پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات ۶۲ تا ۶۶

مقاله اصلی
(Original Article)

فراوانی ژن‌های *tst*، *entB* و *entC* در میان نمونه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس جدا شده ازبیماران بستری دربیمارستان‌های آموزشی قزوین

معصومه اصلانی مهر[۱]، مهناز توکلی[۲]، امیر پیمانی[۱،۲*]، امیر جوادی[۳]

[۱] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
[۲] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
[۳] گروه آمار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

چکیده

سابقه و هدف: *توکسین سندرم شوک سمی- ۱ و انتروتوکسین‌ها از جمله فاکتورهای بیماریزایی مهم استافیلوکوکوس اورئوس هستند که همگی سوپرآنتی ژن بوده و در ایجاد سندرم شوک سمی مشارکت می‌نمایند. در این مطالعه، فراوانی شایع‌ترین ژن‌های مولد سندرم شوک سمی (tst، entB و entC) در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین بررسی شد.*

روش بررسی: *در این تحقیق توصیفی، تعداد ۶۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بستری طی مدت ۹ ماه جمع‌آوری شد. ابتدا تمامی ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و آزمایشگاهی تعیین هویت شدند و سپس از نظر حضور ژن femA، ژن اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس، تائید شدند. در ادامه آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی ژن های tst، entB و entC انجام شد و با آمار توصیفی ارائه گردید.*

یافته‌ها: *از مجموع ۶۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۲ ایزوله (۳۳/۴ درصد) از نظر حضور ژن‌های tst، entB و entC مثبت شدند که از آن میان، ۱۸ ایزوله (۲۷/۶ درصد) دارای ژن tst، ۲ ایزوله (۳ درصد) دارای ژن entB، ۲ ایزوله (۳ درصد) دارای ژن entC بودند. هم چنین ۲ ایزوله (۳ درصد) از نظر حضور هر دو ژن tst و entC مثبت بودند.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که حضور ژن‌های کد کننده توکسین‌های مولد سندرم شوک سمی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان‌های مورد مطالعه قابل توجه است. با توجه به اهمیت بالینی این ایزوله‌ها و نقش تهدید کننده آنها در سلامت و بهداشت عمومی، لزوم توجه بیشتر به آنها ضروری است.*

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، tst،entB، entC، سندرم شوک سمی.*

مقدمه

گونه‌های جنس استافیلوکوکوس یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در دنیا می‌باشند (۲، ۱). بروز عفونت‌های استافیلوکوکی درسال‌های اخیر به دلیل انتشار سویه‌های مقاوم، افزایش بیماران با ضعف ایمنی و استفاده بیش از حد از وسایل پزشکی مانند کاتتر رو به افزایش است (۱). در میان گونه‌های استافیلوکوک، استافیلوکوکوس اورئوس دارای بیشترین توانایی بیماری‌زایی است. استافیلوکوکوس اورئوس مسئول بیماری‌هایی ازجمله سندرم فلسی شدن پوست، سندرم شوک سمی، عفونت‌های دستگاه ادراری، باکتریمی و سندرم شوک سمی می‌باشد (۳).

آدرس نویسنده مسئول: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، بخش میکرب شناسی، امیر پیمانی (**e-mail:** a.peymani@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۳/۱۹

توانایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد بیماری به تولید چندین نوع مختلف توکسین خارج سلولی بستگی دارد. اکثر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از بیمارانی با علایم سندرم شوک سمی (TSS) توکسینی به نام توکسین سندرم شوک سمی-۱ (TSST-1) تولید می‌کنند که یک سوپرآنتی‌ژن می‌باشد (۴، ۳). اگرچه به طور کلاسیک علت این بیماری به جهت استفاده از تامپون بوده است، اما در بسیاری از موارد دیگر مانند نیش گزیدگی نیز می‌تواند باعث ایجاد بیماری گردد (۵). انتروتوکسین‌های مختلفی از استافیلوکوکوس اورئوس که همگی سوپرآنتی‌ژن هستند (SEE، SEC، SEB، SEA، SEH و SEI) تاکنون شناسایی شده‌اند که علاوه بر مسمومیت گوارشی در سندرم شوک سمی نیز دخیل می‌باشند (۶). گزارش گردیده که سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده اگزوتوکسین TSST-1 می‌توانند باعث ایجاد بیماری به نام سندرم شوک سمی شوند. این بیماری با رهاسازی توکسین به جریان خون آغاز می‌شود و در مرحله اول بیماری علایمی مانند تب بالا، راش ماکولار گسترده، تهوع، استفراغ، اسهال، میالژی ، گلودرد و سردد، پرخونی حلق وافت فشار خون دیده می‌شود. در مرحله دوم علایم شدیدتر شده و باعث میوکاردیت، ایجاد اختلال در عملکرد کلیه‌ها، ادم، اختلال تنفسی، ورقه ورقه شدن پوست و اختلالات عصبی می‌گردد ودر صورت عدم درمان می‌تواند در نهایت منجر به مرگ شود (۷). در بسیاری از مطالعات گزارش شده است که علاوه بر TSST-1 توکسین‌های SEA, SEB,SEC, SEH, SEI وSEJ می‌توانند باعث ایجاد علایم بیماری سندرم شوک سمی شوند (۸،۹).

