trên chó theo giống và theo mẫu bệnh phẩm.

- Kiểm tra mức độ kháng kháng sinh của các chủng MRSA phân lập.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm được thu thập từ tháng 3/2016 đến tháng 12/2016. Mẫu bệnh phẩm gồm các mẫu dịch mủ trên da, dịch mũi, máu, dịch tai, nước tiểu, dịch màng phổi, dịch âm đạo

trong dung dịch đệm PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4) của chó nghi nhiễm MRSA. Mẫu được bảo quản ở -80°C cho tới khi kiểm tra.

2.3.2. Nuôi cấy sàng lọc vi khuẩn

Mẫu được nuôi cấy qua đêm ở điều kiện 37°C trong 5 ml môi trường sàng lọc được bổ sung oxacillin (oxacillin để loại bỏ các loại vi khuẩn MSSA, chỉ để MRSA và MRCoSA có thể phát triển) (Jonas et al., 2002). Sau khi ly tâm 1ml dung dịch nuôi cấy sinh ở điều kiện 10.000v/phút trong 5 phút, loại bỏ dung dịch lỏng phía trên, vi khuẩn được giữ lại trong phần cặn; cặn này được pha loãng trong 5 ml dung dịch Mueller-Hinton.

2.3.3. Phương pháp phân lập *S.aureus*

MRSA được phân lập theo quy trình chuẩn phòng thí nghiệm từ các mẫu dương tính với MRSA (đã xác định bằng multiplex PCR). Xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với các kháng sinh theo phương pháp khuếch tán trên thạch theo Mueller-Hinton. Đọc kết quả kháng sinh đồ theo quy trình của Cockerill et al., (2012) đối với *S. aureus* để xác định mức độ là nhạy cảm (S), trung gian (I) hoặc đề kháng (R).

2.3.4. Phương pháp multiplex PCR

Bao gồm các bước lựa chọn môi và thực hiện phản ứng PCR

* **Lựa chọn môi:** các cặp môi đặc hiệu dùng trong nghiên cứu này được lựa chọn dựa trên các nghiên cứu đã công bố trước đây. Thông tin về cặp môi được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi dùng chẩn đoán sử dụng trong phản ứng multiplex PCR

Môi xuôi/ngược	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước đoạn gen khuếch đại (bp)	Tên gen khuếch đại	Tài liệu tham khảo
MecAF	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATAA	533	<i>mecA</i>	(Jonas et al., 2002)
MecAR	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTAA			
NucF	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	270	<i>nuc</i>	(Zhang et al., 2004)
NucR	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTAA			
SatpHF	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA	756	<i>16S rARN</i>	(Zhang et al., 2004)
SatpHR	CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC			

* Tách và tinh sạch ADN tổng số

2ml canh trùng được trộn với 20ml dung dịch tách ADN theo quy trình hướng dẫn của bộ kit hãng Bioline. ADN của vi khuẩn được tách chiết được giữ ở nhiệt độ -80°C để làm phản ứng PCR.

* Quy trình thực hiện phản ứng PCR

Phản ứng PCR dùng để chẩn đoán xác định MRSA với các cặp môi được thực hiện với chu trình nhiệt được ghi ở bảng 2. Sản phẩm của phản ứng PCR được quan sát trên gel agarose 2% sau khi nhuộm với ethidium bromide; chạy trong 30 phút với dòng điện 70V, được đọc bằng máy đo UV, phân tích bằng hệ thống Kodak DC12.

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR dùng chẩn đoán MRSA

Giai đoạn phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian
Tiền biến tính	94°C	4 phút
Biến tính	94°C	1 phút
Bắt mồi	55°C	30 giây
Khuếch đại gen	72°C	45 giây
Kết thúc	72°C	10 phút

Quy trình nhiệt được thiết lập dựa trên tham khảo quy trình nhiệt của Zhang et al., (2004)

