مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۵، بهار و تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۲۷- ۲۰

ردیابی مولکولی انتروتوکسین های D,C,B, A *استافیلوکوکوس اورئوس* درسویه های با لینی جداشده از بیماران سوختگی بیمارستان مطهری تهران

فاطمه گادیاری , مرتضی ستاری , محمد علی برومند , رامین یعقوبی
سعید سپهری سرشت , لیلا پورقلی

۱. گروه میکروبیولوژی, دانشگاه آزاد اسلامی, واحد جهرم
۲. گروه باکتری شناسی, دانشگاه تربیت مدرس
۳.گروه پاتولوژی, مرکز قلب تهران
٤.مرکزتحقیقات پیوند اعضاء, بیمارستان نمازی, دانشگاه علوم پزشکی شیراز
نویسنده رابط: دکتر مرتضی ستاری , گروه باکتری شناسی, دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۵٦۳ sattarim@modares.ac.ir

چکیده:

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم درایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. یکی از سموم این باکتری، انتروتوکسین برون‌ریز تب آور می‌باشد. بعضی از سویه‌ها یک نوع و برخی بیشتر از ۱۹ نوع انتروتوکسین تولید می‌کنند. .هدف از این مطالعه ارزیابی ژن‌های رمز کننده انتروتوکسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، در ۱۰۰ نمونه جدا شده از زخم بیماران سوختگی بستری در بیمارستان مطهری، وجود ژن‌های رمز کننده انتروتوکسین‌های sed -sec- seb- sea در ژنوم باکتری‌ها با تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آزمایش PCR نشان داد که از ۱۰۰ جدایه بالینی استافیلوکوک اورئوس جدا شده، ۱۲٪ دارای ژن sea، ۱٪ دارای ژن seb ، ۳۵٪ دارای ژن sec و ۳٪ دارای ژن sed بودند. ٤۲٪ از نمونه‌ها حداقل دو ژن انتروتوکسین را حمل می‌کردند: ۲٪ دارای هر دو ژن seb +sea، ۳۲٪ دارای هر دو ژن sea+sec، ۲٪ دارای هردو ژن sea+sed و ٦٪ دارای هردو ژن sec+sed بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان سوپر آنتی‌ژن و نقش سوپر آنتی‌ژن‌ها در بروز بیماری‌های مختلف، تولید این توکسین توسط سویه‌های بالینی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد که درصورت بیان ژن‌های انتروتوکسین، درمان سریع عفونت ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، زخم سوختگی، PCR

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه:

یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و شدیدترین عوارض در بیماران سوختگی، عفونت بیمارستانی می‌باشد (۱،۲). عفونت بیمارستانی، عفونتی است که طی ۷۲-۴۸ ساعت پس از بستری شدن در بیمار ایجاد می‌گردد (۳). *S.aureus* یک پاتوژن فرصت طلب است که پس از *Pseudomonas aeruginosa* شایع‌ترین عامل عفونت زخم‌های سوختگی (۳۰-۲۷٪) در بیمارستان‌ها می‌باشد (٤). *S. aureus* طیف گسترده‌ای از اگزو پروتئین‌ها را تولید می‌کند که علت اصلی بیماری‌ها در میزبان پستاندار است. عده‌ای از سویه‌ها خانواده‌ای از توکسین‌های پیروژنیک شامل انتروتوکسین‌ها، توکسین سندرم شوک سمی (TSST-1) و توکسین اکسفولیاتیو را ترشح می‌کنند (۵). تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ۸۰-۱۵٪ سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از منابع مختلف، قادر به تولید انتروتوکسین می‌باشند (٦). مطالعات متعددی در مورد انتروتوکسین‌های تولید شده توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (SEs= Staphylococcal Enterotoxins) انجام شده است و امروزه علاوه بر ۵ نوع کلاسیک انتروتوکسین‌ها (SEA, SEB, SEC, SED, SEE)، ١٤ نوع جدید از آنها (SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU, SEIV) معرفی شده است (۷). هر دوی SEs و TSST-1 به عنوان سوپر آنتی‌ژن(SAgs) عمل می‌کنند. سوپر آنتی‌ژن‌ها با فعال‌سازی ناحیه متغیر زنجیره Vβ در گیرنده سلولهای T (TCR) و MHCII خارج از جایگاه اتصالشان متصل می‌شوند در نهایت باعث ایجاد پاسخ‌های شبه اتوایمیون تهدید کنندهٔ حیات می‌شوند (۸). ژن‌های رمز کننده انتروتوکسین استافیلوکوکی توسط عناصر ژنتیکی متحرک مثل باکتریوفاژها (sea, see, sep) یا پلاسمیدها (sed, sej, ser, ses, set) و یا توسط جزیره‌های بیماریزایی (SaPIs) بر روی قطعات کروموزمی استافیلوکوک (seb, sec, seh, sei, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq) رمز می‌شوند (۹). بنابراین می‌توان گفت ژن‌های انتروتوکسین به طور افقی نیز می توانند میان سویه‌های استافیلوکوکوس منتقل شوند و این احتمال وجود دارد که این عناصر ژنتیکی متحرک نقش مهمی را در تکامل استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن بازی کنند (۱۰).