تاکنون اغلب مطالعاتی که بر روی توکسین‌های مسئول سندرم شوک سمی استافیلوکوکی انجام شده است، برروی منابع غذایی و حیوانی صورت گرفته است (۱۳-۱۰). بنابراین نیاز به اطلاعات بالینی در نمونه‌های انسانی در ایران و کشورهای همسایه وجود دارد.

شناسایی سویه‌های توکسین‌زای استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های ایمونولوژی مانند ایمونودیفیوژن، آگلوتیناسیون، رادیوایمونواسی و الایزا زمان‌بر، دشوار و فاقد ویژگی لازم است (۱۲،۱۴). بر اساس مطالعات انجام شده، روش PCR که اساس آن تکثیر قطعات اختصاصی DNA است، ابزاری مناسب جهت تشخیص سریع، حساس و اختصاصی ژن‌های توکسین‌زای استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱۶، ۱۵).

هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی ژن‌های *tst* و انتروتوکسین‌های entC و *entB* مولد سندرم شوک سمی استافیلوکوکوس اورئوس در بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی قزوین بود.

مواد و روشها

این تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت.

جداسازی و تعیین هویت: در مجموع، ۶۵ ایزوله از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین جمع آوری شدند. ابتدا با استفاده از آزمون‌های استاندارد آزمایشگاهی، کلیه ایزوله‌ها به شرح زیر تعیین هویت شدند: آزمون کواگولاز لام و لوله‌ایی، آزمون DNase و آزمون تخمیر مانیتول.

تایید ملکولی ایزوله‌ها با روش PCR: پس از انجام آزمون‌های آزمایشگاهی، تمامی نمونه‌ها با جداسازی ژن *femA* تایید هویت شدند. ابتدا استخراج DNA ژنومی به شرح ذیل انجام شد. تمامی ایزوله‌ها در ۰/۵ میلی‌لیتر محیط Luria broth (LB) به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور کشت داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و به رسوب به دست آمده ۱۸۵ میکرولیتر بافر TE [20 mM Tris chloride, 2 mM EDTA pH 8.0] و ۱۵میکرولیتر لیزواستافین نوترکیب (Sigma) اضافه شد. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن DNA ژنومی تمامی نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج Bioneer (genomic DNA kit extraction Bioneer Inc., South Korea) طبق دستورالعمل آن استخراج گردید. جهت تائید غلظت مناسب DNA استخراجی، تمامی نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ در نسبت A260 به A280 اندازه‌گیری شدند. در ادامه تمامی نمونه‌ها با انجام آزمون PCR از نظر حضور ژن‌های *femA* با استفاده ازپرایمرهای اختصاصی جدول ۱ بررسی شدند که ژن اختصاصی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس است (۱۷، ۱۶).

جداسازی ژن‌های *entC*، *entB* و *tst*

ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ادامه از نظر حضور ژن‌های entC، entB و tst با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدول ۱ بررسی شدند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر MgCL2 ، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می‌باشد. تکثیر ژن‌های مذکور تحت شرایط زیر با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied biosystem,USA) انجام شد. دمای دناتوراسیون اولیه (۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه)، ۳۵ سیکل حرارتی شامل دمای

دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه)، دمای اتصال پرایمر (۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ژن *femA*)، (۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ژن *entC* و *tst*) و (۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ژن *entB*) و دمای تکثیر (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) و در پایان دمای تکثیر نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه) انجام شد (۱۶). محصولات PCR از نظر حضور ژن‌های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ آمیزی با سایبر گرین بررسی شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرها مربوط به ژن‌های *sec*، *seb*، *tst* و *femA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*.

