Journal of Microbial World
Volume 13, No. 2, July 2020

Original Article

Enterotoxin gene profiles among multi-drug resistance *Staphylococcus aureus* isolated from traditional dairy products in Fars providence

Maryam Beygi[1], Mohammad Kargar[2]

[1]M.Sc, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus aureus* is one of the most important factors of food poisoning in the world. The objective of this research is to investigate the frequency amount of enterotoxin genes in traditional dairy products with multidrug resistance isolates in Fars province.
Materials and Methods: This cross-sectional descriptive study was performed on 300 samples of traditional dairy products. In order to identify *Staphylococcus aureus* isolates in addition to standard biochemical tests, according to PCR method, *nuc* and *23S rRNA* genes proliferation were confirmed. Enterotoxin genes were identified by using of the multiple PCR method. The susceptibility of the isolates for 16 antibiotics was investigated by using of the disk diffusion method according to CLSI criteria.
Results: 120 isolates (40%) were identified as *Staphylococcus aureus*. The highest frequency of contamination is related to Cheese with 38 samples (31.66%) and its lowest relates to Doogh with 10 samples (8.33%). 91 samples (75.83%) of contaminated isolates were included of the enterotoxin gene, the highest frequency of enterotoxin gene was related to *sea* (54.17%) and its following, *seb, seg, see, sed* and *sec* respectively were included the frequency 50%, 33.33%. 28%, 16.67%, 4.17% and 3.50%. Also out of 64 strains of *Staphylococcus aureus* (56.33%) with multidrug resistance, 54 isolates (84.38%) had enterotoxin genes.
Conclusion: The finding indicated that a significant frequency of *Staphylococcus aureus* isolates with enterotoxin producing multidrug resistance. Therefore, continuous molecular monitoring of *Staphylococcus aureus* isolates and also evaluation of the association of genetic profiles with clinical specimens is recommended.
Keywords: *Staphylococcus aureus,* Enterotoxigenic, Multi-drug resistance, Dairy products.

Correspondence to: Mohammad Kargar
Tel: +98 9173149203
E-mail: mkargar@jia.ac.ir
Journal of Microbial World 2020, 13(2): 109-121.
DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره دوم (پیاپی ۴۳) تابستان ۱۳۹۹
صفحات ۱۲۱-۱۰۹

Original Article

پروفایل ژنی تولید انتروتوکسین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* داری مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در محصولات لبنی سنتی استان فارس

مریم بیگی[۱]، محمدکارگر[۲*]

[۱]کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم

[۲]استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی در جهان است. هدف از این پژوهش ارزیابی فراوانی ژن‌های انتروتوکسین و شناسایی جدایه‌های دارای مقاومت چند دارویی در محصولات لبنی سنتی استان فارس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی توصیفی بر روی ۳۰۰ نمونه محصولات لبنی سنتی (پنیر، شیر، کشک، دوغ و سرشیر) انجام گرفت. شناسایی و تائید جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و تکثیر ژن‌های *nuc* و *23S rRNA* با روش PCR انجام شد. سپس به منظور ارزیابی ژن‌های انتروتوکسین از روش PCR چندگانه استفاده شد. همچنین حساسیت جدایه‌ها برای ۱۶ آنتی‌بیوتیک با روش دیسک دیفیوژن براساس معیار CLSI ارزیابی گردید.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۱۲۰ جدایه (۴۰٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شدند. بیشترین فراوانی آلودگی مربوط به پنیر ۳۸ نمونه (۳۱/۶۶٪) و کمترین آن مربوط به دوغ ۱۰ نمونه (۸/۳۳٪) بود. ۹۱ نمونه (۷۵/۸۳٪) از جدایه‌های آلوده حاوی ژن انتروتوکسین بودند. بیشترین فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، مربوط به *sea* (۵۴/۱۷٪) و به دنبال آن به ترتیب *seb*، *seg*، *see*، *sed* و *sec* با فراوانی ۵۰٪، ۲۸/۳۳٪، ۱۶/۶۷٪، ۴/۱۷٪ و ۳/۵۰٪ بود. همچنین از ۶۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۵۶/۳۳٪) دارای مقاومت چند دارویی، ۵۴ جدایه (۸۴/۳۸٪) واجد ژن های انتروتوکسین بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش نشان دهنده فراوانی قابل توجه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت چند دارویی مولد انتروتوکسین در منطقه مورد بررسی بود. از این‌رو پایش مداوم مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین مقایسه پروفایل ژنتیکی جدایه‌ها با نمونه‌های کلینیکی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسیژنیک، مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی، محصولات لبنی.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۹

مقدمه

استافیلوکوکوس اوررئوس متعلق به تیره فیرمیکوتس، رده *فیرمی باکتریا*، خانواده *میکروکوکاسه* است (۱). برخی از گونه‌های جنس *استافیلوکوکوس اورئوس* برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند. غذا برای ایجاد مسمومیت استافیلوکوکی محیط مناسبی برای رشد باکتری می‌باشد. *استافیلوکوکوس اوررئوس* یکی از متداول‌ترین عوامل شیوع مسمومیت غذایی باکتریایی است. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، در نتیجه مصرف غذای آلوده

