جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعیین انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارئوس در شیر گاو، گوسفند، بز و شتر به روش الایزا

ابراهیم رحیمی[1*]، امیر شاکریان[1]، فروغ علیان[2]

[1] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
[2] دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: 1391/2/2 تاریخ پذیرش: 1391/6/1

چکیده

انترو توکسین های *استافیلوکوکوس ارئوس* از مهم ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی در جهان محسوب می‌شوند و شیر و فرآورده‌های آن غالباً در مسمومیت‌های استافیلوکوکال نقش دارند. این مطالعه با هدف بررسی حضور انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس در شیر خام گاو، شتر، گوسفند و بز در استان فارس انجام شد. به این منظور 84 نمونه شیر شامل شیر گاو (n =35)، شیر شتر (n=8)، شیر گوسفند (n =20) و شیر بز (n=21) از مخازن جمع‌آوری شیر 35 مزرعه پرورش دام شیری در طول سه فصل پاییز، زمستان 1389 و بهار 1390 جمع‌آوری و به منظور تعیین حضور انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به روش الایزا مورد آزمون قرار گرفتند . از 84 نمونه‌ی مورد مطالعه 12 نمونه‌ی (14/2٪) حداقل از نظر یک آنتروتوکسین مثبت گزارش شدند. ازاین تعداد، 3 نمونه برای SEA (25درصد)، 2 نمونه برای SED (16/6 درصد)، 2 نمونه برای SEC (16/6 درصد)، 2 نمونه برای SEA+SED (8/3 درصد)، 1 نمونه برای SEA+SEC (8/3 درصد) و 2 نمونه برای SED+SEC (16/6 درصد) مثبت بوده وهیچ یک از نمونه ها از نظر وجود SEB وSEE مثبت گزارش نشد. هیچ اختلاف آماری در میزان آلودگی نمونه‌های شیر به آنتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* در فصول مختلف سال در نمونه های مورد بررسی مشاهده نشد.مطالعات بیشتری در خصوص حضور انتروتوکسین های *استافیلوکوکوس ارئوس* در مواد غذایی مختلف و نقش آن ها در ایجاد مسمومیت های غذایی پیشنهاد می شود.

واژه‌های کلیدی: انتروتوکسین، *استافیلوکوکوس ارئوس*، شیر خام.

* مسوول مکاتبه: ebrahimrahimi55@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

1- مقدمه

استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان سومین عامل مهم بیماری‌های منتقله از غذا درجهان محسوب می‌شود(15،26). این باکتری، توانایی رشد و تولید انتروکسین‌های مختلف رادر محدوده‌ی وسیعی از شرایط مختلف در انواع مواد غذایی دارد لذا این باکتری را جزء یکی از مهم ترین عوامل مسمومیت زایی مواد غذایی قرار داده اند(14). در این بین، شیر یک ماده‌ی غذایی مناسب برای رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* می‌باشد. لذا شیر و فرآورده‌های آن به عنوان منابع مهم توکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* شناخته شده‌اند (7 ، 10 و 17). آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به *استافیلوکوکوس ارئوس* ممکن است به طور اولیه و یا در طول فرآیند تولید و نگه داری صورت پذیرد(4). اگر چه در فرآیند پاستوریزاسیون سلول‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* از بین می‌روند اما توکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* دارای مقاومت بالایی نسبت به حرارت بوده و عموماً در طول این فرآیند و حتی استریلیزاسیون فعالیت بیولوژیکی خود را حفظ می کنند (3 و 8). مسمومیت استافیلوکوکی نتیجه‌ی مصرف غذاهای آلوده به انتروتوکسین‌های تولید شده توسط *استافیلوکوکوس ارئوس* می-باشد(13). انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* انتروتوکسین‌های A, B, D, E معرفی شده‌اند و انتروتوکسین A معمولی‌ترین انتروتوکسین بازیافت شده از غذاهای عامل مسمومیت‌های غذایی بوده است(5).

بنابراین به دلیل اهمیت این توکسین‌ها در سلامت عمومی مطالعات فراوانی در خصوص بررسی تعیین شیوع سوش‌های توکسین‌زا و بررسی حضور توکسین‌های استافیلوکوکوس در مواد غذایی در تمام نقاط مختلف دنیا انجام شده است. مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* شامل آنتروتوکسین‌های A, B, C, D, E در شیر خام گاو، گوسفند، بز و شتر به روش الایزا طراحی و انجام شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- جمع‌آوری نمونه‌ها

از مرداد ماه 1387 الی دی ماه 1388 در مجموع 84 نمونه شیر گاو، گوسفند، بز و شتر از مراکز پرورش دام استان فارس جمع-آوری و در اسرع وقت در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل و حداکثر 12 ساعت پس از نمونه‌گیری از نظر حضور انتروتوکسین های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* با استفاده از روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مطالعه تجربی، نمونه ها به طور تصادفی ساده از بین دامداری های استان فارس انتخاب شدند. تعداد نمونه‌های اخذ شده در فصول پاییز، زمستان و بهار به ترتیب 16، 30 و 38 نمونه بود.

