

## 分子疫学的手法を用いた日本の高食中毒原性黄色ブドウ球菌の解析

佐藤祐介

### 要約

黄色ブドウ球菌のクローン解析ではStaphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) 型別が汎用されているが、本手法はメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) が多い食中毒由来株の分子疫学解析には不適であった。そこで食中毒由来株のクローン解析に適した手法としてgenomic elements-scanningを確立し、標準菌株および臨床分離株での解析が可能であることを確認した。分子疫学的解析を用いて食中毒由来株とその他の株の遺伝学的背景を比較すると、コアグラゼ型、SE/SEI型ならびにclonal complex (CC) の存在の比率に違いがあることが判明した。さらに食中毒由来で最も高頻度に存在したCC81に分類された全ての株のゲノム構成の解析では、大きく2つの型 (サブタイプ1およびサブタイプ2) に分類できることが明らかになった。これらのうち食中毒由来CC81は全てサブタイプ1に分類された。なお、このクローンはブドウ球菌エンテロトキシンAの高い産生性を示し、これが高食中毒原性に関わっていると推定された。

キーワード：黄色ブドウ球菌，ブドウ球菌食中毒，分子疫学，エンテロトキシン，MLST.

### 序論

ブドウ球菌食中毒は、黄色ブドウ球菌が産生するブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) によって引き起こされる食品内毒素型食中毒の一つである [14]。本食中毒は世界中で発生している食品衛生および公衆衛生上重要な食中毒であるにも関わらず完全な抑止ができていない。日本においても、1990年以降、毎年数十件の事例の発生と数百人の患者に被害が及んでおり、この数は同時期に発生した腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒よりも多い (厚生労働省 食中毒統計調査, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html>)。2000年には関西地方を中心として低脂肪乳を原因とした被害者数13,400名に及ぶ世界最大のブドウ球菌食中毒事例も発生している [5]。このようにブドウ球菌食中毒は重要な食品衛生上の危害因子の一つであるが、未だ十分な科学的知見が得られているとは言い難い。

2001年に最初の黄色ブドウ球菌の完全なゲノム配列が報告されて以降 [6]、分子生物学的な手法を用いた分子疫学解析が急速に発展してきた。これにより、黄色ブドウ球菌に起因する多様な疾病は単一の菌株によるものではなく、特定疾病に対して遺伝学的に均一なクローンが存在することが明らかになった [7-12]。

特に黄色ブドウ球菌によるヒトの感染症では、各クローンの病原性解析が進展している。しかし、黄色ブドウ球菌による疾病の中でもブドウ球菌食中毒に関連するクローンの報告はなく、その病原性 (食中毒原性) 解析も行われていない。したがって、本研究では、ブドウ球菌食中毒の抑止に有用な科学的基盤を確立するために、食中毒原性クローンの同定とその特性解析を行った。

### 第1章 食中毒分離株の分子疫学解析に有用な新規遺伝学的解析手法の確立

黄色ブドウ球菌のクローン解析に関わる疫学解析手法としてStaphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) 型別が汎用されているが、この手法は本菌のメチシリン耐性に関わるgenomic elementsの解析であり [13]、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) にのみ適応可能な解析手法である。しかし、ブドウ球菌食中毒分離株のほとんどはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) であり [14, 15]、この手法は適さない。したがって、食中毒由来株でも応用可能な新規のgenomic elementsの解析手法として、MSSA/MRSAを問わずほとんどの黄色ブドウ球菌が保有する *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands

(SaPIs)などを対象とした新規解析手法 (genomic elements-scanning法) の確立を行った。

本手法はSaPIsの他に食中毒の原因となるSEs遺伝子が存在するファージやトランスポゾン, enterotoxin gene cluster (*egc*) も含め合計9領域について, 長鎖DNAの正確な増幅が可能なlong-accurate polymerase chain reaction (LA-PCR)を行うものである。黄色ブドウ球菌集団を網羅的に解析可能なプライマーを設計し, LA-PCRによる増幅・解析を行った。

標準菌株であるN315株はゲノム上の44'領域にSaPI (SaPI<sub>n1</sub>)が挿入されており [6], この領域を解析するプライマーを用いると20kbp弱のバンドが検出された (図1 A)。一方, 他の領域では4 kbp以下の増幅産物が得られた。44'領域の増幅産物のHindIII消化後の泳動像 (図1 B) では, in silico予測と一致する3種類のサイズのHindIII消化断片 (8,225bp, 6,473bp, 1,700bp) が確認された。in silico解析より6,473bpの消化断片には*sec*が存在することが予測され, 特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション解析により本断片中に*sec*が検出された (図1 C)。SaPIs以外のgenomic elementsについても同様に標準菌株であるN315株とMW 2株 [16] での特異的プライマーとLA-PCRを用いた増幅と解析を行った。N315株は*egc*と $\phi$  Sa3n, MW 2株は*seh*関連トランスポゾンと $\phi$  Sa3mw2をそれぞれ保有する。これらの領域を増幅し, 制限酵素処理を行った結果 (図2) は, in silicoでの予測 (表1) と一致した。このことから, 本手法は標準菌株の解析に有効であると考えられた。