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

به *استافیلوکوکوس اوررئوس* ایجاد می‌شود که علایمی مانند اسهال و استفراغ را به دنبال دارد. تقریبا بیشتر کشورهای جهان با مشکل آلودگی مواد غذایی درگیر می‌باشند. در پژوهش‌های مختلف نشان داده شده است که عامل ١٤ تا ٤٠ درصد بیماری‌های منتقل شونده از راه غذا (food-borne)، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است (٢). شیر و فرآورده های لبنی اهمیت زیادی در گسترش مسمومیت‌های غذایی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند. اعتقاد بر این است که میزان آلودگی فراورده‌های شیر به دلیل آلودگی هایی است که در فرایند تولید آن ها اتفاق می افتد. اصلی‌ترین منابع آلودگی پنیر شامل شیرخام، شیر با پاستوریزاسیون ناقص و یا آلودگی مجدد شیر پاستوریزه با میکروب های ناشی از شیرخام یا از محیط های آلوده ساخت پنیر است (٣). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایع‌ترین عوامل مسمومیت‌های غذایی در بسیاری از کشورها است .این باکتری دارای توکسین‌های مختلفی مانند لوکوسیدین، همولیزین و انتروتوکسین است. از بین توکسین های یادشده انتروتوکسین اهمیت بیماری زایی بیشتری دارد و مصرف مواد غذایی آلوده به آن موجب بروز مسمومیت غذایی می‌گردد(٤و٥). این باکتری در ٢٠ تا ٣٠٪ از جمعیت انسانی بصورت دائم و پایدار و در ٦٠٪ افراد بصورت متناوب وجود دارد، از این رو افرادی که در مراکز تهیه، عمل آوری و توزیع مواد غذایی فعالیت دارند در صورت عدم رعایت مسائل بهداشتی قادر هستند باکتری را به غذا انتقال دهند. انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* که عامل اصلی مسمومیت غذایی است نسبت به حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیکی دستگاه گوارش مقاومت بیشتری دارند و موجب بروز مسمومیت غذایی می‌گردند. وجود انتروتوکسین به میزان بسیار اندک، در حد ٢٠ نانوگرم تا ١ میکروگرم، بسته به نوع انتروتوکسین می‌تواند موجب ایجاد علائم مسمومیت غذایی شود. چنانچه تعداد 10^5 باکتری در هر گرم ماده غذایی وجود داشته باشد، باکتری فرصت رشد و تولید انتروتوکسین را پیدا خواهد نمود و حتی اگر در صورت حرارت، باکتری از بین رفته باشد، به دلیل مقاومت انتروتوکسین به حرارت، توکسین فعال باقی مانده و منجر به بروز مسمومیت غذایی می‌گردد (٤ و ٦). تا کنون ٢٣ نوع انتروتوکسین مختلف استافیلوکوکی شناسایی شده است. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (Staphyloccocal Enterotoxins= SEs) پروتین‌های خارج سلولی تک زنجیری با وزن مولکولی پائین (٢٢-٢٩ کیلو دالتون) می‌باشند که با وجود شباهت فعالیت بیولوژیکی، اما از نظر آنتی‌ژنی با یکدیکر متفاوت هستند (٥). با حرارت دادن غذا با وجود از بین رفتن باکتری، به دلیل مقاومت انتروتوکسین، امکان بروز مسمومیت غذایی وجود دارد (٤ و ٦). تا کنون ٢٣ نوع انتروتوکسین مختلف استافیلوکوکی شناسایی شده است. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (Staphyloccocal Enterotoxins= SEs) پروتین‌های خارج سلولی تک زنجیری با وزن مولکولی پائین (٢٢-٢٩ کیلو دالتون) می‌باشند که با وجود شباهت فعالیت بیولوژیکی، از نظر آنتی‌ژنی با یکدیکر متفاوت هستند (٥). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری به واسطه کروموزوم و پلاسمید کنترل می‌شود. مصرف بیش از حد و بدون نسخه آنتی‌بیوتیک با گذشت زمان، افزایش مقاومت و کاهش میزان حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را به دنبال دارد (٧). بنابر پیشنهاد موسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute= CLSI)، در صورت مقاومت *استافیلوکوکوس اوررئوس* به بیشتر از ٣ گروه آنتی‌بیوتیکی به عنوان مقاومت به چند دارو (Multi Drug Resistant= MDR)، در صورت مقاومت به تمام گروه‌های آنتی‌بیوتیکی به جز ٢ یا سه گروه (Extensively Drug-Resistant= XDR) و در صورت مقاومت به تمام گروه‌های آنتی‌بیوتیکی به عنوان (Pan Drug-Resistance= PDR) در نظر گرفته می شوند (٨). هدف از این پژوهش، شناسایی مولکولی سویه‌های مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اوررئوس* دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در محصولات لبنی سنتی استان فارس بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه و شناسایی اولیه: به صورت مقطعی توصیفی ۳۰۰ نمونه محصولات لبنی سنتی از مناطق مختلف استان فارس جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شد. در تمامی موارد اطلاعات مربوط به نوع محصول لبنی، محل جمع آوری، نوع شیردوشی، نوع حیوان شیرده و فصل نمونه گیری در پرسش نامه تنظیمی ثبت گردید. سپس ۲۵ گرم از نمونه‌ها در ۲۲۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی در حرارت ٤٥ درجه سلسیوس به منظور تهیه رقت استفاده شد، سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصله به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کوک میت (شرکت Merck آلمان) اضافه و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. پس از غنی سازی، کشت در محیط اختصاصی بردپارکر (شرکت Merck آلمان) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت انجام شد. کلنی‌های سیاه یا خاکستری براق و محدب از طریق آزمون‌های تاییدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از روش های متداول میکروب شناسی مانند رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کواگولاز، اکسیداز، تخمیر قند مانیتول، حساسیت به نوبیوسین و DNase جدایه‌های احتمالی خالص سازی شدند (۹). نمونه‌های مورد تایید در محیط اسکیم میلک (شرکت Merck آلمان) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول کشت و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمون تائیدی نگهداری شدند (۱۰).