2-2- آماده سازی نمونه ها

مطابق دستور العمل ارائه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت، نمونه ها به مدت 10 دقیقه و حداکثر در دمای 10 درجه‌ی سانتیگراد و با دور 3500 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، لایه‌ی چربی سطح نمونه ها برداشته شد. فاز آبی به نسبت 1 به 20 با آب مقطرسترون رقیق و با کمک فیلتر های سرنگی میلی پور 0/22 میکرون (Merck, Germany) فیلتر شدند.

2-3- روش آزمایش

کیت الایزا مورد استفاده در این مطالعه از شرکت R-Biopharm آلمان (RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E Art. No: R4101, R-Biopharm AG, Germany) تهیه گردید. 100 میکرولیتر از محلول استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به کمک سمپلر 10 میکرولیتری به حفره‌های میکروپلیت اضافه و سپس به مدت 1 ساعت به دور از نور و در درجه حرارت 25-20 درجه‌ی سانتیگراد نگه داری شد. سپس، مایع موجود در میکروپلیت خارج شده و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب الرطوبه، مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد. سپس، همه‌ی حفره‌ها با 250 میکرولیتر بافر مخصوص شست وشو، شسته شد (عمل شست وشو دوبار تکرار گردید) و هر بار بعد از تخلیه‌ی مایع شست وشو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا کاملاً باقیمانده آب شست وشو خارج شود. بدین ترتیب، موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده‌اند خارج شدند. سپس، مقدار 100 میکرولیتر محلول کونژوگه شده با آنزیم به حفره‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در گرم خانه 25-20 درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفت. بعد از این زمان، مایع موجود در حفره‌ها به طول کامل تخلیه شد. سپس، همه‌ی حفره‌ها با 250 میکرولیتر بافر مخصوص

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شست وشو، شسته شد. عمل شست وشو دوبار تکرار گردید و هر بار بعد از تخلیه‌ی مایع شست وشو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا کاملاً باقیمانده آن شست وشو خارج شود. سپس، 50 میکرولیتر سوبسترا و 50 میکرولیتر کروموژن به هر حفره اضافه شد و میکروپلیت به مدت 30 دقیقه در حرارت 25-20 درجه‌ی سانتیگراد در تاریکی گرم-خانه‌گذاری شد. در نهایت برای توقف واکنش محلول قطع واکنش به مقدار 100 میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد و میزان جذب هر نمونه با قرائت کننده الایزا (Stat Fax 2100, England) در طول موج 450 نانومتر قرائت و اطلاعات مربوط به میزان جذب (OD) هر حفره به تفکیک ثبت شد.

2-4- کنترل کیفیت آزمون

بر اساس دستور العمل شرکت سازنده‌ی کیت، میزان جذب(OD)کنترل مثبت باید برابر یا بیش تر از 0/5 واحد و میانگین میزان جذب (OD)برای کنترل منفی باید مساوی یا کم تر از 0/3 باشد.

2-5- تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های به دست آمده از آزمایش و اطلاعات جمع آوری شده با نرم افزار SPSS/16 و دانکن در سطح اطمینان 95 درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

3- نتایج و بحث

در این مطالعه، مجموعاً 84 نمونه شیر خام گاو، شتر، گوسفند و بز با هدف بررسی حضور انتروتوکسین‌های کلاسیک (A, B, C, D, E)/*استافیلوکوکوس ارئوس* به روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد 14/2درصد نمونه‌ها حامل حداقل یک انتروتوکسین کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* بوده است به ترتیب از 35 نمونه شیر گاو، 20 نمونه شیر گوسفند و 21 نمونه شیر بز، 6 (7/1درصد)، 3 (3/5درصد)، و 3 (3/5درصد) نمونه حامل انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* تشخیص داده شد. هیچ یک از نمونه های شیر شتر از نظر این انتروتوکسین‌ها مثبت نبود. 7 نمونه حامل تنها یک نوع انتروتوکسین و 5 نمونه حامل دو آنتروتوکسین بودند (جدول 1). مطالعات مختلف نشان می‌دهد میزان آلودگی نمونه‌های شیر خام به *استافیلوکوکوس ارئوس* متغیر و از 5 درصد تا بیش از 70 درصد می‌باشد و بیش از 50 درصد از *استافیلوکوکوس ارئوس-های* جدا شده از شیر و فرآورده‌های آن قادر به تولید انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس بوده اند* و میزان آلودگی شیر و فرآورده های آن به این توکسین ها 2 تا 30 درصد گزارش شده است (5 ، 13 ،16 ،18، 19 ، 23 و 24). که اکثراً با نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد. تفاوت نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف را می توان به اختلاف در روش‌های نمونه‌گیری فصل سال، موقعیت جغرافیایی و روش‌های آزمایش نسبت داد.