次に, genomic elementsの保有状況が不明である臨床分離株を用いた解析を行った。供試した食中毒由来, 鼻腔由来, 感染症由来の計10株の解析結果を表2

に示す。全ての株の全ての領域において, genomic elementsの挿入の有無と挿入がある場合にはその型別を行えることを確認した。また, SaPIのうちデータベース上に存在しない増幅産物では, 塩基配列の決定により, 新規SaPIの存在 (図3) が明らかになった [Accession number : AB704539 (SaPI<sub>livm60</sub>), AB704540 (SaPI<sub>hhms2</sub>), AB704541 (SaPI<sub>j11</sub>), AB716349 (SaPI<sub>livm10</sub>), AB716350 (SaPI<sub>ishikawa11</sub>), AB716351 (SaPI<sub>ino10</sub>), AB716352 (SaPI<sub>hirosaki4</sub>)]. さらに, これらのSaPIsにはSaPIの基本骨格となる遺伝子群が保存されていた [17-22].

以上の成績から, 本章で新たに確立したgenomic elements-scanning法は黄色ブドウ球菌の遺伝学的解析に応用可能と考えられた。

## 第2章 Genomic elements-scanning法を用いた食中毒原性クローンの探索

本章では, 第1章で確立した遺伝子型別法を用いて, 日本における食中毒原性クローンの探索と遺伝学的特徴の解明を行った。供試菌株として, 我国で分離された黄色ブドウ球菌506株 (食中毒42株, ヒト鼻腔329株, ヒト感染症85株, 環境50株) を使用した。遺伝子型別として, Coagulase (Coa) 型別 [23], SE/SE like toxin (SEI) 型別 [24], Multilocus sequence typing [25], genomic elements-scanningを行った。

Coa型別において食中毒由来株の70%以上がCoaVII型に分類されたが, 非食中毒由来株でCoaVII型に分類された株の割合は35%以下であった (図4)。食中毒分離株のCoa型が特定の型に集積することが知られており [23, 26-28], 本研究でも同様にVII型への集積が見られた。SEs型別において, 食中毒では*sea*, *seb*,

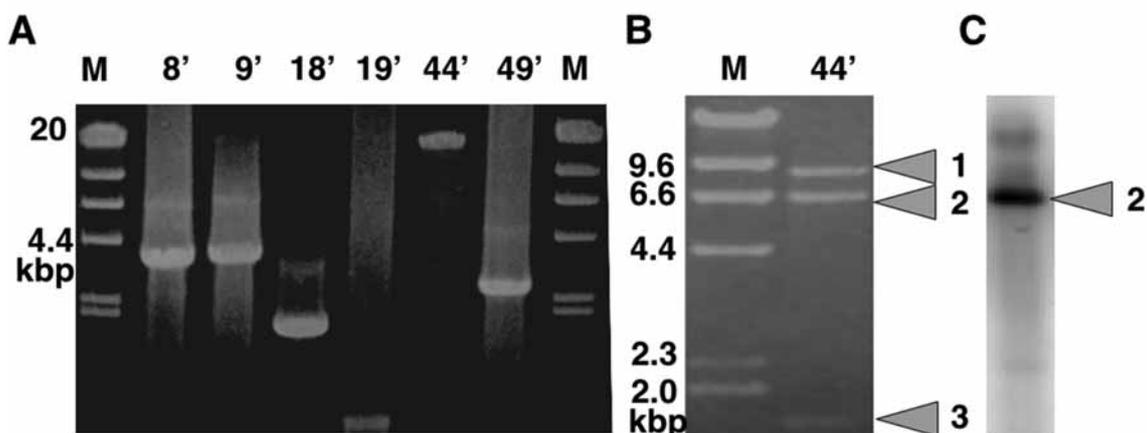


図1 N315株におけるSaPIs解析。A: 全6カ所のSaPIs挿入領域の解析。8'、9'、18'、19'、44'、49'はそれぞれSaPIs挿入領域の8'、9'、18'、19'、44'、49'を示す。M: マーカー( $\lambda$ -HindIII digest (Takara))。B. 44'領域増幅産物のHindIII消化断片の泳動像。矢頭1-3は消化断片1-3を示す。M: マーカー( $\lambda$ -HindIII digest (Takara))。C. *sec*特異的DNAプローブを用いたSouthern hybridization。矢頭2は消化断片2を示す。