امروزه شناسائی و تعیین الگوی SEs با تکنیک‌های فنوتیپی شامل آگلوتیناسیون لاتکس، ELISA، رادیوایمونواسی و ایمونودیفیوژن یا تکنیک‌های ژنوتیپی شامل PCR, Mutiplex RCR و Real time PCR در سطح شناسائی پروتئین یا ژن صورت می‌گیرد (۱۱،۱۲،۱۳). به علت اینکه در تکنیک‌های فنوتیپی نیاز به بیان ژن‌های انتروتوکسین می‌باشد و سروتیپ‌های انتروتوکسین دارای شباهت آنتی‌ژنتیک هستند، احتمال ایجاد واکنش متقاطع وجود دارد، لذا استفاده از روش‌های ژنوتیپی برای شناسایی ژن انتروتوکسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی ترجیح داده می‌شود، با اینکه وجود ژن به تنهایی دلیل بر تولید انتروتوکسین نمی‌باشد (١٤).

اهمیت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و نقش انتروتوکسین‌های آنها به عنوان سوپر آنتی‌ژن در ایجاد بیماری‌های مختلف انگیزه‌ای بود که در این مطالعه با استفاده از روش PCR تشخیص ژن‌های رمز کننده انتروتوکسین در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی انجام شود.

مواد و روش‌ها:

جمع‌آوری جدایه‌های باکتریایی: در فاصله ماه‌های آذر سال ۱۳۸۷ تا اردیبهشت سال ۱۳۸۸ به صورت تصادفی از بیماران سوختگی نمونه‌گیری انجام شد. از زخم سوختگی ۱۰۰ بیمار با استفاده از سواب مرطوب نمونه گیری به عمل آمد و سواب در محیط انتقالی استوارت (Stuart transfer medium, Himedia, India) به آزمایشگاه مرکز قلب تهران منتقل گردید. نمونه‌ها بر روی محیط کلمبیا (Columbia C.N.A agar base, Himedia,