ب) شناسایی مولکولی جدایه‌ها: استخراج DNA ژنومی مطابق روش مولایی (Mollaei)و راشکی (Rashk) با روش جوشاندن انجام شد (۱۱). به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از پرایمرهای اختصاصی (شرکت پیشگام ایران) پیشنهاد شده توسط چاپاوال (Chapaval) و کریمونیسی (Cremonesi) (جدول ۱) استفاده گردید (۱۲ و ۱۳). مخلوط نهایی واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس رد (شرکت پیشگام ایران)، ۳ میکرولیتر DNA ژنومی که با ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (BioRAD آمریکا) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت سازی ابتدایی در دمای ٩٤ درجه سلسیوس، ۳۲ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ٩٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ٥٥ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (١٤). محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵٪ واجد اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) منتقل و الکتروفورز گردید. قطعات DNA به کمک دستگاه (BioRAD آمریکا) مشاهده و عکس‌برداری شدند (۱۵ و ١٦).

ج) شناسایی مولکولی ژن‌های انتروتوکسین: به منظور شناسایی ژن‌های انتروتوکسین *seg see sed sec seb sea* از واکنش Multiplex PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس رد ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/۵ میکرولیتر و DNA الگو شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) با برنامه حرارتی واسرشت سازی اولیه در ٩٤ درجه سلسیوس به مدت ٤ دقیقه، ۳۲ چرخه واسرشت سازی در دمای ٩٤ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ٥٦ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵٪ واجد اتیدیوم برماید

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

ژن	توالی پرایمر (3′ → 5′)	آمپلیکون	منبع
23S rRNA	AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG TCG CTC GCT CAC CTT AGA AT	499 bp	۱۲
nuc	AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT	400 bp	۱۲
sea	TAA GGA GGT GGT GCC TAT GG CAT CGA AAC CAG CCA AAG TT	180 bp	۱۲
seb	GTATGGTGGTGTAACTGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164 bp	۱۳
sec	ACC AGA CCC TAT GCC AGA TG TCC CAT TAT CAA AGT GGT TTC C	371 bp	۱۳
sed	TCA ATT CAA AAG AAA TGG CTC A TTT TTC CGC GCT GTA TTT TT	339 bp	۱۳
see	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209 bp	۱۳
seg	CCA CCT GTT GAA GGA AGA GG TGC AGA ACC ATC AAA CTC GT	432 bp	۱۳

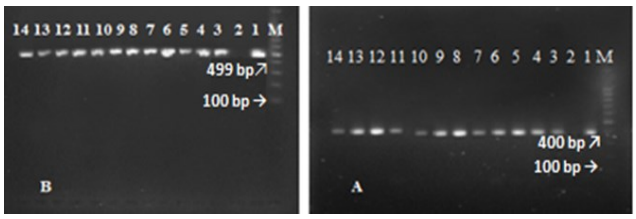
منتقل و الکتروفورز گردید.قطعات DNA به کمک دستگاه (BioRAD آمریکا) مشاهده و عکس‌برداری شدند. در ابتدا تمام نمونه ها با روش PCR منفرد (Single PCR) و سپس با روش PCR چندگانه (Multiplex PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از bp ladder ۱۰۰ استفاده شد (۱۷).

د) سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تعیین حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک (Kirby-bauer) مطابق با دستورالعمل CLSI انجام شد (۱۸). دیسک های مورد استفاده در این مطالعه شامل آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰ unit)، اگزاسیلین (۱۰ µg)، ریفامپین (۵ µg)، نورفلوکساسین (۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، داکسی سیلین (۳۰ µg)، نیتروفورانتوئین (۳۰ µg)، ونکومایسین (۳۰ µg)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (۱/۲۵/۲۳/۷۵ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، سیپروفلوکسازین (۵ µg)، کلیندامایسین (۲ µg) (شرکت پادتن طب ایران)، کینوپریستین/دالفوپریستین (۱۵ µg) و لینزولید (۳۰ µg) (Mast انگلستان) بودند. برای انجام آنتی‌بیوگرام سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) کشت داده شد، در نهایت دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را با فاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۶–۱۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید (۲). از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۴).

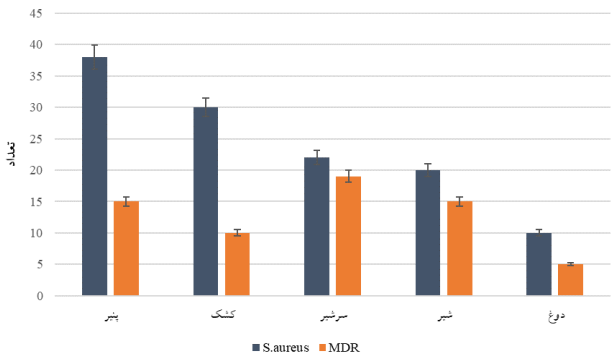
ه) آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نسخه بیست و چهارم نرم‌افزار *SPSS* و آزمون آماری مربع کای انجام گرفت. مرز معنی‌داری روی ($p < 0.05$) قرار داده شد.