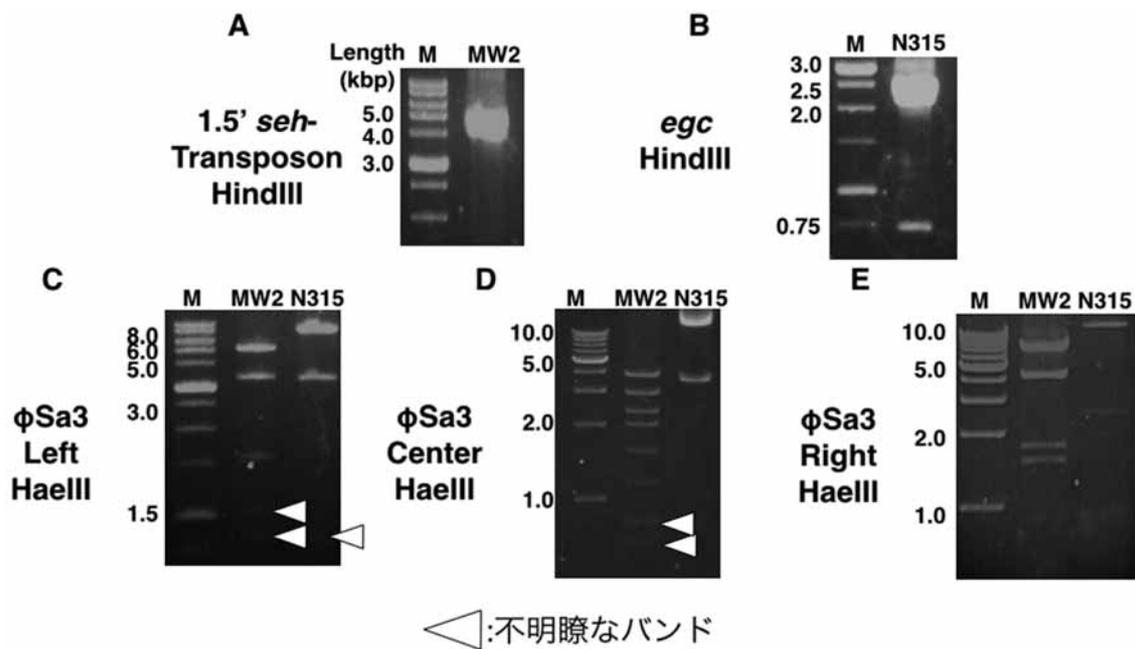


図2 MW 2株およびN315株における3種のgenomic elements挿入領域における増幅産物の制限酵素処理。φSa3は長大なため、3領域 (Left, Center, Right) に分割して解析。A. トランスポゾン (MW2), B. *egc* (N315), C. φSa3 Left (MW2とN315), D. φSa3 Center (MW2とN315), E. φSa3 Right (MW2とN315), M: 1kbpLadder. 白矢頭: 不明瞭なDNA断片。500bp以下のDNA断片は確認困難。

表1 N315株およびN315株における各増幅genomic elementsの消化DNA断片長 (bp)

増幅産物 (株)	制限酵素	消化断片1	消化断片2	消化断片3	消化断片4	消化断片5	消化断片6	消化断片7	消化断片8	消化断片9	消化断片10	消化断片11
seh-トランスポゾン (MW2)	HindIII	5,032 (bp)	4,634	243	79	-	-	-	-	-	-	-
<i>egc</i> (N315)	HindIII	2,594	2,561	2,349	747	-	-	-	-	-	-	-
Sa3L* (MW2)	HaeIII	5,237	3,351	1,587	1,049	847	-	-	-	-	-	-
Sa3L* (N315)	HaeIII	8,730	3,351	842	-	-	-	-	-	-	-	-
Sa3C** (MW2)	HaeIII	4,039	3,036	2,380	2,059	1,571	1,193	854	845	722	707	137
Sa3C** (N315)	HaeIII	13,858	3,645	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sa3R*** (MW2)	HaeIII	7,310	4,419	1,792	1,545	232	-	-	-	-	-	-
Sa3R*** (N315)	HaeIII	14,592	3,645	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Sa3L: Sa3 Left,\*\*Sa3C: Sa3 Center,\*\*\*Sa3R: Sa3 Right