Archive of SID

www.SID.ir

(India) کشت داده شده و به مدت ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور تعیین هویت باکتری‌های رشد کرده، از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی شامل رنگ آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز و کوآگولاز و اوره‌آز، رشد در محیط DNase و مانیتول سالت آگار (Mannitol salt agar) استفاده شد. تمام جدایه‌ها پس از تعیین هویت، جهت مراحل بعدی تحقیق در میکروتیوب حاوی پرل و ٢٠٪ گلیسرول در ٧٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومیک: استخراج DNA ژنومیک استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط استریل و با روش شستشو با محلول تریس – اتیلن دی آمین تترا استات (Tris-EDTA, TE) و جوشاندن (Boiling) انجام شد. به طور خلاصه چند کلنی خالص از استافیلوکوکوس اورئوس از محیط کلمبیا آگار به لوله حاوی ٢ml محیط TSB (Trypticase Soy Broth) تلقیح و به مدت ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. ١/٥ میلی‌لیتر از محیط TSB در میکروتیوب استریل ریخته شد و در دور ١٠٠٠g به مدت ٣ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی میکروتیوب کاملاً تخلیه و طی دو مرحله رسوب به ترتیب با ١٠٠٠ µl و ٥٠٠ µl از محلول TE به خوبی ورتکس گردید و در هر مرحله در ١٠٠٠g به مدت ٣ دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت ٢٠٠µl آب مقطر به رسوب اضافه شد و پس از ورتکس کردن، میکروتیوب‌ها به مدت ١٥ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ٣ دقیقه در دور ١٠٠٠g سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی DNA ژنومی باکتری جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. وجود DNA در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر و با بررسی جذب در طول موج ٢٦٠nm بررسی گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: برای شناسایی وجود ژن‌های انتروتوکسین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی از تکنیک PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ١ آمده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلرو با مخلوط واکنش حاوی ٢/٥ میکرولیتر بافر 10X، ٢/٥ میکرولیتر MgCl2 (٤ میلی مولار)، ٠/٢ میکرومول dNTPs، ١ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ٣٠-٢٠ پیکومول از هر پرایمر آغازگر و ٢ میکرولیتر DNA الگو در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر انجام شد (١٥). برنامه اجرای چرخه‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denatiration) اولیه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه و سپس ٣٥ چرخه تکثیر شامل واسرشتگی در ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٣٠ ثانیه و اتصال پرایمرها به DNA الگو (annealing) در ٥٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٣٠ ثانیه و طویل شدن رشته الگو (extension) در ٧٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ٣٠ ثانیه. طویل شدن نهایی (final extension) به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتیگراد انجام شد (١٥). سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده انتروتوکسین که در این تحقیق به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند شامل سویه‌های D4508: SEA+، ATCC14458:SEB+، AB80002: SEC+ و NCTC 9393: SED+.

ردیابی محصول PCR روی ژل آگارز ٢٪ با الکتروفورز با ولتاژ ١٠٠ ولت به مدت ٢ ساعت انجام گرفت. سپس ژل به وسیله اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) رنگ‌آمیزی و در زیر تابش اشعه UV در دستگاه Transluminator مشاهده شد(١٧).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت پردازش اطلاعات از نرم افزار SPSS 13 استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول- ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام پرایمر	توالی الیگونوکلئوتید ('۳ – '۵)	طول محصول (bp) PCR	مرجع
SE-Universal forward	TGT ATG TAT GGA GGT GTA AC		(۱۵)
SEA	R: ATT AAC CGA AGG TTC TGT	۲۷۰	(۱۵)
SEB	F:TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG R: GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	٤۷۷	(۱۰)
SEC	F: TTT TTG GCA CAT GAT TTA ATT T R:CAA CCG TTT TAT TGT CGT TG	٥٤۱	(۲٥)
SED	R:TTC GGG AAA ATC ACC CTA A	۳۰٦	(۱۵)

یافته‌ها :

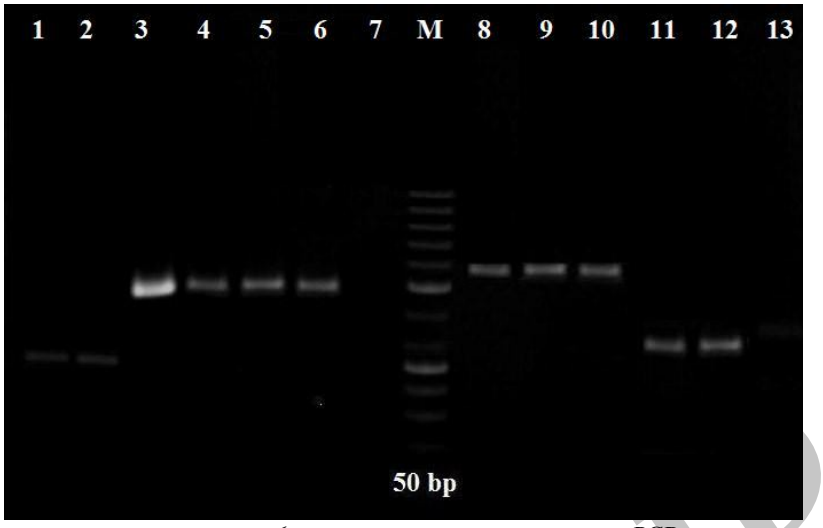
از میان۱۰۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲٪ دارای ژن sea، ۱٪ دارای ژن seb ، ۳۵٪ دارای ژن sec و ۳٪ دارای ژن sed بودند(شکل ۱). ٤۲٪ از نمونه‌ها حداقل دو ژن انتروتوکسین را حمل می‌کردند: ۲٪ دارای هر دو ژن seb +sea، ۳۲٪ دارای هر دو ژن sea+sec، ۲٪ دارای هردو ژن sea+sed و ۵٪ دارای هردو ژن sec+sed بودند (جدول- ۲)