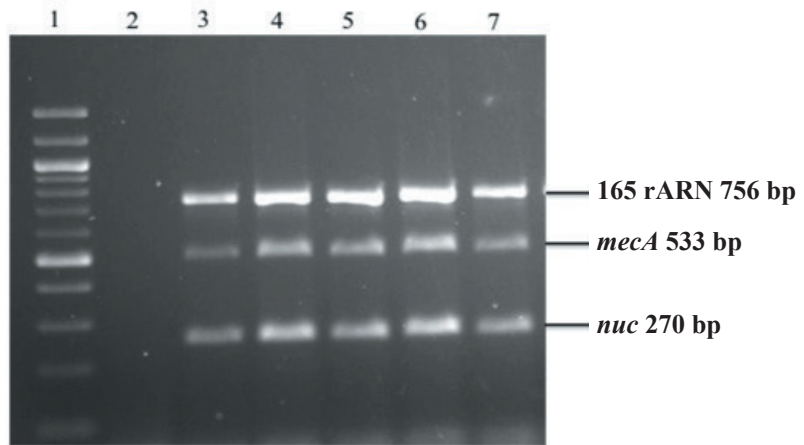
2.3.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2010.

3.1. Kết quả khảo sát tình hình chó nhiễm MRSA bằng kỹ thuật multiplex PCR

Kết quả chẩn đoán chó mắc MRSA bằng kỹ thuật multiplex PCR được thể hiện qua hình 1.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



Hình 1. Kết quả PCR xác định MRSA

Giếng 1: thang chuẩn (1kb); giếng 2: đối chứng âm (chứa ethanol); giếng 3: đối chứng MRSA dương tính (ATCC 29213); từ giếng 4 đến giếng 7, mẫu bệnh phẩm dương tính với MRSA

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng ba cặp mồi Staph, Nuc và MecA để khuếch đại gen tương ứng 16S rARN *Staphylococcus*, *nuc* và *mecA*. Kết quả PCR dương tính với 16S rARN cho biết trong mẫu có ADN của *Staphylococci* mà không phải của họ khác. Kết quả PCR dương tính với gen *nuc* để phân biệt chủng *S.aureus* với các coagulase negative *S.aureus* và *S. hyicus*. PCR dương tính với *mecA* cho thấy cầu khuẩn đề kháng methicillin. Kết quả multiplex PCR sử dụng cả ba cặp mồi để đồng thời khuếch đại 3

gen 16S rARN, *nuc* và *mecA* để khẳng định chắc chắn trong mẫu bị nhiễm MRSA. Vì *mecA* tồn tại cả ở MRSA, methiciline resistant coagulate negative *S.aureus* (MRCoNS), do đó PCR cho kết quả dương tính với cả 3 gen 16S rARN, *nuc* và *mecA* chứng tỏ mẫu dương tính với MRSA.

Giếng số 3 (đối chứng dương MRSA) có ba vạch sáng 756bp, 533bp và 270bp tương ứng với gen mã hoá cho 16S rRNA của các chủng *Staphylococci*, *nuc* và *mecA* trong khi giếng số 2 được nhỏ ethanol như là đối chứng âm không

cho bất kỳ một vạch sáng nào. Giếng đối chứng âm không có vạch sáng, giếng đối chứng dương có các vạch sáng rõ rệt cho thấy kết quả phản ứng multiplex PCR đáng tin cậy. Từ hình 1 cho thấy, trong 120 mẫu bệnh phẩm kiểm tra, có 4 mẫu dương tính với MRSA, mẫu bệnh phẩm

dương tính với MRSA có các vạch sáng tương ứng với giếng số 3 (đối chứng dương).

3.2. Một số đặc điểm dịch tễ của chó mắc MRSA

3.2.1. Tỷ lệ mắc MRSA trên chó theo giống

Bảng 3. Kết quả xác định tỷ lệ chó mắc MRSA bằng kỹ thuật PCR theo giống chó

Nhóm chó	Giống chó	Số chó theo dõi (con)	Số chó (+) MRSA (con)	Tỷ lệ mắc MRSA (%)
Nội địa	Chó vàng	18	0	0,0
	Phú Quốc	22	0	0,0
	Tổng	40	0	0,0
Nhập ngoại	Toy poodle	23	1	4,34 %
	Chihuahua	17	1	5,88 %
	Pug	10	0	0
	Nhật	15	0	0
	Fox sóc	15	2	13,33 %
	Tổng	80	4	5 %
Tổng		120	4	3,33%