表2 本章で使用した株のgenomic elementsプロファイリング

株	由来	8'	9'	18'	19'	44'	49'	トランスポゾン	<i>egc</i>	φSa3
No. 1	食中毒	-	GE TypeA (MW2)	SaPlishikawa11	-	-	-	○ (MW2)	-	-
No. 10	食中毒	-	GE TypeA	-	-	SaPlno10	-	○	-	φSa3mw2
Ishikawa11	食中毒	-	GE TypeA	SaPlishikawa11	-	-	-	○	-	φSa3mw2
Nagasaki	食中毒	-	GE TypeA	SaPlishikawa11	-	-	-	○	-	φSa3mw2
IVM10	鼻腔	SaPlivm10	-	-	-	-	GE	-	○ (N315)	-
IVM60	鼻腔	-	GE TypeA	-	SaPlivm60	-	-	-	-	-
Hirosaki4	鼻腔	-	GE TypeB	-	-	SaPlhirosaki4	-	-	○	-
Hirosaki11	鼻腔	SaPlivm10	GE TypeB	-	-	-	GE	-	○	-
HHMS2	感染症	-	GE TypeA	-	SaPlhms2	-	-	○	-	φSa3mw2
J11	感染症	-	GE TypeA	-	SaPlj11	-	-	○	-	unknown phage

GE: genomic elements

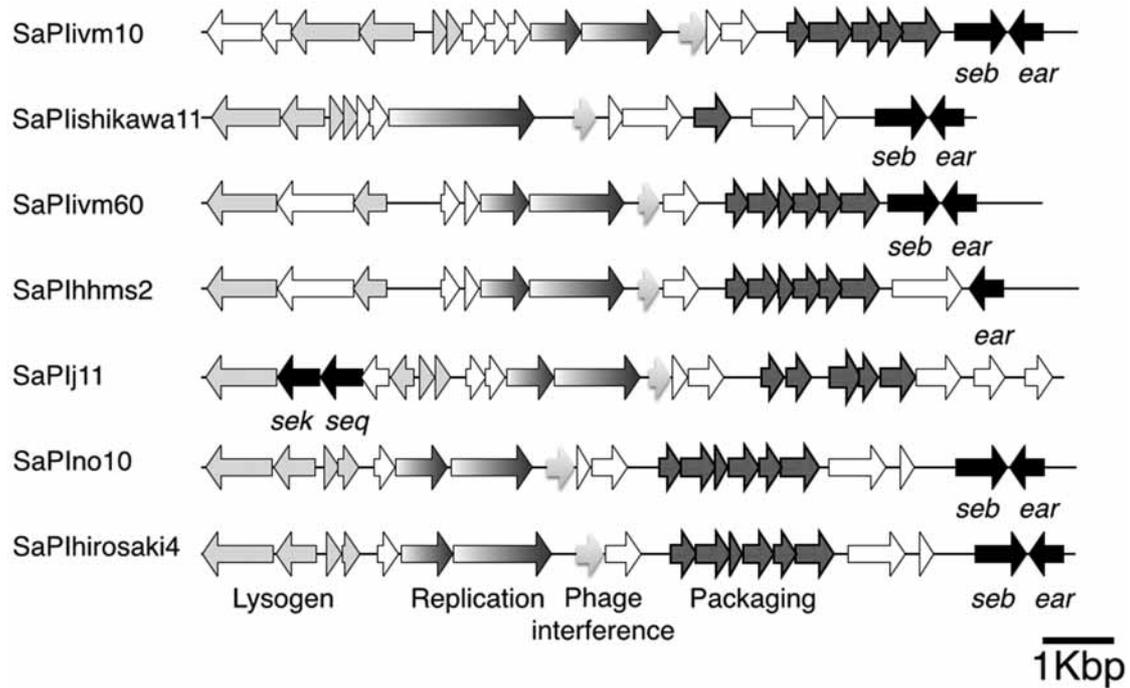


図3 本研究で同定した7種の新規SaPIs. Lysogen: 溶原化その遺伝子制御に関わる遺伝子. Replication: 複製に関わる遺伝子, Phage interference: ファージ干渉に関わる遺伝子. Package: ファージ様粒子へのパッケージングに関わる遺伝子, 黒矢印 (*seb*, *sek*, *seq*, *ear*): 病原因子遺伝子

