مطالعه میزان شیوع ژن‌های آنتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش Multiplex PCR

مهرداد اثنی عشری[1*]، جلال شایق[2]، آیت الله نصرالهی عمران[3]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، تنکابن، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، استادیار گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، استادیار گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: meh.esna2000@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۱/۷/۲۶ پذیرش نهایی: ۹۱/۱۱/۲۴)

چکیده

با توجه به اهمیت آنتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس موجود در شیر به عنوان یکی از منابع عمده مسمومیت‌های غذایی، بررسی روش‌های متعدد جداسازی، شناسایی و دسته‌بندی این آنتروتوکسین‌ها ضروری است. در این مطالعه توصیفی ۷۵ نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاومیش برای بررسی وجود و حضور ژن‌های مربوط به آنتروتوکسین‌های معمول *استافیلوکوکوس آرئوس* با استفاده از روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین صورت که ابتدا DNA نمونه‌ها استخراج سپس برای اطمینان از استافیلوکوکوس بودن تمام نمونه‌ها به روش PCR مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که از این تعداد نمونه باکتریایی یک جدایه دارای هر دو باند آنتروتوکسین‌های *seb* و آنتروتوکسین *sec* بود و سه جدایه دیگر فقط دارای آنتروتوکسین *sec* بودند و ژن مربوط به آنتروتوکسین A در هیچکدام از جدایه‌ها شناسایی نشد. بر اساس نتایج این تحقیق میزان شیوع تنوع ژن‌های مربوط به آنتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جدا شده از شیر گاومیش در شهرستان تبریز پایین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس آورئوس*، ژن آنتروتوکسین، شیر گاومیش، Multiplex PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس یک گونه باکتریایی بسیار مهم مولد مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشد. این باکتری طیف وسیعی از ترشحات سمی را تولید می‌نماید. در میان سموم تولید شده آنتروتوکسین‌ها اهمیت بسزایی دارند (Shimi, 1996). این سموم پروتئین‌های محلول در آبی هستند که توسط سلول باکتری ترشح می‌شوند و به عنوان عامل استفراغ در مسمومیت‌های غذایی و گاستروآنتریت‌ها مطرح می‌باشند (Shivram et al., 1985). آنتروتوکسین

Archive of SID
www.SID.ir

استافیلوکوکوسی (SE) برخلاف آنتروتوکسین‌های کلاسیک مثل کلراتوکسین روی سلول‌های اپیتلیال عمل نکرده بلکه اثر استفراغزایی آنها به علت اثر روی عصب واگ و سمپاتیک است و بنابراین می‌توان سموم SE را بطور صحیح‌تر نوروتوکسین نامید (Soleimani Rahbar and Maleknejad, 2007).

در ابتدا ۵ سروتیپ از آنتروتوکسین‌ها تحت نام‌های A، B، C، D و E شناخته شده بودند (Quinn et al., 2003; Roberson et al., 1996). البته سروتیپ C تحت گونه‌های کوچک‌تری به نام C_1، C_2 و C_3 را نیز دارد. به دنبال آن سروتیپ دیگری تحت نامF معرفی شده است که بعداً مشخص شد که همان توکسین TSST-1 است و بعد از آن هم سروتیپ‌های H وG و اخیراً سروتیپ I گزارش گردیده‌اند. از میان این آنتروتوکسین‌ها، آنتروتوکسین‌های A، B، C، D و E، آنتروتوکسین معمول یا کلاسیک نامیده می‌شوند. آنتروتوکسین A بیش از همه تولید می‌شود (Aragon-Alegro et al., 2007). سویه‌های آنتروتوکسین‌زای *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌توانند یک یا چندین نوع از توکسین‌هایی را که از نظر سرولوژیکی متفاوت هستند هم‌زمان تولید کنند. روش استاندارد برای تشخیص سموم SE و پی بردن به وجود آنها در مواد غذایی راه‌های ایمونولوژیکی، بیولوژیکی و سرولوژیکی می‌باشد. با این وجود روش‌های مولکولی برای تشخیص ژن‌های مولد سموم SE نیز به طور گسترده‌ای توسعه یافته‌اند. در این میان روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR از اهمیت فراوانی برخوردارند. تا امروزه حدود چند روش مولتی پلکس PCR متفاوت برای شناسایی آنتروتوکسین‌های کلاسیک باکتری پیشنهاد شده است (Baron et al., 1994; Borelli et al., 2006; Iandolo, 1989; Shivram et al., 1985). از میان این روش‌ها روش پیشنهادی Mehrotra و همکاران دارای کاربرد فراوان‌تری است.

