

“Short Communication”

DOI: 10.30495/JFH.2021.1920855.1305

Polymorphism of *aroA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and traditional cheese

Hosseinkani, A.¹, Monadi, A. R.^{2*}, Shayegh, J.³

1. Graduated Student, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

2. Associate Professor of Microbiology, Department of Laboratory Sciences, The School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

Corresponding author: info@drmonadi.ir

(Received: 2021/1/17 Accepted: 2021/3/17)

Abstract

Due to the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* and its presence in dairy products and the importance of its transmission through dairy products, this study aimed to analyze the *aroA* gene in *S. aureus* isolated from cow milk and traditional cheese. For this purpose, 40 *S. aureus* isolates including 14 traditional cheese isolates, 19 cow milk isolates, and 7 domestic water buffalo milk isolates were assayed by the PCR-RFLP technique. After amplification of the coagulase gene with specific primers, enzyme restriction was performed using the TaqI enzyme. The amplification of *aroA* produced an 1153 bp band. Digestion of this band with TaqI enzyme showed 3 different cutting patterns. The first pattern consisted of three bands, the second pattern had two bands, and the third pattern consisted of four bands. 29 *S. aureus* isolates (out of 40) held the highest number containing the *aroA* gene with the three-band pattern, 9 samples with the two-band pattern, and 2 samples with the 4-band pattern. Since the method is unable to distinguish between strains with different food origins, it should be replaced by complementary methods. The results indicated the need to pay more attention to health points in the preparation of dairy foods and also more attention of local veterinarians in dealing with this pathogen and choosing the appropriate treatment approach for it.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Dairy products, TaqI enzyme, *Staphylococcus aureus*, *aroA*, PCR-RFLP

DOI: 10.30495/JFH.2021.1920855.1305

(مقاله کوتاه)

پلی مورفیسم ژن *aroA* در استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از شیر خام و پنیر سنتیعزیزه حسین خانی^۱، علیرضا منادی^{۲*}، جلال شایق^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
 ۲. دانشیار میکروبیولوژی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۳. استادیار گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
- * نویسنده مسئول مکاتبات: info@drmonadi.ir
(دریافت مقاله: ۹۹/۱۰/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۹/۱۲/۲۷)

چکیده

با توجه به بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس و حضور آن در مواد لبنی و اهمیت انتقال این باکتری به واسطه مواد لبنی، هدف از این مطالعه آنالیز ژن *aroA* در استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از شیر گاو و پنیر سنتی است. بدین منظور تعداد ۴۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس شامل ۱۴ جدایه از پنیر سنتی، ۱۹ جدایه از شیر گاو و ۷ جدایه از شیر گاو میش به روش PCR-RFLP مورد آزمایش قرار گرفتند. برش آنزیمی پس از تکثیر ژن کوآگولاز با پرایمرهای اختصاصی، با استفاده از آنزیم TaqI به عمل آمد. نتیجه تکثیر شده برای ژن *aroA* تولید باندهای با اندازه ۱۱۵۳ جفت باز بود. هضم باند مذکور با آنزیم TaqI سه الگوی مختلف برش از ژن مورد نظر نمایش می‌داد. الگوی اول شامل سه باند، الگوی دوم دو باند و الگوی سوم چهار باند بودند. از ۴۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه در این پژوهش تعداد ۲۹ نمونه حاوی ژن *aroA* با الگوی سه باندهای، ۹ نمونه با الگوی دو باندهای و ۲ نمونه الگوی ۴ باندهای بودند. با توجه به این که این روش قادر به تشخیص تفاوت بین سویه‌های با منشأ غذایی مختلف نیست، لازم است با روش‌های مکمل جایگزین شود. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان‌دهنده نیاز به توجه بیشتر به نکات بهداشتی در تهیه مواد غذایی حاصل از مواد لبنی و نیز توجه بیشتر دامپزشکان در برخورد با استافیلوکوکوس اورئوس و انتخاب رویکرد درمانی مناسب برای آن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مواد لبنی، آنزیم TaqI، استافیلوکوکوس اورئوس، PCR-RFLP *aroA*