جدول- ۲: الگوی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی

شماره الگو	انواع انتروتوکسین‌ها	درصد وجود ژن انتروتوکسین در بین جدایه‌ها
۱	SEA	٪۱۲
۲	SEB	٪۱
۳	SEC	٪۳۵
٤	SED	٪۳
۵	SEA + SEB	٪۲
٦	SEA + SEC	٪۳۲
۷	SEA + SED	٪۲
۸	SEB + SED	٪۱
۹	SEC + SED	٪٦
۱۰	SEA + SEB + SED	٪۱

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: ژل الکتروفورز حاصل ازPCR ژن های انتروتوکسین نمونه های زخم سوختگی
ستون M : مارکر ۵۰ جفت بازی DNA ، ستون۱،۲: ژن sea ۲۷۰ جفت بازی ، ستون ٦،٣،٤،٥ : ژن seb ٤٧٧ جفت بازی
ستون۸،۹،۱۰ : ژن sec ٥٤١ جفت بازی ، ستون۱۱،۱۲: ژن sed ٣٠٦ جفت بازی

بحث:

شیوع استافیلوکوکوس اورئوس به ویژه در بیماران مستعد از قبیل بیماران سوختگی یا بیماران مبتلا به بیماری‌های پوستی یا مخاطی رو به افزایش است (۱۸). در مطالعه حاضر ۹۵٪ از ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس حداقل یکی از انواع ژن‌های رمز کننده انتروتوکسین را حمل می-کردند. در مطالعه ایمانی فولادی و همکاران (۲۰۰۷) ٤٥٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ۲۰۰ بیمار پوستی تولید کننده انتروتوکسین بودند (۲۰). انوری و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که از ۵۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونتهای زخم، ٧٤٪ تولید کننده انتروتوکسین بودند (۱۵). در دو مطالعه اخیر نیز بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های پوستی کار شده است و تفاوت در میزان شیوع می‌تواند مربوط به افزایش تولید توکسین با توجه به گذشت زمان یا مربوط به تفاوت در محل نمونه‌گیری باشد.

Becker و همکاران (۲۰۰۳) میزان شیوع تولید انترتوکسین را در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از خون و نمونه‌های بینی ۷۳٪ گزارش کردند(۲۰).

در حالی که Ferry و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که ۸٦٪ از جدایه‌های *S. aureus* جدا شده از کشت خون بیماران تولید کننده انتروتوکسین بودند (۲۱). نتایج مطالعه حاضر با نتایج دیگر مطالعات بیان شده، متفاوت می‌باشد. علت آن می‌تواند تفاوت در میزان نمونه‌های مورد بررسی و منشاء نمونه‌های *S. aureus* باشد، زیرا مشخص شده که فراوانی سویه‌های *S. aureus* تولید کننده انتروتوکسین بر اساس منشاء انسانی، حیوانی، مواد غذایی، نوع عفونت و محیط اطراف متفاوت است.

در مطالعه حاضر ژن رمز کننده انتروتوکسین C (sec) در بین ژن‌های کلاسیک رمز کننده انتروتوکسین، فراوانترین ژن (۷۳٪) بود و به دنبال آن به ترتیب sea، sed و seb با فراوانی کمتر شناسایی شدند. این در حالی است که فراوانی ژن‌های انتروتوکسین بطور قابل توجهی در دیگر مطالعات متنوع است. Normannoa و همکاران (۲۰۰۷) بیشترین میزان انتروتوکسین را SED (۳۳/٦٪) و به دنبال آن SEA>SEC>SEB را گزارش دادند (۲۲). Tomi و همکاران در سال ۲۰۰۵، SEB را در بیماران مبتلا به پسوریازیس (psoriasis) و SEC را در بیماران مبتلا به