با توجه به اهمیت شیر گاومیش که دومین شیر مصرفی جهان و به ویژه آسیا بعد از شیر گاو محسوب می‌شود و نیز مصرف بسیار آن در کشورمان اهمیت بررسی ژن‌های مولد آنتروتوکسین‌های استافیلوکوک‌های جدا شده از شیر گاومیش را بسیار افزایش می‌دهد هدف از این مطالعه بررسی فراوانی و تنوع ژن‌های مولد آنتروتوکسین در *استافیلوکوکوس آرئوس* های جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش مولتی پلکسPCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

تعداد ۷۵ باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده ازشیر گاومیش که قبلاً از سطح دامداری‌های سنتی شهرستان تبریز جمع‌آوری شده بود تهیه و به عنوان نمونه‌های مورد استناد در این مطالعه استفاده شد. بر روی کلیه نمونه‌ها آزمایش‌های کامل بیوشیمیایی انجام شده و تعلق آنها به گونه *استافیلوکوکوس آرئوس* اثبات شده است.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۷۵ نمونه کشت داده شده در محیط آبگوشت قلب- مغز انجام شد. یک میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی در دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از ریختن بافر لیز کننده شامل تریس ۱ مولار(pH= ۷/۵)، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار،C-TAB ۲ درصد بر

www.SID.ir

روی رسوب مخلوط در دمای ٦٥ درجهٔ سلسیوس به مدت دو ساعت در بن ماری قرار داده شده و سپس ویال‌های حاوی سلول‌های لیز شده به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل با نسبت‌های ۱:۲٤ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال و برداشتن لایهٔ رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها را برداشته و هم حجم آنها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد. با سانتریفیوژ در دور g ۱۲۰۰۰ ، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید.

انجام PCR برای ژن نوکلئاز

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/٤ میکرومولار (جدول ۱) و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر(۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ٤ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و با استفاده از ژل داکیومنت عکس‌برداری انجام گرفت.

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR جهت تشخیص ژن نوکلئاز

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند	منبع
nuc	NucF NucR	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTI-3' 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'	۲۷۵	Brakstad et al., 1992

انجام مولتی پلکس PCR برای ژن‌های آنتروتوکسین

در این مطالعه روش تعیین حضور آنتروتوکسین‌های کلاسیک با استفاده از مولتی پلکس PCR طراحی شده توسط Mehrotra وهمکاران (۲۰۰۰) به انجام رسید. این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از پرایمرهای *see*، *sed*، *sec*، *seb* و *sea* برای باکتری‌ها انجام شد که توالی پرایمرهای اختصاصی در جدول ۲ آورده شده است. کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی۰/٤ میکرومولار وDNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر(۵۰ نانوگرم) مخلوط واکنش را تشکیل می‌دادند. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ٤ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه

Archive of SID
www.SID.ir

بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس بـه مـدت ۱۰ دقیقـه انجـام شـد. محصـولات حاصـله در آگـارز ۱/۵ ٪ الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنـت مـورد عکس‌برداری قرار گرفت.