یافته‌ها

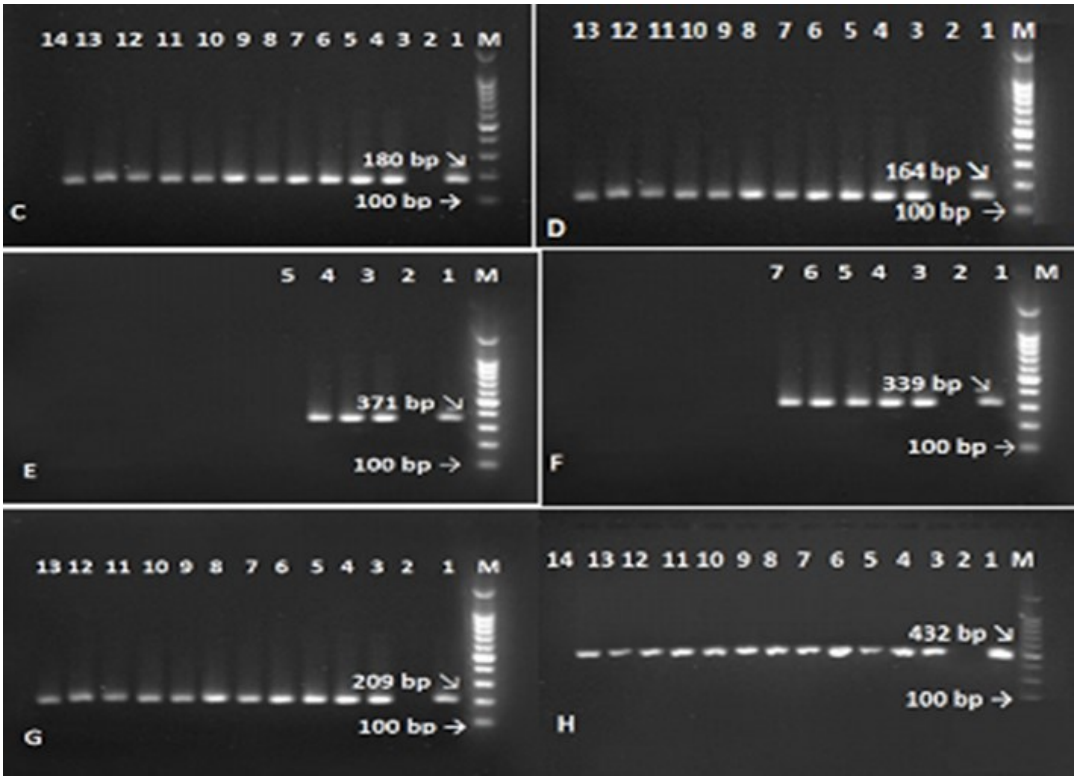
الف) جداسازی باکتری: از مجموع ۳۰۰ نمونه محصول لبنی سنتی مورد تائید با روش بیوشیمیایی و سپس با استفاده از روش مولکولی توالی پرایمر ژن‌های *nuc* (توالی ۴۰۰ جفت بازی) و *23S rRNA* (توالی ۴۹۹ جفت بازی) ۱۲۰ سویه (۴۰٪) به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تایید گردیدند (شکل ۱). بیشترین فراوانی و درصد آلودگی محصولات لبنی سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۸ مورد مربوط به پنیر (۳۱/۶۶٪) و سپس کشک ۳۰ مورد (۲۵٪)، سرشیر ۲۲ مورد (۱۸/۳۳٪)، شیر ۲۰ مورد (۱۶/۶۶٪) و دوغ ۱۰ مورد (۸/۳۳) بودند، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (نمودار ۱). همچنین میزان آلودگی محصولات لبنی سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس نوع حیوان شیرده مربوط به گوسفند ۶۵ مورد (۵۴/۱۷٪)، گاو ۳۵ مورد (۲۹/۱۷٪) و مخلوط شیر گاو و گوسفند ۲۰ مورد (۱۶/۶۷٪) بود. همچنین بیشترین میزان آلودگی محصولات لبنی سنتی بر اساس نوع شیردوشی مربوط به شیردوشی دستی ۸۲ مورد (۶۸/۳۳٪)، شیردوشی مکانیزه ۳۴ مورد (۲۸/۳۳٪) و شیر مخلوط مکانیزه و دستی ۴ مورد (۳/۳۳٪) بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین میزان آلودگی به



شکل ۱: الکتروفورز محصولات ژن *nuc* و ژن *23S rRNA*. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*)، ستون ۳ تا ۱۴: محصول PCR ژن *nuc* با طول ۴۰۰ جفت باز (A)، محصول PCR ژن *23S rRNA* با طول ۴۹۹ جفت باز (B).