ژن	پرایمر	سکانس الیگونوکلوئیدی ('5-'3)	اندازه محصول (bp)
femA	femA-F femA-R	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132
tst	TST-F TST-R	ACCCCTGTTCCCTTATCATC TTTTCAGTATTTGTAACGCC	326
entB	Seb1 Seb2	GTATGGTGGTGTAACTGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164
entC	Sec1 Sec2	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	451

یافته‌ها

تمامی ۶۵ ایزوله از نظر حضور ژن *femA* مثبت بودند. ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب از بخش‌های داخلی (۵۳/۸ درصد)، نوزادان (۲۰ درصد)، مراقبت‌های ویژه (۱۸/۴ درصد) و جراحی (۷/۶ درصد) و از نمونه‌های خون (۴۶ درصد)، آبسه و زخم‌های پوستی (۲۴ درصد)، ترشحات دستگاه تنفسی (۱۵ درصد)، کاتتر (۱۰ درصد) و ادرار (۵ درصد) جداسازی شدند.

در میان نمونه‌های جمع آوری شده، ۳۰ نمونه (۴۶/۲ درصد) از مردان، ۲۲ نمونه (۳۳/۸ درصد) از زنان و ۱۳ نمونه (۲۰ درصد) متعق به نوزادان بودند. همان طور که در جدول ۲ آمده است، از ۶۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ژن *tst* (۲۷/۶ درصد) دارای بالاترین شیوع بود که اغلب از نمونه‌های کشت خون (۵۵/۵ درصد) جدا شدند. هم چنین ژن‌های مذکور بیشتر از بیماران بستری در بخش داخلی (۷۲/۲ درصد) جدا شدند (جدول ۳). ژن‌های *entB* و *entC* نیز از شیوع یکسانی برخوردار بودند (۳ درصد). هم چنین دو ایزوله (۳ درصد) دارای هر دو ژن *tst* و *entC* بودند که از کشت خون و آبسه جدا شدند. شکل ۱ نتایج محصولات PCR را بعد از انجام الکتروفورز نشان می‌دهد.

جدول ۲- توزیع ژن‌های سندرم شوک سمی برحسب منبع نمونه

ژن	مجموع	کشت خون	بافت و پوست	کاتتر	ترشحات تنفسی	ادرار
tst	۱۸(۲۷/۶)*	۱۰(۵۵/۵)	۵(۲۷/۷)	۲(۱۱/۱)	۱(۵/۵)	۰
entB	۲(۳)	۰	۱(۵۰)	۰	۱(۵۰)	۰
entC	۲(۳)	۱(۵۰)	۰	۰	۰	۱(۵۰)

* تعداد (درصد)

جدول ۳- توزیع ژن‌های سندرم شوک سمی برحسب بخش‌های بیمارستانی

	داخلی	نوزادان	مراقبت‌های ویژه	جراحی
tst	۱۳(۷۲/۲)*	۱(۵/۵)	۳(۱۶/۶)	۱(۵/۵)
entB	۱(۵۰)	۰	۱(۵۰)	۰
entC	۱(۵۰)	۰	۰	۱(۵۰)

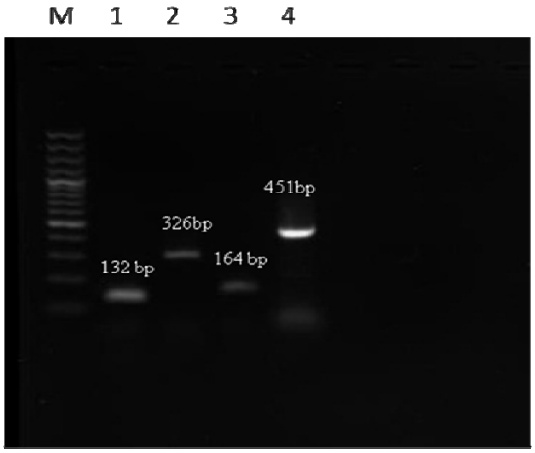
* تعداد (درصد)