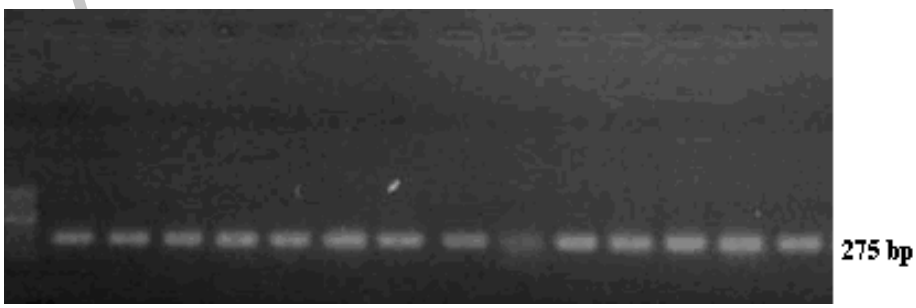
جدول۲- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR جهت تشخیص ژن‌های کلاسیک آنتروتوکسین

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند	منبع
sea	GSEAR-1 GSEAR-2	F; GGTTATCAATGTGCGGGTGG R; CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	۱۰۲	Mehrotra et al., 2000
seb	GSEBR-1 GSEBR-2	F; GTATGGTGGTGTAACTGAGC R; CCAAATAGTGACGAGTTAGG	۱٦٤	Mehrotra et al., 2000
sec	GSECR-1 GSECR-2	F; AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG R; CACACTTTTAGAATCAACCG	٤٥١	Mehrotra et al., 2000
sed	GSEDR-1 GSEDR-2	F; CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG R; ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	۲۷۸	Mehrotra et al., 2000
see	GSEER-1 GSEER-2	F; AGGTTTTTTCACAGGTCATCC R; CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	۲۰۹	Mehrotra et al., 2000

یافته‌ها

واکنش PCR برای تأیید گونه آرئوس

ژن نوکلئاز باکتری‌ها با استفاده از جفـت آغازگرهـای ذکر شده در مواد و روش‌ها طی واکنش زنجیره‌ای پلـی مراز تکثیر داده شد (شکل ۱). محصـولات تکثیـری بـا اندازه‌ی تقریبی ۲۷۵ جفت نوکلئوتید و به صورت تـک نوار حاصل شدند. بـرای نشـان دادن انـدازه‌ی قطعـات تکثیـری از bp DNA Ladder ۱۰۰ اسـتفاده شـد. همـه ایزوله‌های جداسـازی توسـط تکثیـر ژن نوکلئـاز مـورد تأیید قرار گرفتند.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های ۳۵تا ۶۰ جداسازی شده از شیر گاومیش

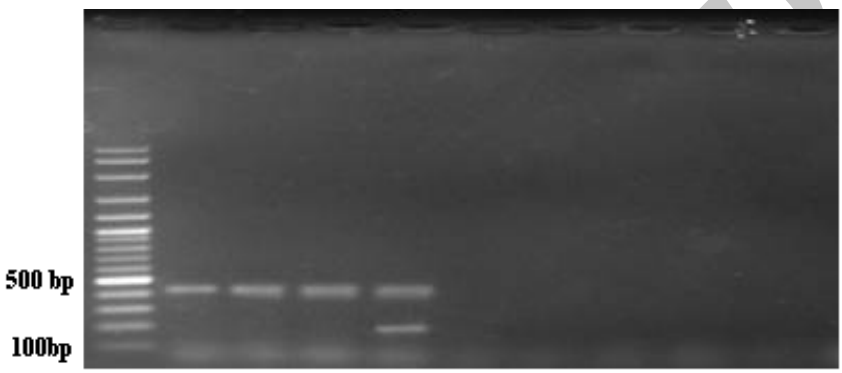
Archive of SID

www.SID.ir

Multiplex PCR برای حضور ژن‌های آنتروتوکسین

نتایج مربوط به مولتی پلکس PCR در شکل ۲ نشان داده شده است، حضور باند ۱٦٤ bp نشانگر وجود ژن *seb*، حضور باند به اندازه ٤٥١ bp نشانگر ژن *sec*، حضور باندهای ۱۰۲ bp و ۲۷۸bp و ۲۰۹ bp به ترتیب نشانگر حضور توکسین‌های *see*، *sed* و *sea* در نمونه‌های مورد آزمایش‌اند.