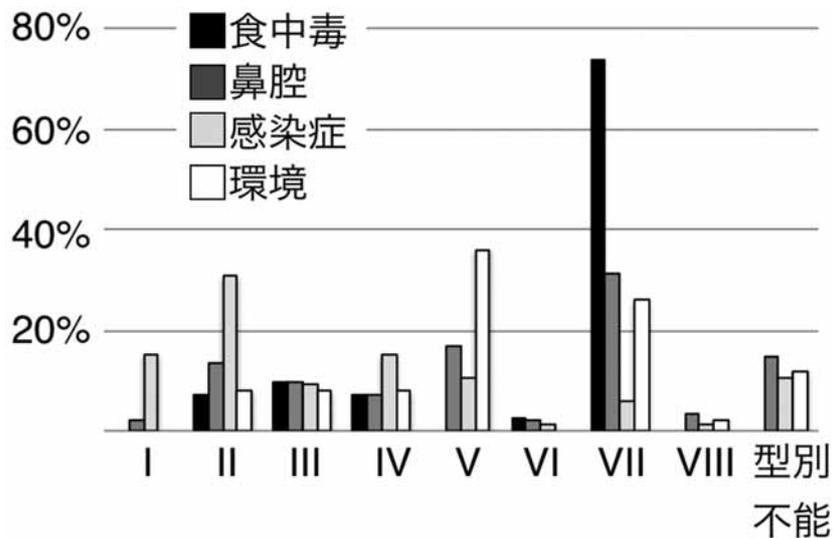


図4 各種分離株におけるコアグララーゼ型の存在頻度。食中毒: n=42, 鼻腔: n=329, 感染症: n=85, 環境: n=50

*seh*, *sek*, *seq* の陽性率が40%以上を示したが, 非食中毒由来株では20%以下であった (図5). SEAは最も嘔吐活性が強く重要な毒素として知られている [29]. また, 他の多くのSEとは異なり, 増殖曲線の全ての段階, 特に培養初期の少ない菌数でもその発現が認め

られ [30, 31], 食品中では一週間に渡りその発現が維持されることが報告されている [32]. このような性質のためSEAは食中毒において最も重視されているが, 本研究でも同様に高い陽性率を示したことは重要な所見であった. Multi locus sequence typing (MLST)