توزیع فراوانی کل ایزوله‌های جمع آوری شده و ایزوله‌های توکسین مثبت هر یک از بیمارستان‌های شهر قزوین در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴- توزیع فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب بیمارستان‌ها و ژن‌های مولد سندرم شک سمی

بیمارستان	تعداد کل	*tst*	*entB*	*entC*
بوعلی (داخلی)	۱۵(۲۳)*	۵(۳۳/۳)	۰	۱(۶/۶)
قدس (کودکان)	۲۲(۴۹/۲)	۱۰(۴۵/۴)	۰	۱(۴/۵)
شهید رجایی (جراحی و سوانح)	۲۱(۳۲/۳)	۲(۹/۵)	۲(۹/۵)	۰
کوثر(زنان)	۷(۱۰/۷)	۱(۱۴/۲)	۰	۰
مجموع	۶۵(۱۰۰)	۱۸(۲۷/۶)	۲ (۳)	۲ (۳)

* تعداد (درصد)



شکل ۱- نتایج الکتروفورز PCR. لاین M: مارکر 100bp، ردیف ۱: نمونه بالینی مثبت از نظر حضور ژن *femA*، ردیف ۲: نمونه بالینی مثبت از نظر حضور ژن *tst*، ردیف ۳: نمونه بالینی مثبت از نظر حضور ژن *entB* و ردیف ۴: نمونه بالینی مثبت از نظر حضور ژن *entC*.

بحث

تحقیق نشان داد که ۲۲ ایزوله (۳۳/۴ درصد) قابلیت تولید هر یک از توکسین‌های TSST-1، SEB و SEC را داشتند که از آن میان، ۱۸ ایزوله (۲۷/۶ درصد) دارای ژن *tst*، ۲ ایزوله (۳ درصد) دارای *entB* و ۲ ایزوله (۳ درصد) دارای ژن *entC* مثبت شدند. توکسین‌های TSST-1 و انتروتوکسین‌ها در *استافیلوکوکوس اورئوس*، توانایی بالایی برای بیماری‌زایی در انسان و حیوانات دارند. سندرم شوک سمی استافیلوکوکی به دنبال تولید توکسین TSST-1 رخ می‌دهد. بعضی از انتروتوکسین‌ها نیز می‌توانند در ایجاد این بیماری دخیل باشند که از میان آنها انتروتوکسین‌های SEB و SEC اهمیت ویژه‌ای دارند. اکثر مطالعاتی که در کشور ما بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده توکسین‌های TSST-1، SEB و SEC انجام شده غالبا" بر روی ایزوله‌های حیوانی و منابع غذایی بوده است. لذا این مطالعه برای اولین بار به بررسی حضور توکسین‌های مولد سندرم شوک سمی در بیماران آلوده به عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین می‌پردازد.

تاکنون روش‌های متعددی برای شناسایی توکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شده است. روش‌هایی که براساس واکنش‌های ایمونولوژی مانند الایزا طراحی شده‌اند، زمان‌بر و غیراختصاصی بوده و اغلب با واکنش متقاطع نیز همراه می‌باشند. اما در روش PCR که اساس آن شناسایی ژن‌های تولید کننده توکسین است، از سرعت، حساسیت و ویژگی قابل توجهی نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است. لذا اخیرا" محققین از این روش جهت شناسایی ژن‌های کد کننده توکسین‌های استافیلوکوکی استفاده می‌کنند (۱۶، ۱۵).