از میان ۷۵ جدایه مورد مطالعه یک جدایه دارای هر دو باند ۱٦٤ و ٤٥١ جفت بازی یعنی دارای *seb* و *sec* بوده و سه نمونه با حضور باند ٤٥١ bp دارای آنتروتوکسین *sec* بودند.



شکل ۲-الکتروفورز محصول مولتی پی سی ار در آگارز ۱/۵ درصد

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه بر روی مسمومیت‌های غذایی با منشا *استافیلوکوکوس آرئوس* به قرن ۱۹ باز می‌گردد (Abbar, 2010)، زمانی که به نظر می‌رسید شیر و فرآورده‌های آن اهمیت زیادی در خصوص چنین مسمومیت‌ها دارند. بیشتر مطالعات آلودگی شیر را در مقایسه با سایر فرآورده‌های آن پائین‌تر گزارش می‌کنند اعتقاد بر این است که میزان آلودگی فرآورده‌های شیر بدلیل آلودگی‌هایی است که در طی فرآیند تولید آنها اتفاق می‌افتد (Bennet, 1986).

تا کنون چندین مطالعه در خصوص میزان آلودگی شیر گاو به انواع ژن‌های مولد آنتروتوکسین توسط *استافیلوکوکوس آرئوس* در دنیا و نیز در کشور ما انجام پذیرفته است (Gilmour et al., 1990; Rahimi, 2011). ولی تاکنون مطالعات مشابه اندکی در خصوص فراوانی آلودگی در شیر گاومیش به انواع آنتروتوکسین‌های تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده بطوری‌که مطالعه مستقلی در این خصوص وجود ندارد (Rahimi, 2011).

چندین تحقیق مشابه بر روی نمونه‌های گاوی در دنیا انجام گرفته که به برخی از آنها اشاره می‌شود:

مطالعه‌ای توسط رحیمی و همکاران بر روی شیر گوسفند، بز و گاومیش در استان‌های اصفهان، چهار محال بختیاری و خوزستان انجام گرفت که درصد آلودگی شیر گاومیش را بالاتر یعنی۱۵/۸ درصد گزارش کرده است (Rahimi, 2011).

Archive of SID
www.SID.ir

پژوهش دیگر صورت گرفته توسط Gilmour نشان داد که ٦-٣/٩ درصد از سویه‌های جدا شده از شیر گاوهای طبیعی قدرت تولید آنتروتوکسین دارند (Gilmour et al., 1990).

نتایج مطالعات دیگر توسط Morandi و همکاران و Normanno و همکاران در ایتالیا نشان دادند که درصد بالایی از سویه ها که از گاو جدا شدند *SEA* و *SED* را تولید می‌کنند در حالی‌که سویه‌های جدا شده از بز و گوسفند *SEC* را تولید می‌کنند (Morandi et a l.,2007; Normanno et al., 2005).

درمطالعه دیگری که توسط Ghaleb Adwan و همکاران در فلسطین بر روی آنتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* انجام گرفت مشاهده شد که از ١٠٠ نمونه *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده (٥٢ نمونه از شیر گوسفند و ٤٨ نمونه از شیر گاو)، ٣٧ نمونه (٣٧٪) دارای ژن‌های *SE* بودند. هیچ‌کدام از نمونه‌های آنتروتوکسین *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده، حامل بیش از ١ ژن توکسین نبودند. بیشتر آنتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده در مطالعه فوق شامل آنتروتوکسین‌های *SEC*، *SEA* و یا *SED* بودند (da Silva et al., 2005).

درمطالعه دیگری که بر روی ژن‌های آنتروتوکسین *استافیلوکوکوس آرئوس* از ورم پستان گاو و مخزن ذخیره شیر در ایتالیا انجام گرفت، ژن‌های *sei*، *seg*، *sed* و *sea* گزارش شده است (Andrea,. 2004).