Archive of SID

www.SID.ir

درماتیت آتیپیک به عنوان فراوان‌ترین انتروتوکسین شناسایی کردند (۸). با توجه به اینکه در دو مطالعه فوق الذکر وجود خود انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفته و از آنجا که ممکن است ژن رمز کننده انتروتوکسین در باکتری وجود داشته باشد، اما بیان نشود، می‌توان یکی از علل تفاوت نتایج این دو مطالعه را با مطالعه اخیر در عدم ردیابی ژن عنوان کرد، البته عامل دیگری که باید مورد توجه قرار گیرد، تفاوت در نوع نمونه‌های بالینی در بین این سه مطالعه می‌باشد. Nashev و همکاران در سال ۲۰۰۷، sea را به عنوان فراوان‌ترین ژن انتروتوکسین (۲۳٪) در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بینی گزارش دادند (۲۳). می‌توان گفت فراوانی سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین در نمونه‌های جدا شده از عفونت‌های مختلف متفاوت می‌باشد که البته نیاز به بررسی دارد.

در این مطالعه ۳۲٪ جدایه‌ها، از ژن‌های متفاوت رمز کننده انتروتوکسین‌ها دو ژن sea و sec را با هم حمل می‌کردند. این نتایج مخالف نتایج Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۸ می‌باشد که گزارش کردند هیچ نمونه‌ای بطور هم-زمان در مورد ژن‌های sec/sea مثبت نبوده است. علت آن ممکن است تفاوت در روش انجام تحقیق و منشاء سویه‌ها باشد، زیرا Akineden و همکاران جهت بررسی سویه‌های *S. aureus* تولید کننده انتروتوکسین روی انواع پنیر به روش RT-PCR کارکردند(۲٤)، البته شیوع انواع انتروتوکسین ممکن است تحت تاثیر منطقه جغرافیایی نیز قرار گیرد.

تحقیقات نشان می‌دهد که انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در خصوصیات ساختاری و بیولوژیکی مشابه هستند، اما در مقادیر تولید شده و مکانیسم‌های بیان ژن، متفاوت می‌باشند و SEB ، SEA نسبت به دیگر انتروتوکسین‌ها به میزان بیشتری بیان می‌شوند (۲۵). با این حال در مطالعه حاضر، با استفاده از روش ژنوتیپی و PCR فقط وجود ژن‌های انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفت و از نظر فنوتیپی میزان بیان ژن‌های انتروتوکسین ارزیابی نشد.

در اکثر بیماری‌های ایجاد شده توسط *S. aureus*، فاکتورهای متعددی در بیماریزایی دخیل هستند. تشخیص دقیق نقش هر فاکتور در ایجاد بیماری مشکل است. اما ایجاد ارتباط بین سویه‌های جدا شده از بیماران و بیان عوامل بیماریزایی مشخص، ممکن است مسیری را در پاتولوژی بیماری‌های خاص پیشنهاد کند. برای دستیابی به این هدف، کاربرد بیولوژی مولکولی در شناسایی فاکتورهای بیماریزایی، پیشرفت‌هایی در نتایج بیماری‌های ناشی از استافیلوکوک ایجاد خواهد کرد (۲٦). تشخیص ژن اختصاصی انتروتوکسین لزوماً توانایی میکروارگانیسم را در تولید توکسین با فعالیت بیولوژیکی بالا و کافی در بروز بیماری نشان نمی دهد (۲۵).

نتایج:

آنالیز PCR و شناسایی تعداد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس همراه با بررسی وجود ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی یک پایه و نمای کامل‌تر و صحیح برای آنالیز خطر می‌باشد، به گونه‌ای که فراوانی جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین نشان دهنده میزان خطر بیماریزایی در بیماران می‌باشد (۲۷). *S. aureus* کاملاً قادر به اکتساب عناصر ژنتیک متحرک رمز کنندهٔ انتروتوکسین‌های اختصاصی می‌باشد و این مسئله در پیشگیری و نیز کاربردهای تشخیصی اهمیت دارد (۱٦).

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از پرسنل سخت‌کوش آزمایشگاه تشخیص پزشکی بیمارستان شهید مطهری تهران و پرسنل محترم آزمایشگاه پاتولوژی مولکولی مرکز قلب تهران کمال تشکر و قدردانی بجا آورده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مراجع:

1. Ravathi G, Puri J, Jain BK. Bacteriology of burns. Burns 1998; **24**(4): 347-249.

2. Holder IA, Volpel K . "Studies on multiple pseudomonas aeroginosa isolated from individual burn patients by RFLP,O antigen serotyping and antibiogram analysis",Burn 1995; **21**(3): 441-44.