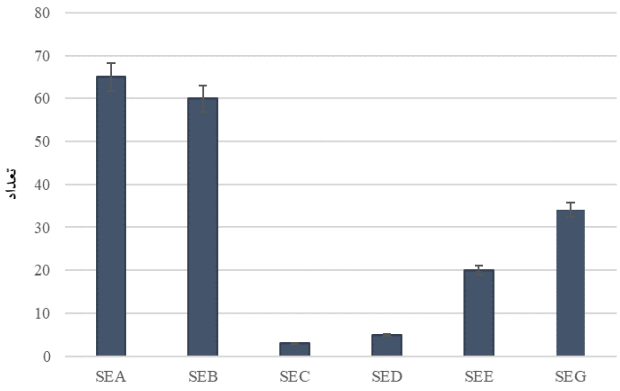
نمودار ۱: آلودگی محصولات لبنی سنتی به جدایه های MDR *استافیلوکوکوس اورئوس*.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات ژن های انتروتوکسین با روش Single PCR. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲: کنترل منفی (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*)، ستون ۳ تا ۱۳: محصول PCR ژن *sea* با طول ۱۸۰ جفت باز (C)، ستون ۳ تا ۱۳: محصول PCR ژن *seb* با طول ۱٦٤ جفت باز (D)، ستون ۳ تا ۵: محصول PCR ژن *sec* با طول ۳۷۱ جفت باز (E)، ستون ۳ تا ۷: محصول PCR ژن *sed* با طول ۳۳۹ جفت باز (F)، ستون ۳ تا ۱۳: محصول PCR ژن *see* با طول ۲۰۹ جفت باز (G)، ستون ۳ تا ۱٤: محصول PCR ژن *seg* با طول ٤۳۲ جفت باز (H).

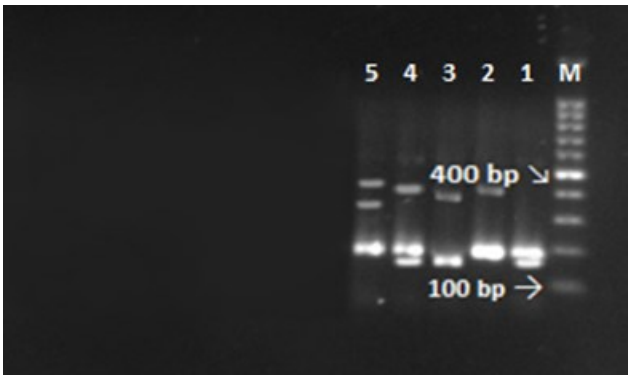
استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به فصل تابستان ٦۳ مورد (۵۲/۵۰٪) بود، اما اختلاف معنی‌داری بین ماه‌های بهار ۵۷ مورد (٤۷/۵٪) و تابستان وجود نداشت. همچنین بین میزان جداسازی باکتری و فصل نمونه گیری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

ب) شناسایی مولکولی ژن‌های انتروتوکسین: به منظور ارزیابی ژن های انتروتوکسین محصولات ژن‌های *sea seb sec sed see seg* مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۲). بیشترین فراوانی ژن های انتروتوکسین مورد بررسی به ترتیب مربوط به *sea* (٦۵ مورد) با فراوانی ۵٤/۱۷٪ و سپس *seb* (٦۰ مورد) با فراوانی ۵۰/۰۰٪، *seg* (۳٤ مورد) با فراوانی ۲۸/۳۳٪، *see* (۲۰ مورد) با فراوانی ۱٦/٦۷٪، *sed* (۵ مورد) با فراوانی ٤/۱۷٪ و *sec* (۳ مورد) با فراوانی ۳/۵۰٪ شناسایی گردید که اختلاف معنی‌داری داشتند (نمودار ۲). نتایج نشان داد که ۹۱ مورد



نمودار ۲: فراوانی ژن‌های انتروتوکسین در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*.

(۷۵/۸۳٪) از جدایه های آلوده حاوی ژن انتروتوکسین بودند و نیمی از جدایه‌های مورد بررسی بیش از یک نوع ژن انتروتوکسین را دارا بودند. همچنین به صورت هم زمان ۲۰ مورد *sea+seb* (۱٦/٦۷٪)، ۱۰ مورد *sea+seg* (۸/۳۳٪) و ۸ مورد *sea+seb+seg* (٦/٦٦٪) شناسایی گردید (شکل ۳).



شکل ۳: الکتروفورز محصولات ژن های انتروتوکسین با روش PCR چندگانه. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: نمونه دارای دو ژن *sea* (۱۸۰ جفت باز) و *see* (۲۰۹ جفت باز)، ستون ۲: نمونه دارای دو ژن *see* (۲۰۹ جفت باز) و *seg* (۴۳۲ جفت باز)، ستون ۳: نمونه دارای دو ژن *sea* (۱۸۰ جفت باز) و *sec* (۳۷۱ جفت باز)، ستون ٤: *نمونه* دارای سه ژن *seb* (۱٦٤ جفت باز)، *see* (۲۰۹ جفت باز) و *seg* (۴۳۲ جفت باز)، ستون ۵: نمونه دارای سه ژن *see* (۲۰۹ جفت باز)، *sed* (۳۳۹ جفت باز) و *seg* (۴۳۲ جفت باز).

ج) *حساسیت آنتی‌بیوتیکی:* بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک ها مربوط به پنی‌سیلین (۹۱/٦۷٪) و کمترین مقاومت مربوط به ونکومایسین (۰٪)، کینوپریستین/ دالفوپریستین (۰٪) و لینزولید (۰٪) بود که اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (جدول ۲). در ٦٤ مورد (۵٦/۳۳٪) از جدایه ها مقاومت چند دارویی شناسایی گردید. بیشترین فراوانی سویه‌های MDR مربوط به سرشیر

جدول ۲: میزان حساسیت جدایه ها به آنتی‌بیوتیک‌ها.