درمطالعه دیگری که در اصفهان توسط Rahimi و همکاران بر روی جستجوی آنتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس آرئوس* در شیر خام گاو به روش الایزا انجام گرفت، نتایج زیر مشاهده شدند: برای این هدف ٧٢ نمونه شیر از تانک‌های ذخیره شیر از ١٢ جایگاه حیوانات اهلی شیرده در طی ٣ فصل مختلف (زمستان، بهار، تابستان) جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار دادند که از ٧٢ نمونه، ١٥ نمونه (٢٠/٨٪) مثبت برای حداقل SE 1 می‌باشد (Rahimi, 2011).

در این مطالعه از تعداد ٧٥ جدایه *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از گاومیش مورد مطالعه، ٤ جدایه(٥/٤ ٪) حاوی حداقل یک ژن مربوط به آنتروتوکسین بودند. اگرچه در مطالعه‌ای که توسط Rahimi و همکاران بر روی شیر گوسفند، بز و گاومیش در استان‌های اصفهان، چهار محال بختیاری و خوزستان به روش الایزا انجام شده درصد آلودگی شیر گاومیش بالاتر یعنی١٥/٨ درصد گزارش شده است. البته روش الایزا می‌تواند آنتروتوکسین‌های تولیدی را نشان دهد و احتمالاً می‌بایست فراوانی ژن‌های مولد تولید آنتروتوکسین بیش از این باشد. با این وجود بدلیل حجم کم نمونه‌های گاومیشی مطالعه مذکور (١٩ نمونه) نیاز به مطالعه دیگری با حجم نمونه بالاتر و روش قابل مقایسه‌تر جهت مقایسه نتایج لازم می‌باشد (Rahimi, 2011).

مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعاتی که در خصوص میزان حضور ژن‌های مولد آنتروتوکسین در خصوص شیر گاو انجام شده و گاه تا ٢٠ درصد نیز شیوع آن گزارش گردیده است میزان اندکی را گزارش می‌نماید (Rahimi,. 2011). شاید یکی از دلایل آن نیز به میزان دخالت اندکی برگردد که در خصوص شیر گاومیش انجام می‌گیرد. البته مطالعات دیگری نیز وجود دارند که این میزان را تا ٤ درصد گزارش کرده اند (Gilmour et al., 1990)

www.SID.ir

در مطالعه حاضر از تعداد ٤ نمونه سه نمونه دارای انتروتوکسین نوع *Sec* و یک نمونه علاوه بر این آنتروتوکسین همزمان حاوی ژن *Seb* نیز بود. البته این امر در نوع خود چیز تازه ای نیست چراکه *Sec* عمدتا از منشا حیوانی جدا می شود و *Sea* که غالبا نسبت به بقیه توکسین ها فراوانتر جدا می گردد بیشتر منشا انسانی دارد.این امر خود به کم بودن میزان دستکاری انسانی در خصوص شیر گاومیش صحه می گذارد. مطالعات مختلف در خصوص شیر گاو میزانSea را بیشتر گزارش کرده اند(Gilmour et ,Ebrahim,. 2011 al. 1990). این میزان در مطالعه Rahimi و همکاران تا ۱۲/۵ درصد گزارش شده است (Rahimi, 2011). بررسی تولید آنتروتوکسین توسط Gilmour و همکاران در خصوص شیر گاو نشان می‌دهد که ۸۰٪ ژن‌ها از نوع *sea* و ۳۳٪ ژن‌ها از نوع *seb* می‌باشند (Gilmour et al., 1990). مطالعات دیگر در ایران این میزان را در شیر گاو برای آنتروتوکسین‌های *sea*، *seb*، *seb+sea* به ترتیب ۱۵/٦، ۹/۳ و ٦/۲ درصد گزارش نموده است (Ahari et al., 2008). تحقیقات مشابه در کشور ما بر روی شیر و فرآورده‌های آن و شیر به گزارش آنتروتوکسین‌های *sec*، *seb*، *sea* و *see* انجامیده که سهم *sea* از این شیوع بیشتر است (Ahari et al., 2008). این امر احتمالاً به علت ارتباط بیشتر فرآورده‌های شیری و شیر گاوی با منابع آلودگی ثانویه به ویژه منابع حیوانی مربوط می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایاننامه دوره کارشناسی ارشد نویسنده اول است که بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- سلیمانی رهبر، ع.ا. و مالک نژاد، پ. (۱۳۸٦). اصول میکروب شناسی دامپزشکی و بیماری‌های میکروبی، انتشارات دانشگاه تهران.
- شیمی، ا. (۱۳۷٦). باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی، مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی، صفحات: ۹٤-۸۵.