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری و بی‌حرکت و بدون اسپور و به شکل خوشه‌ای با کلنی زرد طلایی است. این باکتری ممکن است به شکل فلور طبیعی پوست یا بینی وجود داشته باشد، هم‌چنین به‌عنوان یکی از موفق‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا است. این باکتری با بیان انواع مختلف عوامل حدت پیکری و ترش‌چی گستره وسیعی از عفونت‌های ساده پوستی مانند از فولیکولیت، کورک، کفگیرک، گل‌مژه، آبسه، گرفته تا بیماری‌های مهم‌تر مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی‌سمی و مسمومیت‌های غذایی را ایجاد می‌نماید (Stepan et al., 2004).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که همیشه دسته‌های محدودی از سویه‌های متنوع باکتری‌ها در ایجاد بیماری در انسان و دام نقش ایفا می‌کنند و این امر می‌تواند یکی از دلایل نیاز به مطالعه ژنتیکی در میان سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس، برای مشخص کردن چنین جمعیت‌هایی باشد (Smith et al., 2004; Sung et al., 2008). این جمعیت‌ها را می‌توان با روش‌های انگشت‌نگاری DNA (DNA finger printing) شناسایی نمود. این روش‌ها شامل آنالیز DNA توسط آنزیم‌های مختلف برشی، (Multilocus sequence typing)، MLST (Pulse Field Gel Electrophoresis)، PFGE و MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) روش‌های مبتنی به آنالیز ژن‌هایی چون ژن کوآگولاز، ژن *aroA* و *spa* بر اساس آنزیم‌های برشی محدود‌ال‌اثر (Restriction enzyme) هست (Shayegh et al., 2013; Galal et al., 2021).

ژن *aroA* از جمله ژن‌هایی که آنالیز آن می‌تواند علاوه بر ارزش تشخیصی سویه‌های مختلف به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در فرآیند مطالعات اپیدمیولوژیکی بر پایه تنوع ژنتیکی راه‌گشا باشد. این ژن مولد آنزیمی بنام EPSP synthase از آنزیم‌های دخیل در مسیری است که به ساخت اسیدهای آروماتیک می‌انجامد (de Oliveira et al., 2020). با توجه به این که ژن *aroA* در تمام استافیلوکوکوس اورئوس‌ها حضور دارد، می‌توان از ژن مذکور در مطالعه تنوع ژنتیکی در استافیلوکوکوس‌ها استفاده نمود (Marcos et al., 1999)، که البته قبل از استافیلوکوکوس اورئوس ژن مذکور در هموفیلوس‌ها و اکتینوباسیلوس‌ها و نیز آئروموناس‌ها و گونه‌های دیگر، بدین منظور مورد استفاده قرار گرفته بود. پس از برخی تحقیقات (Marcos et al., 1999; El-Huneidi et al., 2006; Saei et al., 2010) ژن *aroA* را به‌عنوان یک ابزار تعیین ژنوتیپ در جمعیت‌های استافیلوکوکوس اورئوس به کار بردند. در برخی تحقیقات نیز از این ژن، برای بررسی تنوع مولکولی در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاو میش بهره بردند (Shayegh et al., 2013). با توجه به اهمیت بیماری‌زایی این باکتری و حضور آن در مواد لبنی، هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های جدا شده از مواد لبنی و مطالعه اپیدمیولوژیکی در درون آن با آنالیز ژن *aroA* می‌باشد.

مواد و روش کار

- نمونه‌ها

تعداد ۴۰ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از پنیر سنتی (۱۴ نمونه)، شیر گاو (۱۹ نمونه) و شیر

دقیقه در دمای ۲۰- قرار گرفت. با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g DNA ترسیب و با قرار دادن میکروتیوب‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک‌شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید. سپس حدود ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت، کیفیت باندها زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت و نمونه DNA هایی که کیفیت باندهای آن‌ها خوب بودند، انتخاب شدند (Shayegh et al., 2013).

- انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمر از برای ژن *aroA*

واکنش PCR از در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل کیت مستر 2x PCR به مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/۴ میکرومولار (جدول ۱) و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش PCR با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ 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 درصد الکتروفورز و با استفاده از ژل داکيومنت عکس‌برداری انجام گرفت.

گاومیش (۷ نمونه) از شهرستان تبریز، به‌عنوان نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شد. روی کلیه نمونه‌ها آزمایش‌های کامل بیوشیمیایی انجام شد و جهت حصول اطمینان بیشتر با استفاده از PCR بر پایه ژن نوکلئاز (nuc) تعلق آن‌ها به گونه استافیلوکوکوس اورئوس اثبات شد (Saei et al., 2010; Grossmann et al., 2021).

- استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های کشت داده شده در محیط آبگوشت قلب-مغز انجام شد. یک میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی در دور ۱۰۰۰۰ g 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 روی رسوب، مخلوط در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت در بن ماری قرار داده شد و سپس میکروتیوب‌های حاوی سلول‌های لیز شده به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ و مایع رویی به میکروتیوب دیگر منتقل و هم‌حجم آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل با نسبت‌های ۱:۲:۴ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در میکروتیوب و برداشتن لایه رویی و انتقال به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، مقدار هم‌حجم محتوای تیوب، ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵

جدول (۱) - پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

منبع	توالی	نام ژن
Seiberling <i>et al.</i> 2013	F: 5'-AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC-3' R: 5'-CAC AAG CAA CTG CAA GCA T-3'	<i>aroA</i>

آمد. واکنش‌های هضم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از آگارز ۲ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و عکس برداری انجام شد (جدول ۲).

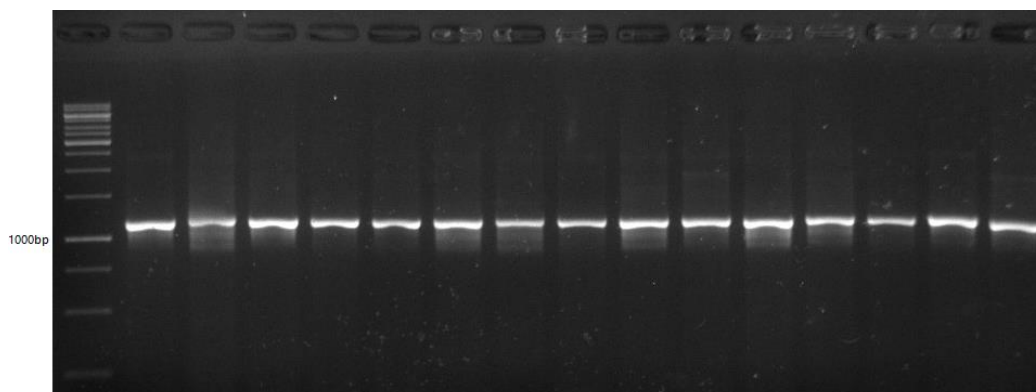
- برش آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن *aroA*
برش آنزیمی پس از تکثیر ژن *aroA* با پرایمرهای اختصاصی، با استفاده از آنزیم‌های برشی، اجرا شد. نوع آنزیم برشی بر اساس جایگاه برشی موجود در مقالات انتخاب شد. برای هر محصول PCR، دو واکنش هضم به‌طور جداگانه با آنزیم TaqI (Fermentas) به عمل

جدول (۲) - ترکیبات آنزیم هضمی ژن *aroA*

ماده	حجم
Enzyme: TaqI	۱/۵ میکرولیتر
Enzyme buffer	۱/۵ میکرولیتر
PCR product	۵ میکرولیتر
dH2O	۷ میکرولیتر

- نتایج انجام واکنش PCR برای ژن *aroA*
ژن *aroA* با استفاده از جفت آغازگرهای ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها طی واکنش PCR از تکثیر داده شد که در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طوری که در شکل (۱) مشاهده می‌شود محصولات تکثیری با اندازه تقریبی ۱۱۵۳ جفت نوکلئوتید حاصل شدند.

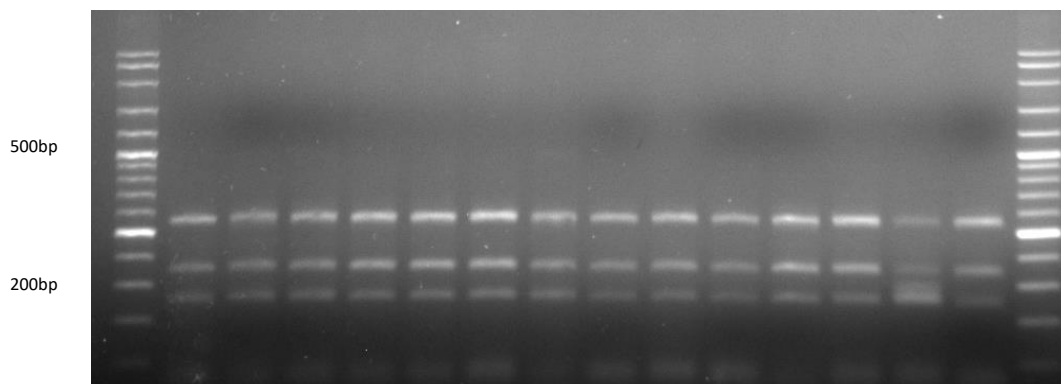
یافته‌ها
بر اساس نتایج به دست آمده از تکثیر ژن nuc تمامی ۴۰ نمونه مورد آزمایش از نظر حضور باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد تایید قرار گرفتند.