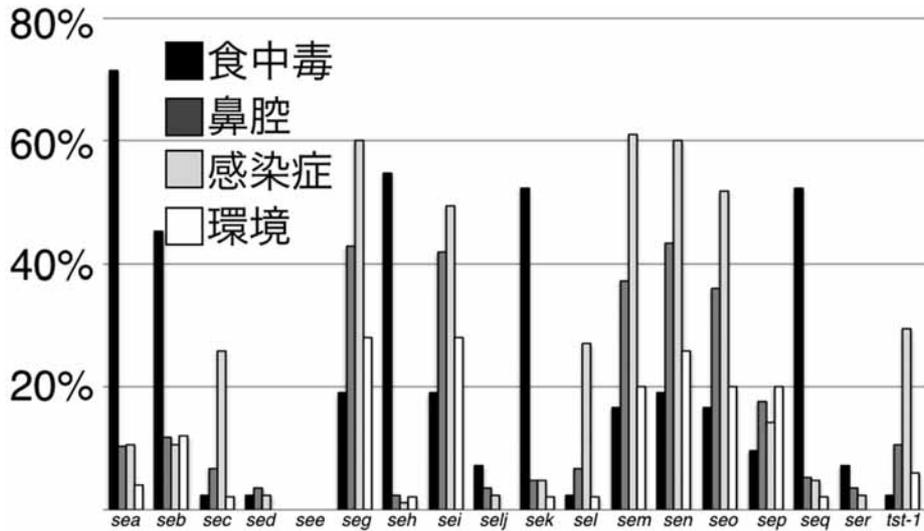


図5 各種分離株におけるSEs/SEIsの陽性頻度。食中毒：n=42，鼻腔：n=329，感染症：n=85，環境：n=50

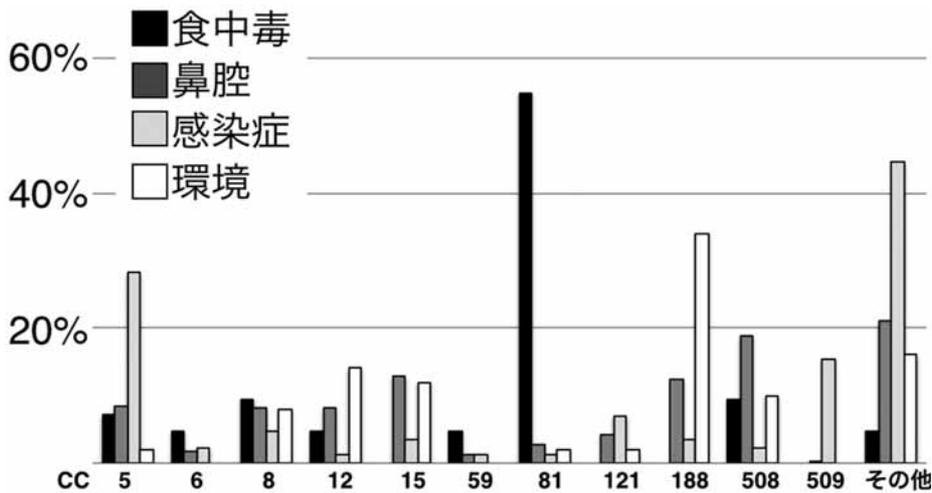


図6 各種分離株における各CCsの存在頻度。主要な11のCCsを選び，図に示す。食中毒：n=42，鼻腔：n=329，感染症：n=85，環境：n=50

ではclonal complex 81 (CC81) に分類される株が食中毒由来で過半数 (54.8%) を占めたが，非食中毒由来株では3%以下であった (図6)。第1章で確立した genomic elements-scanning法による解析では，CC81には遺伝子型と genomic elementsの保有状況の異なる2つのサブタイプが存在していた (図7，表3)。サブタイプ1はCoaVII型で，SEAとSEBの両方もしくは片方が陽性で， genomic elements として seh 関連トランスポゾン を必ず保有し，一部の株は sea 関連ファージ， seb 関連SaPIsを保有していた。一方，サブタイプ2はCoaVI型で sea と seb 陰性で， genomic elements として egc を必ず保有し，1株は sec 関連

SaPIsを保有していた。これらのうち，食中毒由来CC81は全てサブタイプ1であった。また， sea を保有する複数のCCsにおけるブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) 産生量は，CC81サブタイプ1で有意に高いことが判明した (図8)。

CC81はMW2などのUSA400クローンが存在するCC1に近縁なグループに位置する [16]。しかし，このクローンではMW2が保有する genomic elements のうち9'の genomic element typeA, seh トランスポゾン，プロファージは共通のものを保有していたが，他のSaPIsの保有状況は異なっていた。この事実から，CC81が本食中毒原性クローンと共通の祖先から派生

し枝分かれしたグループであることが推測された。また、 $\phi$ Sa3mw2はSEA高産生性プロファージであることが知られており [33]、このプロファージの獲得が、

本クローンのSEA高産生性と食中毒原性に関与していると考えられた。

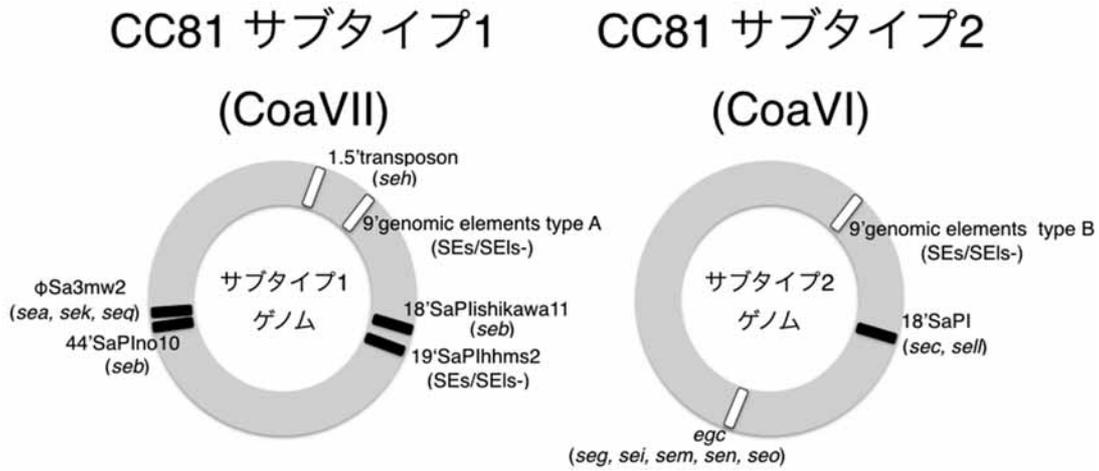


図7 CC81に分類される集団に存在する2種のサブタイプと各ゲノム構成。各サブタイプとそのゲノム上に存在するgenomic elementsを示す。サブタイプ1：n=32、サブタイプ2：n=2。白：各サブタイプに分類される株の全てが保有するgenomic elements, 黒：各サブタイプに分類される株のうち一部の株が保有するgenomic elements。各genomic elements上SEs/SEIsを ( ) 内に示す。

表3 CC81に存在する2つのサブタイプ

		サブタイプ1 (n=32)	サブタイプ2 (n=2)
由来		食中毒, 23; 鼻腔, 7 感染症, 1 環境, 1	鼻腔, 2
Coa型		VII	VI
SEs/SEIs型		<i>sea, seb, seh, sek, seq</i>	<i>sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo</i>
挿入部位	genomic elements		
1.5'	<i>seh</i> -Transposon	+ (30 陽性株/全30株)	-
9'	genomic elements	Type A (No SEs/SEIs) (32/32)	Type B (No SEs/SEIs) (2/2)
18'	SaPIs	SaPIshikawa11 ( <i>seb</i> ) (13/32)	Putative SaPIs ( <i>sec, sel</i> ) (1/2)
19'	SaPIs	SaPIhhms2 (No SEs/SEIs) (2/32)	-
40'	<i>egc</i>	-	+ ( <i>seg, sei, sem, sen, seo</i> ) (2/2)
44'	SaPIs	SaPIno10 ( <i>seb</i> ) (7/32)	-
44' ( $\phi$ Sa3)	Prophage	$\phi$ Sa3mw2 ( <i>sea, sek, seq</i> ) (25/32)	-