- Abbar, M. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 2(3): 137-142.
- Ahari, H., Shahbazzadeh, D., Misaghi, A. and Pourshafie, M. (2008). Detection and Antibiogram of *Staphylococcus aureus* in Non Pasteurized Milk Samples from Tehran Province Restricts And Compare to Bacterial Culture. Journal Veterinary Research, 63(5): 321-326.
- Andrea, S., Leonardo, A., Maria, C.F., Cosima, A., Christoph, L. and Roberto, R. (2004). Occurrence of enterotoxin genes and macrorestriction analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and bulk-tank milk amples in Italy. An epidemiological study. Italian Journal, 3: 47-53.
- Aragon-Alegro, L.C., Konta, E.M., Suzuki, K., Silva, M.G., Fernandes Junior, A., Raal, R. and Rall, V.L.M. (2007). Occurrence of coagulase positive Staphylococcus in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. Food Control, 18: 630-634.

Archive of SID
www.SID.ir

- Baron, E.J., Peterson, L.R. and Finegold, S.M. (1994). Baily and Scotts Diagnostic Microbiology, 9th Edition, Mosbey-Pear book, Inc, pp. 321-332.
- Bennet, R.W. (1986). *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. Journal of Food science, 51: 1337-39.
- Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Santos, D.A., Carmo,L.S., Dias, R.S., Silva, M.C.C. (2006). Enteroxigenic Staphylococcus spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 545-550.
- da Silva, E.R., do Carmo, L.S. and da Silva, N. (2005). Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in Staphylococcus aureus from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. Veterinary Microbiology, 106: 103-107.
- Rahimi, E., Mommtaz, H., Shakerian, A., Kavyani, H.R. (2012). The detection of classical enterotoxins of staphylococcus aureus in raw cow milk using the ELISA method. Turk. J. 36(3): 319-322.
- Gilmour, A. and Harvey, J. (1990). Staphylococci in milk and milk products. Journal of Applied Microbiology, 147s-166s.
- Iandolo, J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. Annual Reve Microbiology, 43: 375-402.
- Kapur, V., Sischo, W.M., Greer, R.S., Whittam, I.s. and Musser, J.M. (1995). Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Journal of Clinical Microbiology, 33(2): 376-380.
- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin Resistance. Journal of Clinical Microbiology, 38: 1032-1035.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. Veterinary Microbiology, 124: 66-72.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C. and Celano, G.V. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, 98(1): 73-79.
- Rahimi, E. (2011). Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in raw sheep, goat, camel, and water buffalo milk by ELISA method. Comparative clinical pathology, 1383-4.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M. and Besser, T.E. (1996). Prevalence of coagulase-Posittive staphylococci other than *staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. American Journal of Veterinary Research, 57(1): 54-58.
- Shimi, A. (1996). Veterinary bacteriology and bacterial disease, Jahad publishing. pp, 85-94 [In Farsi].
- Shivram, S. and kelar, S.S. (1985). Compartire Study of markers of pathogenic staphylococci. Indian Journal of Medical Research, 82: 194.
- Soleimani Rahbar, A.K. and Maleknejad, P. (2006). Medical Microbiology. Tehran University Press [In Farsi].
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2003). Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell publishing.

Archive of SID

www.SID.ir