شکل (۱)- نمونه الکتروفورز محصول PCR ژن *aroA* جداسازی شده از شیر گاومیش

آنزیم TaqI به عمل آمد. نتایج حاصل ۳ الگوی مختلف برش از ژن مورد نظر نمایش می‌دهد. الگوی اول شامل سه باندها، الگوی دوم دو باندها و الگوی سوم چهار باندها بودند.

- نتایج انجام برش آنزیمی برای ژن *aroA* با استفاده از آنزیم TaqI، در شکل (۲) نشان داده شده است. برای هر محصول PCR، دو واکنش هضم به‌طور جداگانه با



شکل (۲)- نمونه الکتروفورز محصول حاصل از برش ژن *aroA* با استفاده از آنزیم برشی

مطالعه در این پژوهش تعداد ۲۹ نمونه یعنی بیشترین تعداد حاوی ژن *aroA* با الگوی سه باندها (تیپ A)، ۹ نمونه با الگوی دو باندها (تیپ B)، ۲ نمونه با الگوی چهار باندها مشاهده شد (جدول ۳).

با توجه به این که واکنش‌های PCR برای تمام نمونه‌ها نتیجه مثبت داشتند، کنترل منفی در این بررسی مورد استفاده قرار نگرفت (عدم وجود منفی کاذب در این بررسی). مطابق روش تعیین تیپ به‌واسطه ژن *aroA* از ۴۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد

جدول (۳) - منبع جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس و الگوهای باندهای تولید شده

منبع جداسازی	تعداد باندهای تولیدی			جمع
	الگوی اول ۳ باند (تیپ B)	الگوی اول ۲ باند (تیپ A)	الگوی اول ۴ باند (تیپ N)	
پنیر	۱۱	۳	۰	۱۴
شیر گاو	۱۴	۴	۱	۱۹
شیر گاو میش	۴	۲	۱	۷
جمع	۲۹	۹	۲	۴۰

بحث و نتیجه گیری

تنوع ژنتیکی در ژن‌ها احتمالاً بازتابی از موتاسیون‌های نقطه‌ای است که در ساختار آنزیمی این ژن‌ها حادث می‌شود. ژن *aroA* نیز از این قاعده مستثنا نیست. این موتاسیون‌های نقطه‌ای در مواردی با تغییراتی در باکتری همراه می‌گردند که این تغییرات احتمالاً می‌توانند باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی در باکتری‌ها شوند. به طوری که برخی محققین گزارش کردند که این تنوع ژنتیکی در ژن *aroA* می‌تواند گاه باعث تغییر در میزان ماندگاری باکتری در میزبان‌های مختلف گردیده و توانایی آن‌ها را در زنده ماندن باکتری در ریه، طحال و غدد پستانی موش‌ها کاهش دهد (Buzzola et al., 2006). هم‌چنین مطالعات نشان دادند که دسته‌های خاصی از سویه‌های متنوع این باکتری بر اساس تنوعی که در ژن *aroA* دارند می‌توانند با بیماری ارتباط داشته باشند (Marcos et al., 1999; El-Huneidi et al., 2006).

روش بررسی به کار برده شده طی این تحقیق با توجه به دقت و صحت نتایج در این نوع تست (PCR)، در مطالعات سال‌های اخیر توسط محققین حوزه میکروبیولوژی مواد غذایی بخصوص در صنایع لبنی برای تشخیص و جداسازی این باکتری مورد توجه قرار

گرفته است. به عنوان مثال در بررسی مشابهی که در کشور مصر انجام گرفته است نیز از همین تکنیک استفاده شده است (Zeinhom et al., 2021). در مطالعات پیشین، بر اساس تنوع ژنتیکی ژن *aroA* به روش برش با آنزیم محدودگر TagI، چهار الگوی برش حاصل شده بود که به ترتیب الگوهای ژنتیکی A، B، C و D نامیده می‌شدند (Marcos et al., 1999; El-Huneidi et al., 2006). در مطالعات بعدی یک گروه جدید دیگر بنام H نیز بدین جمع اضافه گردید (Saei et al., 2010). هم‌چنین محققین دیگری نیز در مطالعه‌ی خود یک الگوی ژنوتیپی جدید دیگر تحت عنوان N به این لیست افزودند (Shayegh et al., 2013). محققین پیشین پیشنهاد می‌نمایند که در سویه A و B که در میان سویه‌های دیگر از فراوانی بالاتری برخوردارند و در مقایسه با سویه‌های دیگر از اهمیت واگیری بیشتری برخوردار باشند (Saei et al., 2010). برخی محققین نیز احتمال داده‌اند که با توجه به مطالعات گذشته، سویه‌های D و C با جدایه‌های انسانی و سویه‌های A و B بیشتر با جدایه‌های دامی در ارتباط باشند (Shayegh et al., 2013).