در بین انتروتوکسین‌های کلاسیک تشخیص داده شده انتروتوکسین A در 3 نمونه، انتروتوکسین D در 2 نمونه، انتروتوکسین C و D در 2 نمونه شناسایی شد. درحالی که انتروتوکسین E و B در هیچ یک از نمونه‌های بررسی شده مشاهده نگردید. در شیر گاو عمدتاً انتروتوکسین‌های A و D و در شیر گوسفند و بز عمدتاً انتروتوکسین C مشاهده شد (جدول 1). انتروتوکسین A و پس ازآن انتروتوکسین D سمی‌ترین و شایع-ترین عامل مسمومیت غذایی در بین انواع انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* شناخته شده است (12 ، 20). اگر چه به روش الایزا تنها قادر به ردیابی انتروتوکسین‌های کلاسیک (A-E) در مواد غذایی هستیم و این تکنیک قادر به ردیابی سایر انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* نمی‌باشد اما گزارش شده 95 درصد از مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکوس مربوط به انتروتوکسین‌های A تا E می‌باشد (5) و تنها 5 درصد از مسمومیت‌های استافیلوکوکوس مربوط به سایر انتروتوکسین‌های آن بوده است. مطابق نظریه Tranter (1996) اگر چه مقدار انتروتوکسین لازم جهت بیماری مشخص نشده است اما حداقل 1 گرم توکسین در 100 گرم غذا جهت بروز علائم مسمومیت کافی است (27).

داده‌های این مطالعه، نشان داد فراوان‌ترین انتروتوکسین ردیابی شده در نمونه‌های شیر گاو انتروتوکسین A و D و در شیر گوسفند و بز انتروتوکسین C بوده است. این نتایج با گزارش های ارائه شده از Normanno و همکاران از ایتالیا (2007)، Rall و همکاران از برزیل (2007)، Zouharova و همکاران از جمهوری چک (2008)، Jorgensen و همکاران از نروژ (2005)، Akineden

و همکاران از آلمان (2008) مشابه است(1 ، 10 ، 18، 23 و 28) .

جدول 1- فراوانی و درصد حضور انتروتوکسین‌های کلاسیک (A, B, C, D, E) استافیلوکوکوس ارئوس در شیر گاو، گوسفند، بز و شتر جمع‌آوری شده از استان فارس

نمونه شیر	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت	آنتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس					
			A	C	D	A+D	A+C	C+D
گاو	35	6	3	–	1	2	–	–
گوسفند	20	3	–	2	1	–	–	–
بز	21	3	–	–	–	–	1	2
شتر	8	0	–	–	–	–	–	–
مجموع	84	12	3	2	2	2	1	2

جدول 2- شیوع فصلی آلودگی نمونه‌های شیر گاو، گوسفند و بز به انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس*

فصل	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت	انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس*					
			A	C	D	A+D	A+C	C+D
پاییز	30	7	3	2	–	1	1	–
زمستان	16	2	–	–	1	1	–	–
بهار	38	3	–	–	1	–	–	2
مجموع	84	12	3	2	2	2	2	2

به هر حال، برخی مطالعات نشان می‌دهد فراوان‌ترین انتروتوکسین تولید شده از سوش‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر گاو انتروتوکسین C و سپس انتروتوکسین A بوده است (1، 2، 6، 9، 17 و 25).

از بین نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه هیچ یک از نمونه‌ها حامل انتروتوکسین B و E نبود. مطالعه‌ای از Zouharova و همکاران (2008) نیز نشان می‌دهد از 70 *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از مخازن شیر در مزارع پرورش گاو شیری در جمهوری چک هیچ یک از سوش‌ها حامل ژن‌های کد کننده‌ی انتروتوکسین e نبوده است و تنها 10 درصد از سوش‌ها حامل ژن مواد انتروتوکسین b بوده‌اند(28). همچنین، نتایج مطالعه Morandi و همکاران (2007) از ایتالیا در خصوص تعیین انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* از شیر و فرآورده‌های آن حاکی از آن است که هیچ یک 12 نمونه حامل انتروتوکسین E نبوده است تنها 1 نمونه حامل انتروتوکسین B بوده است(15). در مطالعه‌ی Pereira و همکاران (2009) نیز هیچ یک از *استافیلوکوکوس ارئوس* های جدا شده از مواد غذایی در پرتغال حامل ژن‌های مولد انتروتوکسین e و b نبوده است(21). با وجود این، برخی از مطالعات حضور ژن‌های مولد انتروتوکسین B و E را در سوش‌های جدا شده از شیر و سایر مواد غذایی نشان می‌دهد (7 و 24).