Ghi chú: (+) ký hiệu mẫu dương tính

Bảng 3 cho thấy tỷ lệ chó nhiễm MRSA với những triệu chứng bệnh điển hình như viêm phế quản-phổi, viêm da có mụn trên tổng số chó được kiểm tra là 3,33%. Không phát hiện được trường hợp nào mắc MRSA ở giống chó nội, tất cả các mẫu dương tính đều thuộc giống chó ngoại. Trong nhóm chó ngoại, Fox sóc có 2/15 (13,33 %) ca bệnh, Chihuahua 1/17 (5,88 %) ca bệnh và Toy poodle 1/23 (4,34%) ca bệnh được xác định là nhiễm MRSA bằng kỹ thuật multiplex PCR.

Theo nhận định của Baptiste (2005), một vấn đề nổi lên trong thực trạng kháng thuốc kháng sinh, đó là sự truyền lây vi khuẩn kháng thuốc giữa người và động vật. Đây là nguyên nhân dẫn đến khó khăn trong việc kiểm soát tình trạng kháng thuốc ngày càng gia tăng hiện nay. Kết quả nghiên cứu này đã xác định có sự lưu hành MRSA trên chó, trong khi đó MRSA được cho là nguyên nhân

gây nhiễm trùng kể phát hàng đầu và nguy hiểm ở người trong các hệ thống y tế (Manian, 2003). Do đó kết quả của nghiên cứu có thể góp phần khẳng định giả thiết có sự lây nhiễm một số vi khuẩn kháng thuốc giữa người và động vật.

3.2.2. Tỷ lệ mắc theo mẫu bệnh phẩm

Kết quả bảng 4 cho thấy mẫu bệnh phẩm là mũi cho tỷ lệ dương tính MRSA cao nhất (2,5%). Ngoài ra MRSA còn được phát hiện trong mẫu bệnh phẩm là dịch mũi (0,83%). Theo Lowy (1998), *S. aureus* luôn tồn tại trên cơ thể người và động vật, khi sức đề kháng của người và động vật giảm, chúng sẽ phát triển và gây bệnh với những triệu chứng điển hình như hình thành các mụn mủ trên da, gây viêm phế quản-phổi và nhiễm trùng máu. Kết quả này có ý nghĩa quan trọng trong việc lựa chọn mẫu bệnh phẩm để xét nghiệm.

Bảng 4. Kết quả xác định tỷ lệ mắc MRSA bằng kỹ thuật PCR theo mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm	Số mẫu theo dõi	Số mẫu (+) với MRSA	Tỷ lệ (+) MRSA (%)
Mủ	70	3	2,5%
Máu	15	0	0,0
Dịch mũi	20	1	0,83 %
Dịch tai	7	0	0,0
Dịch màng phổi	5	0	0,0
Dịch âm đạo	3	0	0,0
Tổng	120	4	3,33%

Ghi chú: (+) chỉ mẫu dương tính

3.2.3. Kết quả kiểm tra tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng MRSA phân lập

Nhằm mục đích xác định những kháng sinh còn có khả năng điều trị MRSA, chúng

tôi tiến hành làm kháng sinh đồ bằng phương pháp khuếch tán trên thạch với mẫu so sánh là các chủng MSSA (các chủng còn mẫn cảm methicillin).

Bảng 5. Tỷ lệ kháng kháng sinh của MRSA và MSSA

Kháng sinh	MRSA		MSSA	
	n	(%) R	n	(%) R
Vancomycin	4	0,0	10	0
Cefoxytin	4	100,0	10	0
Gentamycin	4	75,0	10	50
Tetracyclin	4	75,0	10	20
Trimethoprim-sulfamethoxazole	4	25,0	10	0,0
Ciprofloxacin	4	50,0	10	50
Clindamycin	4	100	10	25
Erythromycin	4	75,0	10	25

Ghi chú: n, số chủng MRSA và MSSA được sử dụng làm kháng sinh đồ; MSSA là các chủng phân lập tham chiếu của phòng vi sinh vật, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương; R (resistance), đề kháng kháng sinh