3. Robert P, Gaynes . *Surveillance of Nosocomial Infections*. In : John V. Bennett Philip S. Brachman , ed *, Hospital infection* , 4th ed, U.S.A. Lippincott- Roven 1998;PP: 65-84.

4. Bielecki A, Glik J, Kawecki M, Martinsdos santos , VAP. Towards understanding pseudomonas aeruginosa burn wound infections by profiling gene expression. Biotechnol lett 2008; **30**: 777-90.

5. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol 2000; **61**:1-10.

6. Lawrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus strains isolated from nasal carriers and food samples. International Journal of Food Microbiology 2007; **117**: 319-323

7.Wang SC, Wu CM, Xia SC, QI YH, Xia LN, Shen JZ. Distribution of superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major diary production regions of China. Veterinary Microbiology 2009; **137**: 276-81.

8.Tomi NS, Kra¨nke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis,atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. J Am Acad Dermatol 2005; **53**: 67-72.

9. Shuiep ES, Kanbar T, Eissa N, Alber J, lammler C, Zuchock M. Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococcus aureus isolated from raw camel milk samples. Research in veterinary science 2009; **86**: 211-215.

10. 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 2005; **246** : 191-198.

11. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk.Int.J. Food Microbiol 1988; **7**: 311-16.

12.Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R,Vimercati C, *et al*. Development of a Multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol Cell Probes 2005; **19**: 299-305.

13. Edwin C, Tatini SR, Maheswaran SK. Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C1, D, and E. Appl Environ Microbiol 1986; **52**: 1253-1257.

14.Van Belkum A, Molecular diagnostics in medical microbiology: yesterday, today and tomorrow. Curr Opin Pharmacol 2003; **3**(5): 497-501.

15. Anvari Sh, Sattari M, Forozandehe-Moghadam M, Najar Peerayeh Sh, Imanee-Fouladi AA. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to E from clinical sample by PCR. Res J Biol Sci 2008; **3**(8): 826-29.

16. Fischer A, Francois P, Holtfreter S, Broeker B, Schrenzel J. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in Staphylococcus aureus. Journal of Microbiological Methods 2009; **77**: 184-90.

17. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning* : *a Laboratory manual*. 3th ed, New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; PP: 5-14

18. Savas L, Duran N. Prevalence of MRSA in ICU in a university hospital. Europ J Gener Med 2005; **2**: 20-26.

19. Imanifooladi AA, sattari M, Najar Peerayeh Sh, Hassan ZM, Hossainidoust SR. Detection The Staphylococcus aureus Producing Enterotoxin Isolated from Skin

Archive of SID

www.SID.ir

Infections in Hospitalized Patients. Pakistan Journal of Biological Sciences 2007; **10** (3): 502- 5.

20. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol 2003; **41**: 1434-39.

21. Ferry T,Thomas D, Genestier A, Michele B, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Comparative prevalence of superantigen genes in Staphylococcus aureus isolates causing sepsis with and without septic shock. Clin Infect Dis 2005; **41**:771-77.

22.Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, *et al*. Occurrence characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology 2007; **115**: 290-296

23. Nashev D, Toshkova K, Bizeva1 L, Akineden O, La¨mmler C, Zscho¨ck M. Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of Staphylococcus aureus. Letters in Applied Microbiology 2007; **45**: 681-685.

24. Akineden O, Ahmed Hassan A, Schneider E, Usleber E. Enterotoxigenic properties of Staphylococcus aureus isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology 2008; **124**: 211-216

25. Veras JF, Carmo LS,Tong LC, Shupp JW, Cummings Ch, Santos DA, *et al*. A study of the enterotoxigenicity of coagulasenegative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. International Journal of Infectious Diseases 2008; **12**: 410-15.

26. Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Riegel P, Ha€ıkou N, *et al*. Virulence factors produced by strains of Staphylococcus aureus isolated from urinary tract infections. Journal of Hospital Infection 2008; **68**: 32-38.

27. Poli1 A, Guglielmini E, Sembeni1 S, Spiazzi M, Dellaglio F, Rossi F, *et al*. Detection of Staphylococcus aureus and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. Letters in Applied Microbiology 2007; **45**: 529-343.

Archive of SID

www.SID.ir