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه مقاوم	مقاوم
پنی‌سیلین	(۸/۳۳)۱۰	(۰)۰	(۹۱/٦۷)۱۱۰
ونکومایسین	(۱۰۰)۱۲۰	(۰)۰	(۰)۰
آمیکاسین	(۸۲/۵۰)۹۹	(۰)۰	(۱۷/۵۰)۲۱
کلرامتیکل	(۹۵/۸٤)۱۱۵	(۰)۰	(٤/۱٦)۵
کلیندامایسین	(۸٦/٦۸)۱۰٤	(۹/۱٦)۱۱	(٤/۱٦)۵
کوتریماکسازول	(۹۵/۸٤)۱۱۵	(۰)۰	(٤/۱٦)۵
سیپروفلوکساسین	(۸۳/۳٤)۱۰۰	(۸/۳۳)۱۰	(۸/۳۳)۱۰
داکسی‌سی‌کلین	(٤۷/۵۰)۵۷	(۵/۸۰)۷	(٤٦/۷۰)۵٦
اریترومایسین	(۵۵/۸۰)٦۷	(۱۱/۷۰)۱٤	(۳۲/۵۰)۳۹
جنتامایسین	(۹۱/٦۷)۱۱۰	(۰)۰	(۸/۳۳)۱۰
لینزولید	(۱۰۰)۱۲۰	(۰)۰	(۰)۰
نیتروفورانتوئین	(۹۵/۸٤)۱۱۵	(۰)۰	(٤/۱٦)۵
اگزاسیلین	(۸٦/٦۸)۱۰٤	(۰)۰	(۱۳/۳۰)۱٦
نورفلوکساسین	(۸۷/۵۱)۱۰۵	(٤/۱٦)۵	(۸/۳۳)۱۰
ریفامپین	(۹۱/٦۷)۱۱۰	(۰)۰	(۸/۳۳)۱۰
کینوپریستین	(۱۰۰)۱۲۰	(۰)۰	(۰)۰

۱۹ مورد (۲۹/٦۸٪) و کمترین فراوانی سویه‌های MDR مربوط به کشک ۱۰ مورد (۱۵/٦۲٪) بود (نمودار ۱). میزان فراوانی سویه‌های MDR دارای ژن های انتروتوکسین ٥٤ مورد (۸٤/۳۸٪) بودند که نسبت به سایر جدایه ها اختلاف معنی‌داری داشتند.

بحث

ارزش غذایی و نقش شیر و فرآورده های لبنی در تغذیه انسان همواره مورد توجه تمام کشورهای پیشرفته دنیا می باشد. اما با وجود ویژگی‌ها ممتاز غذایی شیر،امکان آلودگی توسط انواع باکتری های بیماری زا به ویژه با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد. چنانچه در مراحل مختلف تولید، دوشیدن، حمل و نقل، فرآوری در کارخانه، توزیع و مصرف شیر دقت کافی نشود، امکان بیماری زایی و عوارضی ناشی از آن در انسان وجود دارد. همچنین ورود *استافیلوکوکوس اورئوس* از درون پستان به شیر و یا حتی از راه پوست و مخاط حیوانات و آلوده سازی وسایل شیر دوشی امکان پذیر است (۲۰). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل فرصت‌طلب بیماری‌زا می‌باشد که در شرایط مساعد قادر به ایجاد عفونت می باشد. مسمومیت غذایی استافیلوکوکوسی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی است که به دلیل شیوع گسترده *استافیلوکوکوس اورئوس* و توانایی بسیاری از سویه‌های آن در تولید انتروتوکسین‌های مختلف می باشد (۲۱). در این مطالعه، ٤۰٪ لبنیات سنتی مورد مطالعه آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. این میزان در محصولات لبنی سنتی در تهران ۳۲٪ و در آگرا در هندوستان میزان آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر و فرآورده‌های لبنی ٦۰/۵٦ درصد گزارش شده است (۲۲ و ۲۳). علیزاده (Alizadeh) و امینی (Amini) سال ۲۰۱۵ در سیرجان با ارزیابی ۱۲۰ نمونه ماده غذایی مختلف، ٤۰ مورد (۳۳/۳٪) جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی نمودند (۲). به نظر می رسد تفاوت نتایج مطالعات یاد شده مربوط به گوناگونی مکان های مورد پژوهش و همچنین تفاوت در نوع محصولات لبنی مورد ارزیابی باشد. در مطالعه محمدی