جدول 2 میزان شیوع فصلی آلودگی نمونه‌های شیر گاو، گوسفند و بز را به انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* نشان می‌دهد.

نتایج این بخش مطالعه، نشان داد بالاترین میزان آلودگی نمونه‌ها به این توکسین‌ها در فصل پاییز (23/3 درصد) و به دنبال آن فصل زمستان (12/5 درصد) و بهار (7/9 درصد) بوده است. آنالیز آماری نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین میزان آلودگی

نمونه‌های شیر به انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* در فصول مختلف وجود ندارد. مطالعه‌ی مشابهی از رحیمی و همکاران (2011) حاکی از آن است که اختلاف آماری معنی داری در شیوع آلودگی شیر گاو به انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس در فصول مختلف سال وجود نداشته است (22).

نتایج این مطالعه، نشان می‌دهد در شیر و به دنبال آن فرآورده‌های شیر می‌توانند به عنوان عوامل مهم مسمومیت استافیلوکوکی در ایران مطرح باشند با این وجود مطالعات اپیدمیولوژیک بیش تری جهت بررسی حضور انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس ارئوس، قدرت توکسین‌زایی این پاتوژن در مواد غذایی و بررسی ژن‌های مولد انتروتوکسین و عامل حدت استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از مواد غذایی لازم به نظر می‌رسد.

4- سپاس گزاری

نویسندگان، مراتب سپاس و قدردانی خود را از آقایان دکتر حسن ممتاز و مهندس مجید ریاحی دهکردی در خصوص همکاری در انجام آزمایش‌های عملی این مطالعه، اعلام می دارند.

5- منابع

1. Akineden O, Hassan AA, Schneider E, Usleber E. 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. . *International Journal* of *Food Microbiology* ,124: 211-216.
2. Aragon-Alegro L C, Konta E M, Suzuki K, Silva M G, Júnior A F, Rall R, et al. 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.
3. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, et al. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin Ain the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130: 33-40.
4. Brasca M, Morandi S, Vanoni L, Colombo L, Lodi R. 2005. The influence of different cultural conditions on the development and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* .*Scienza* e *tecnica lattiero-casearia*, 56: 105-115.
5. Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal* of *Food Microbiology*, 61:1-10.
6. Da Silva ER, do Carmo LS, da Silva N. 2005. Detection of the enterotoxin A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology*,106: 103-107.
7. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *International Journal* of *Food Microbiology* , 142: 74–77.
8. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk *International Journal* of *Food Microbiology* , 7: 311-316.
9. Jablonsky L M, Bohach G . 1997. *Staphylococcus aureus*. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, & T.J. Monteville, (Eds.), Food Microbiology Fundamentals and Frontiers (pp. 353–357). ASM Press, Washington DC.
10. Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rovik LM. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 158-167.
11. Huong B TM, Mahmud ZH, Neogi SB, Kassu A, Nhien NV. Mohammad A, et al. 2010. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control*, 21: 166–171
12. Hwang S Y, Kim SY, Jang E J, Kwon N H, Park Y K, Koo HC, et al. 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *International Journal* of *Food Microbiology* ,117: 99–105.
13. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2: 63-76.
14. Loncarevic S, Jorgensen HJ, Lovseth A, Mathisen T, Rorvik LM. 2005. Diversity of Staphylococcus aureus enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 344-350.
15. Morandi S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aurus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology*, 124: 66-72
16. Mork T, Kvitle B, Mathisen T, Jørgensen H J. 2010. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Veterinary Microbiology*, 141: 134–141.

17. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, et al. 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in foods products marketed in Italy. *Food Microbiology*, 98: 73-79.
18. Normanno T G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N C, Corrente M, Parisi A, et al. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal* of *Food Microbiology* ,115: 290–296.
19. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, et al. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal* of *Food Microbiology*,118: 186–193.
20. Pelisser MR, Klein CS, Ascoli KR, Zotti TR, Arisil ACM. 2009. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:145–148.
21. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology* , 26: 278–282.
22. Rahimi E, Momtaz H, Shakerian A, Kavyani HR. 2011. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk by ELISA method. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, In press.
23. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernades Jr, Candeias JMG, et al. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aurus* strains isolated fram raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, 132: 408-413.
24. Shuiep E S, Kanbar T, Eissa N, Alber J, Lämmler C, Zschöck Met al. 2009. . Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw camel milk samples. *Research in Veterinary Science*,86: 211–215
25. Stephen R, Annemuller C, Hassan AA, Lammler Ch. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 78: 373-382.
26. Tirado C, Schimdt K. 2001. WHO surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43: 80-84.
27. Tranter HS. 1996. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. *Lancet* , 336: 1044-1046.
28. Zouharova M, Rysanek D. 2008. Multiplex PCR and RPLA identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses and Public Health, 55: 279-330.