در مطالعه درنبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ در هلند، فراوانی ژن *tst* در ۵۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از افراد جامعه، ۲۰ ایزوله (۲۴ درصد) و در ۳۶ ایزوله بیمارستانی، ۵ ایزوله (۱۴ درصد) گزارش شد (۱۸). کولتز و همکاران در سال ۲۰۰۳ در آلمان با انجام آزمون PCR بر روی ۹۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی مشخص نمودند که ۴۴ ایزوله (۴۷/۱۳ درصد) از نظر حضور ژن‌های کد کننده انتروتوکسین های A-D مثبت بودند، بدین ترتیب که ۹ ایزوله (۹/۶۸ درصد) دارای ژن *entB* و ۲۰ ایزوله (۲۱/۵۱ درصد) دارای ژن *entC* بودند (۱۹). اما در همان سال، بکر و همکاران در آلمان در ۲۱۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۳ ایزوله (۵/۹ درصد) دارای ژن *entB*، ۱۹(۸/۶ درصد) دارای ژن *entC* و ۴۰ ایزوله (۱۸/۲ درصد) دارای ژن *tst* را شناسایی کردند (۲۰). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر از هم‌خوانی مناسبی برخوردار است. هم چنین در کانادا، مهروترا و همکاران در مطالعه مشابهی توانستند در میان نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس، در ۱۱ ایزوله (۱۵درصد) ژن *tst*، در ۱ ایزوله (۱/۴درصد) ژن *entB* و در ۳ ایزوله (۴/۳درصد) ژن *entC* را با استفاده از آزمون PCR شناسایی کنند (۱۶).

در این مطالعه، ۲ ایزوله (۳ درصد) دارای هر دو ژن *tst* و *entC* بودند. البته تولید هم‌زمان توکسین‌های TSST-1 و SEC در سایر مطالعات نیز گزارش شده است. در مطالعه بکر و همکاران در سال ۱۹۹۸ مشاهده کردند که یک ایزوله از ۵۰ ایزوله بالینی (۲درصد) به طور مشترک دارای هر دو ژن *tst* و *entC* بود (۱۴).

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های مورد مطالعه به میزان قابل توجهی از نظر حضور ژن‌های کد کننده توکسین‌های TSST-1، SEB و SEC مثبت بودند. با توجه به اهمیت بالینی و پتانسیل بالای این ارگانیسم‌های مولد توکسین از نظر ایجاد بیماری‌های مهمی از جمله سندرم شوک سمی، شناسایی و لزوم توجه بیشتر به آنها با به کارگیری راهکارهای مناسب درمانی و ابزارهای مناسب کنترل عفونت ضروری است.

تشکر و قدردانی

از شورا و ریاست مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جهت تامین بودجه و معاونت پژوهشی جهت تصویب این طرح تحقیقاتی و همکاری کارکنان آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های قدس، شهید رجایی، کوثر و بوعلی و گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین تقدیر می‌شود.

REFERENCES

1. Hu DL, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima M, Nakane A. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome mec genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Tohoku J Exp Med 2011; 225:161-69.

2. Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Res Microbiol 2011; 162: 1060-66.
3. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Clin Microbiol Rev 2000;13:16-34.
4. Parsonnet J, Hansmann MA, Delaney ML, Modern PA, Dubois AM, Wieland-Alter W, et al. prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. J Clin Microbiol 2005; 43:4628-34.
5. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520–22.
6. Vasconcelos NG, Cunha MR. Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. J Public Health Epidemiol 2010; 2:29-42.
7. Mayhall CG, Editor. Hospital epidemiology and infection control. 3rd ed. United States: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
8. Abe J, Ito Y, Onimaru M, Kohsaka T, Takeda T. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 2000; 44:79-88.
9. Alouf JE, Popoff MR. The Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins.3rd ed. United States: Academic Press of Elsevier; 2006. P.830-43.
10. Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand MR, Rahimi Forushani A, Zahraei Salehi MT, Agha Amiri S. Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. Tehran University Medical Journal 2009; 67: 470-76.
11. Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. Int J Food Microbiol 2007; 117:99-105.
12. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ENT*) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (*TST*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S.aureus* isolateds harboring these genes. Arq Inst Biol 2006: 73: 165-69.
13. Karahan M, Açik MN, Cetinkaya B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. Foodborne Pathog Dis 2009; 6: 1029-35.
14. Becker K, Roth R, and Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of Staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol 1998; 36: 2548–53.
15. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. Int J Food Microbiol 2008; 121: 66-73.
16. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of genes for *staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol 2000; 38:1032-35.
17. Johnson S, Krüger D, Labischinski H. FemA of *Staphylococcus aureus*: isolation and immunodetection. FEMS Microbiol Lett 1995; 132: 221-28.
18. Deurenberg RH, Nieuwenhuis RF, Driessen C, London N, Stassen FR, van Tiel FH, *et al.* The prevalence of the *Staphylococcus aureus* tst gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. FEMS Microbiol Lett 2005; 245: 185-89.
19. Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41: 4683-87.
20. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von 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.