ثانی (Mohammadi Sani) در شهرستان مشهد بر روی ٤٤٤ نمونه پنیر، اختلاف معنی‌داری بین جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در فصل بهار و تابستان مشاهده نشد (٢٤)، که با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم خوانی دارد. این مساله به دلیل یکنواختی و گرمای هوا در فصول مورد بررسی قابل انتظار بود (١). در این پژوهش بیشترین میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس نوع محصول لبنی، مربوط به پنیر ٣٨ مورد (٣١/٦٦٪) و بر اساس نوع حیوان شیرده، مربوط به شیر گوسفند ٦٥ مورد (٥٤/١٧٪) می‌باشد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت. در مطالعه ملاعباس‌زاده (Molla Abaszadeh) و حاجی شیخ‌زاده (Haji Sheikhzadeh) بیشترین میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* ٢٥ مورد (٣١/٢٥٪) پنیرهای سنتی تهیه شده از شیر گوسفند بود که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد (٢٥). *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تولید طیف وسیعی از پروتئین‌ها ازجمله انتروتوکسین است که می‌تواند باعث ناراحتی‌های گوارشی و مسمومیت‌های غذایی در افراد شود. شیوع مسمومیت با انتروتوکسین A استافیلوکوکوسی بیشتر از سایر انتروتوکسین‌ها است. برای شناسایی انتروتوکسین‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از انواع روش‌های مختلفی مانند آگلوتیناسیون لاتکس، الایزا، ایمونودیفیوژن و رادیو ایمنواسی استفاده می‌شود. در تمامی روش‌های یاد شده نیاز به فراهم شدن شرایطی برای بیان شدن ژن SEs وجود دارد. اما ممکن است باکتری در شرایط خاص با وجود داشتن ژن تولیدکننده توکسین، قادر به تولید آن نباشد و در نتیجه امکان پاسخ منفی نتایج وجود دارد. همچنین روش های یاد شده بسیار زمان بر هستند و امکان ایجاد واکنش‌های متقاطع و پاسخ‌های کاذب را دارند. اما در روش مولکولی که مبتنی بر شناسایی ژن های توکسین هستند، می‌توان پیش از تولید سم توسط باکتری، ژن‌های رمزکننده SEs را شناسایی و دسته‌بندی نمود. این روش‌ها علاوه بر داشتن سرعت بالا، از حساسیت و اختصاصیت بالایی نیز برخوردار هستند (٢٦). مطالعه موراندی (Morandi)و همکاران در سال ٢٠٠٦ به منظور تشخیص انتروتوکسین های استافیلوکوکی کلاسیک (SEA-SEE) و حضور ژن های آن در شیر و محصولات لبنی انجام شد. محققین یادشده با ارزیابی شیرهای گاو، گوسفند، بز، بوفالو و محصولات لبنی از ١١٢ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در ٦٧٪ از سویه‌ها ژن های انتروتوکسین را شناسایی کردند. در پژوهش حاضر ٧٥/٨٣٪ از جدایه ها دارای ژن های انتروتوکسین بودند که مقایسه نتایج بدست آمده از این دو مطالعه با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد (٢٧). ویکوسا (Vicosa) و همکاران در سال ٢٠١٣ به منظور شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از شیرخام و پنیر با جداسازی ٩٢ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، گزارش نمودند که ٩١ مورد از سویه ها (٨٧/٨٪) حداقل یک ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی را داشتند (٢٨). مشعوف (Mashouf) و همکاران بیشترین فراوانی (٢٥/٥٪) را مربوط به ژن *sea* گزارش نمودند (٢٩). در مطالعه‌ی حاضر نیز بیشترین فراوانی مربوط به *sea* (٥٤/١٧٪) بود. در مطالعه‌ای که بر روی ٥٢ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گوسفندی در شمال فلسطین انجام شده است، در بیشتر نمونه‌ها (٥٤/١ درصد) ژن *seb* شناسایی شد. نتایج یادشده با پژوهش حاضر که فراوانی ژن *sea* بیشتر از سایر ژن‌ها بود، هم خوانی ندارد (٣٠). دلیل این مساله می تواند، تفاوت در شیوع جغرافیایی و دوره‌ای *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا در مناطق مختلف باشد (٣١). ایمان فولادی (Imani Fooladi) و همکاران با ارزیابی ژن‌های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در محصولات لبنی نشان دادند که اغلب نمونه ها یکی از ژن های *sea* و *seb* یا هر دو را دارند. محققین یادشده نشان دادند که به ترتیب ١٥/٦، ٩/٣ و ٦/٢ درصد جدایه ها ژن‌های *sea* ،*seb* و *sea+seb* دارند (٣٢). این نتایج با پژوهش حاضر هم خوانی داشت، اما نکته شایان توجه در مطالعه ما وجود همزمان *sea+seb* (١٦/٦٧٪، *sea+seg* (٨/٣٤٪) و *sea+seb+seg* (٦/٦٦٪) بود. امروزه استفاده گسترده و نابجا از آنتی‌بیوتیک‌ها، موجب ایجاد پدیده مقاومت و ظهور مقاومت چند دارویی شده است. *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله این باکتری‌ها می‌باشد که طی