در مطالعه حاضر میزان فراوانی تیپ B در مقایسه با سایر الگوها بالاتر است نشانگر فراوانی این سویه در

خطرات بهداشتی موجود در شیر خام و پنیرهای سنتی منطقه تبریز در حضور استافیلوکوکوس اورئوس باشد که نشان دهنده نیاز به توجه بیشتر به نکات بهداشتی در تهیه مواد غذایی حاصل از مواد لبنی و نیز توجه بیشتر دامپزشکان ناحیه در برخورد با این عامل پاتوژن و انتخاب رویکرد درمانی مناسب برای آن می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

میان فرآورده‌های دامی و احتمالاً جمعیت‌های دامی منطقه دارد. شیوع بالاتر سویه مذکور در میان جدایه‌های حاصل از پنیر شاید مربوط به مقاومت بیشتر جدایه‌ها با این الگو در محصولات لبنی باشد. این الگو یکی از دو الگویی است که ادعا می‌شود احتمالاً با حیوانات ارتباط بیشتری دارند. احتمال دارد این جدایه با منشأ دامی از مواد لبنی منتقل و در انسان بیماری‌زا شده باشند. نتایج مطالعه حاضر نقش جدایه‌های که منشأ دامی دارند را در مقایسه با سایر جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آلودگی مواد لبنی بیشتر می‌داند. با بررسی همزمان این دو مورد می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً یکی از

منابع

- Buzzola F.R, Barbagelata M.S, Caccuri R.L and Sordelli D.O. (2006). Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus aroA* mutant in mice. *Infection and Immunity*, 74: 3498–3506.
- El-Huneidi, W., Bdour, S. and Mahasneh, A. (2006). Detection of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* and of a novel *aroA* genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*, 56: 127–132.
- Galal, H.M., Abdrabou, M.I., Faraag, A.H., Mah, C.K. and Tawfek, A.M. (2021). Evaluation of commercially available *aroA* deleted gene *E. coli* O78 vaccine in commercial broiler chickens under Middle East simulating field conditions. *Scientific Reports*, 11(1): 1–12.
- Grossmann, A., Frobose, N.J., Mellmann, A., Alabi, A.S., Schaumburg, F. and Niemann, S. (2021). An in vitro study on *Staphylococcus schweitzeri* virulence. *Scientific Reports*, 11(1): 1–10.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, C.H., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S. et al. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 570–574.
- de Oliveira, M.D., Araújo, J.D.O., Galúcio, J.M., Santana, K. and Lima, A.H., (2020). Targeting shikimate pathway: In silico analysis of phosphoenolpyruvate derivatives as inhibitors of EPSP synthase and DAHP synthase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 101: 107735.
- Saei, H.D., Ahmadi, M., Mardani, K. and Batavani, R.A. (2010). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. *Comparative Clinical Pathology*, 19(2): 163–168.
- Shayegh J., Barzegari A. and Mikaili P. (2013). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo's milk. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (4): 665–668.
- Seiberling, K.A., Aruni, W., Kim, S., Scapa, V.I., Fletcher, H. and Church, C.A. (2013). The effect of intraoperative mupirocin irrigation on *Staphylococcus aureus* within the maxillary sinus. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 3(2): 94–98.

-
- Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Fox, L.K., Schukken, Y.H. *et al.* (2005) Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4737–4743.
 - Stepan, J. Pantucek, R. and Doskar, J. (2004). Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiologica*, 49(4): 353–386.
 - Sung, J.M.L., Lloyd, D.H. and Lindsay, J.A. (2008). *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*, 154(7): 1949–1959.
 - Zeinhom, M. and Abed, A.H. (2021). Prevalence, characterization, and control of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and Egyptian soft cheese. *Journal of Veterinary Medical Research*, 27(2): 152–160.