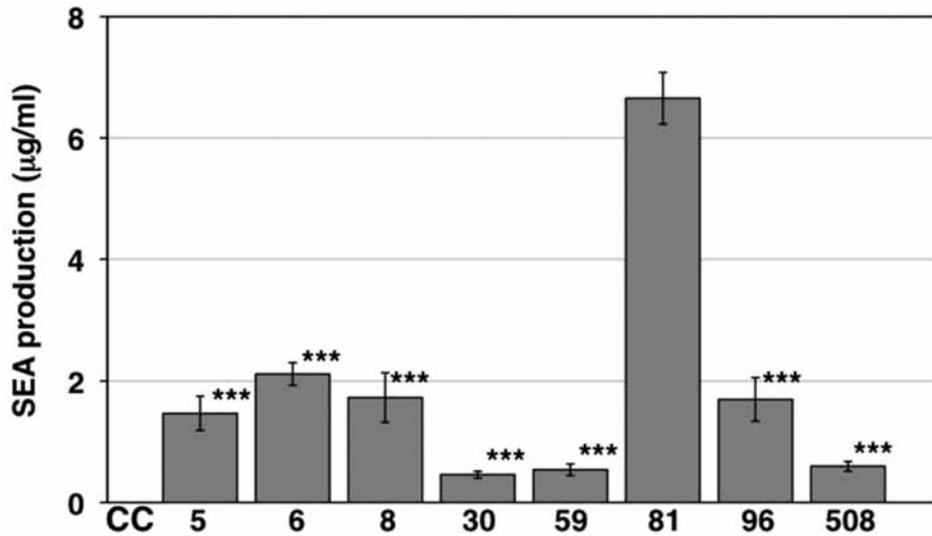


図8 各CCsのsea陽性株におけるSEA産生量。各CCsの平均値と標準誤差を示す。CC81に分類される株は10株、その他のCCsについては2株の培養と測定を行った。培養は3回の独立した試行を行い、各培養上清サンプルについて、独立した3度の測定を行った。\*\*\*:  $p < 0.001$  (Student's t-test & Holm法)

### 総括

本研究により、近年の日本におけるブドウ球菌食中毒の原因となる食中毒原性クローンとしてCC81サブタイプ1が同定された。この所見は今後の食中毒事例分離株の疫学解析や食中毒防除を行う際の科学的情報として重要であり、食品を取り巻く環境中における本クローンの包括的調査が汚染源の摘発や食品への付着経路の解明に寄与できると考えられた。したがって、現在広く普及している一般的な衛生対策に加え、食中毒原性クローンであるCC81サブタイプ1を標的とした疫学解析を組み合わせた食品衛生対策の確立が、食中毒の効果的な抑止に有用であると考えられた。

### 謝辞

本研究にあたり、多大なるご指導を賜りました岩手大学食品安全学前教授（故）重茂克彦先生ならびに産業動物臨床学 山岸則夫教授、弘前大学感染生体防御学 中根明夫教授、北里大学人獣共通感染症学 胡東良教授、広島大学細菌学 菅井基行教授に深謝いたします。

（注）本総説は筆者の岐阜大学大学院連合獣医学研究科より授与された学位（博士）論文を基に執筆されたものである。本学位論文の成果は、2報の科学論文 (Sato'o Y, *et al*: A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands, *Microbiol Immunol*, 57, 91-99 (2013) /Sato'o Y, *et al*: Molecular epidemiology and identification

of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan, *J Clin Microbiol*, 52, 2637-2640 (2014)) として公表されている。

### 引用文献

- [1] Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR: Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins, *Toxins*, 2, 1751-1773 (2010)
- [2] Balaban N, Rasooly A: Staphylococcal enterotoxins, *Int J Food Microbiol*, 61, 1-10 (2000)
- [3] Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S: *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation, *FEMS Microbiol Rev*, 36, 815-836 (2012)
- [4] Le Loir Y, Baron F, Gautier M: *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet Mol Res*, 2, 63-76 (2003)
- [5] Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S: An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk, *Epidemiol Infect*, 130, 33-40 (2003)
- [6] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H,

- Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K : Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet*, 357, 1225-1240 (2001)
- [ 7 ] Deurenberg RH, Stobberingh EE : The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Curr Mol Med* 9, 100-115 (2009)
- [ 8 ] Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M : Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans, *J Clin Microbiol*, 48, 2130-2139 (2010)
- [ 9 ] Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL, Weinert LA, Conway-Morris A, Cartwright RA, Simpson AJ, Rambaut A, Nubel U, Fitzgerald JR : Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19545-19550 (2009)
- [10] Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Fesler AT, Gilbert FB, Kadlec K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Treilles M, Pourcel C, Vergnaud G : High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources, *PLoS One*, 7, e33967 (2012)
- [11] Verkade E, Kluytmans J : Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections, *Infect Genet Evol*, 21, 523-530 (2014)
- [12] Wolf C, Kusch H, Monecke S, Albrecht D, Holtfreter S, von Eiff C, Petzl W, Rainard P, Broker BM, Engelmann S : Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin, *Proteomics*, 11, 2491-2502 (2011)
- [13] Turlej A, Hryniewicz W, Empel J : Staphylococcal cassette chromosome *mec* (*Scmec*) classification and typing methods: an overview, *Pol J Microbiol*, 60, 95-103 (2011)
- [14] Arita T, Nakai M, Miyazaki M, Nasu T, Watanabe S, Okimura Y : A case of food poisoning caused by *Staphylococcus aureus* and study on contamination of soft serve ice cream, Annual report of Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment 29, 40-42 (2010) (in Japanese)
- [15] Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M : Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010, *Food Microbiol*, 32, 202-205 (2012)
- [16] Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K : Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA, *Lancet*, 359, 1819-1827 (2002)
- [17] Mir-Sanchis I, Martinez-Rubio R, Marti M, Chen J, Lasa I, Novick RP, Tormo-Más MÁ, Penades JR : Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision, *Mol Microbiol*, 85, 833-845 (2012)
- [18] Novick RP, Christie GE, Penades JR : The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria, *Nat Rev Microbiol*, 8, 541-551 (2010)
- [19] Ram G, Chen J, Kumar K, Ross HF, Ubeda C, Damle PK, Lane KD, Penades JR, Christie GE, Novick RP : Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 109, 16300-16305 (2012)
- [20] Ubeda, C, Barry, P, Novick, RP, Penades, JR : Characterization of mutations defining SaPI functions and enabling autonomous replication in the absence of helper phage, *Mol Microbiol*, 67, 493-503 (2008)
- [21] Ubeda C, Barry P, Penades JR, Novick RP : A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 104, 14182-14188 (2007)
- [22] Ubeda C, Olivarez NP, Barry P, Wang H, Kong X, Matthews A, Tallent SM, Christie GE, Novick RP : Specificity of staphylococcal phage

- and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations, *Mol Microbiol*, 72, 98-108 (2009)
- [23] Sakai F, Takemoto A, Watanabe S, Aoyama K, Ohkubo T, Yanahira S, Igarashi H, Kozaki S, Hiramatsu K, Ito T : Multiplex PCRs for assignment of Staphylocoagulase types and subtypes of type VI Staphylocoagulase, *J Microbiol Methods*, 75, 312-317 (2008)
- [24] Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K : Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates, *FEMS Microbiol Lett*, 246, 191-198 (2005)
- [25] 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*, 38, 1008-1015 (2000)
- [26] Igarashi H : Gram-positive cocci: Staphylococcal food poisoning, *Biocontrol Sci*, 25, 549-557 (1997)
- [27] Oda T : A review of staphylococcal poisoning in Japan, *J Food Hyg Soc Japan*, 39, J179-J185 (1998)
- [28] Terayama T, Ushioda H, Shingaki M, Inaba M, Kai A and Sakai S : Coagulase types of *Staphylococcus aureus* from food poisoning outbreaks and a kind of incriminated foods, *Ann Rep Tokyo Metrop Res Lab Public Health*, 28, 1-4 (1977)
- [29] Hu DL, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A, Shinagawa K : Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*), *Infect Immun*, 71, 567-570 (2003)
- [30] Rasooly A, Rasooly RS : Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting, *Int J Food Microbiol*, 41, 205-212 (1998)
- [31] Derzelle S, Dilasser F, Duquenne M, Deperrois V : Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth, *Food Microbiol*, 26, 896-904 (2009)
- [32] Wallin-Carlquist N, Marta D, Borch E, Rådström P : Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat, *Int J Food Microbiol*, 141 (Suppl 1), S69-74 (2010)
- [33] Cao R, Zeaki N, Wallin-Carlquist N, Skandamis PN, Schelin J, Rådström P : Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction, *Appl Environ Microbiol*, 278, 4942-4948 (2012)