Kết quả bảng 5 chỉ ra rằng MRSA có tỷ lệ đề kháng với kháng sinh cao hơn so với các chủng *S. aureus* còn mẫn cảm methicillin. Các chủng MRSA có mức đề kháng 100% với kháng sinh cefoxytin và clindamycin, trong khi MSSA rất mẫn cảm với hai kháng sinh này. Ngoài ra các chủng MRSA gây bệnh trên chó có tỷ lệ đề kháng tới 75% đối với gentamycin, tetracyclin và erythromycin, trong khi MSSA vẫn còn mẫn cảm với các kháng sinh này. Không có chủng phân lập MRSA đề kháng với vancomycin và chỉ có 2/4 chủng phân lập đề

kháng với trimethoprim-sulfamethoxazole. Do đó có thể sử dụng vancomycin và trimethoprim-sulfamethoxazole để điều trị các trường hợp nhiễm MRSA trên chó ở Việt Nam. Kết quả kháng sinh đồ tương đồng với nhận định của Barrett (2004), MRSA đã trở thành chủng vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm đối với người và động vật, chúng chiếm 30-60% trong các chủng *S.aureus*. MRSA không những có khả năng đề kháng với β -lactam mà còn đề kháng rất mạnh với kháng sinh thuộc nhóm quinolones, macrolides và sulfonamides.

IV. KẾT LUẬN

Đã xác định được 4 chủng MRSA từ mẫu bệnh phẩm thu thập từ chó nghi nhiễm MRSA bằng kỹ thuật multiplex PCR. Nghiên cứu này đã xác định được 3,33% chó nhiễm MRSA trong các ca theo dõi. Chỉ phát hiện MRSA ở chó bệnh giống ngoại, chưa phát hiện trường hợp chó nội mắc MRSA trong số chó theo dõi. MRSA được phát hiện nhiều nhất ở mẫu bệnh phẩm là mủ từ các mụn mủ trên da. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng MRSA có khả năng đề kháng với kháng sinh cao hơn so với các chủng MSSA. Khi chó mắc MRSA, có thể sử dụng vancomycin và trimethoprim-sulfamethoxazole để điều trị. Đây là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra sự hiện diện của MRSA trên chó ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho việc nghiên cứu dịch tễ học của MRSA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baptiste, K.E., 2005. Methicillin-resistant Staphylococci in Companion Animals-Volume 11, Number 12—December 2005. *Emerging Infectious Disease journal-CDC*.
2. Barrett, J.F., 2004. MRSA: status and prospects for therapy? An evaluation of key papers on the topic of MRSA and antibiotic resistance. *Expert opinion on therapeutic targets* 8, 515-519.
3. Cockerill, F.R., Clinical, Institute, L.S., 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement; [... provides updated tables for... M02-A11 and M07-A9]. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
4. Jonas, D., Speck, M., Daschner, F., Grundmann, H., 2002. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from screening swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1821-1823.
5. Lee, J.H., Jeong, J.-M., Park, Y.-H., Choi, S.-S., Kim, Y.-H., Chae, J.-S., Moon, J.-S., Park, H., Kim, S., Eo, S.-K., 2004. Evaluation of the methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *Journal of clinical microbiology* 42, 2780-2782.
6. Livermore, D.M., 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 3-10.
7. Lowy, F.D., 1998. Staphylococcus aureus infections. *New England journal of medicine* 339, 520-532.
8. Manian, F.A., 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases* 36, e26-e28.
9. Trần Đình Bình, Nguyễn Thị Kim Chi, Nguyễn Thị Nam Liên, Mai Văn Tuấn, Sylvain Godreuil, 2012. Nghiên cứu phân bố và tính kháng thuốc của vi khuẩn tụ cầu phân lập từ bệnh viện trung ương Huế năm 2012. <http://noitiethoc.com/d6718-nghiun-cuu-phan-bo-va-tinh-khang-thuoc-cua-vi-khu%E1%BA%A8n-tu-cu-phan-lap-tai-benh-viun-trung-uong-hue-nam-2012.html>
10. Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G., Gala, J.-L., 1995. Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2864-2867.
11. Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., Gregson, D.B., Louie, T., Conly, J.M., 2004. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4947-4955.