سال های متمادی به طور چشم گیری به اکثر آنتی‌بیوتیک ها مقاوم شده است (۳۳). بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پژوهش حاضر مربوط به پنی‌سیلین با ۱۱۰ مورد (۹۱/٦۷٪) که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، لینزولید و کینوپریستین بود. قاضوی (Ghazavi) و همکاران در سال ۲۰۱۸ از ۸۱۵ نمونه مورد بررسی، در ۱۰۷ سویه (٤۲/۹۹٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی کردند و همچنین بالاترین میزان مقاومت مربوط به پنی سیلین ۸۸/۷۸٪ گزارش نمودند (۱۹). ما (Ma) و همکاران سال ۲۰۱۸ و ژوگ (Zhuge) و همکاران سال ۲۰۱۵ بیشترین مقاومت را به پنی‌سیلین ۹۲/٤۷٪ و ۹۵/۹۲٪ گزارش نمودند (۳٤-۳۵). مقایسه نتایج بدست آمده از این چند مطالعه هم‌خوانی و مشابهت نتایج را بیان می‌کند. تیهو (Teyhoo) و همکارانش در تبریز در سال ۲۰۱۱ با ارزیابی ۱۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت تمام جدایه ها به آنتی‌بیوتیک لینزولید را گزارش نمودند که از لحاظ آماری با مطالعه ما هم‌خوانی دارد (۳٦). مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک و همچنین مصرف آنتی‌بیوتیک‌های جدید، موجب ایجاد مقاومت چند دارویی گردیده است. در این پژوهش، ٦٤ مورد (٥٦/۳۳٪) سویه های مورد بررسی دارای مقاومت چندگانه بودند. در مطالعه کومار (Kumar) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در هند که بر روی ۱۹۵ نمونه شیر صورت گرفت، ۱۰۷ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید، از این تعداد ۳٤ سویه به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی حساس بودند و همه جدایه ها نسبت به ونکومایسین حساسیت داشتند و با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۷). از مجموع جدایه های آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* در این پژوهش ۹۱ مورد (۷۵/۸۳٪) از جدایه ها انتروتوکسیژنیک بودند. میزان مقاومت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن‌های انتروتوکسین نسبت به ۱٦ آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت، بیشترین میزان مقاومت جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن‌های انتروتوکسین نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین، اریترومایسین و داکسی‌سیلین و به تربیت با فراوانی ۹۱/٦۷٪، ۸۷/۰٤٪ و ۷۹/٦۳٪ مقاوم بود. فراوانی ژن‌های انتروتوکسین، در سویه های مقاوم به چند دارو ٥٤ مورد (٥۹/۳٤٪) بود. نتایج نشان داد که در جدایه های واجد ژن‌های انتروتوکسین، بین مقاومت به پنی سیلین، اریترومایسین و داکسی سیلین با سایر آنتی بیوتیک ها اختلاف معنی داری وجود دارد. همچنین *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل داشتن عوامل بیماری زایی مانند چسبنده ها (adhesins) و ویژگی تشکیل بیوفیلم می تواند موجب افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و بروز بیماری های مزمن مانند استئوئیلیت، اندوکاردیت و عفونت زخم گردد (۳۸ و ۳۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در اغلب نمونه‌های محصولات لبنی سنتی را نشان داد. این مساله تاکید کننده خطر بالقوه مسمومیت غذایی در مصرف کنندگان محصولات لبنی سنتی به ویژه در غیاب روش‌های بهداشتی و ممانعت کننده از تولید انتروتوکسین می‌باشد. همچنین گسترگی شیوع جدایه های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند دارو در محصولات لبنی سنتی می تواند مشکل جدی برای سلامت جامعه باشد. از این رو پایش مداوم جدایه‌های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر پاتوژن های منتقل شونده از مواد غذایی لبنی با روش های تشخیص مولکولی هم زمان مانند Multiplex touchdown PCR و Multiplex real-time PCR (٤۰ و ٤۱) همچنین انجام مطالعات دقیق و پیشرفته‌تر اپیدمیولوژیک با روش‌هایی مانند تایپینگ توالی چندجایگاهی (MLST= Multilocus Sequence Typing) و تایپینگ توالی چند ژن بیماری‌زایی (MVLS=Multivirulence-Locus Sequence Typing) پیشنهاد می‌گردد (٤۲).

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار

دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد جهرم و جناب آقای مسعود رحمانیان کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی به دلیل حمایت های اجرایی و پژوهشی کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Eslami M, Koohi MK, Zadehashem E, Khadiri B, Keshavarz H. Survey the Presence of Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* in Cottage Cheeses Produced from Sheep Milk and Sold in Marand County. J Food Sci Tech. 2015; 12(46): 211-218.
2. Alizadeh S, Amini K. Determining the Presence of Virulence Genes Panton Valentine Leukocidin Pvl and Methicillin Resistance Gene Meca in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Food Samples by Multiplex PCR and Antibiotic Resistance. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2015; 14(5): 27-34[In persian].
3. Mahdavi S. Prevalence of Six Genes Encoding Enterotoxins Production of *Staphylococcus aureus* Isolated from White-Brined-Cheese by Multiplex PCR. J Food Hygiene. 2014; 3(4): 1-7.
4. Tavakoli H R, jodayi A A, Imani Foladi A A, sarshar M, Rafati H, Asadi bagh asiab B. Comman Types Of *Staphylococcus Aureus* Enterotoxin In Meaty Foods. Iran J Clin Infect Dis Trop Med. 2013; 17(59): 9-15.
5. Podkowik M, Park J, Seo K, Bystroń J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. International. J food microbiol. 2013; 163: 34-40.
6. Luss JP, Vantonder I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. J Food Control. 2007; 18(4): 326-332.
7. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the Antibiotic Resistance Pattern in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples Obtained from Patients Hospitalised in Imam Reza Hospital, Kermanshah. J Microbial World. 2014; 6(4): 209-311.
8. Magiorakos A. Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, Olsson-Liljequist B. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin microbiol infect. 2012; 18(3): 268-281.
9. Mirzaei H, Javadi A, Farajli M, Shah-Mohammadi A, Monadi A, Barzegar A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. J Vet Res. 2012; 1.70-65 :)*67*(
10. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 1000-1018.

11. Mollaei M, Rashki A. The Prevalence of Adhesive Surface Encoding Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Hospitalized Patients in Zabol-Iran by Multiplex PCR. J Fasa Univ Med Sci. 2016; 6(3): 296-302.

12. Chapaval L, Moon D, Gomes J, Duarte F, Tsai S. Use of PCR to Detect Classical Enterotoxins Genes and Toxic Shock Syndrom Toxin-1 Gene (*tst*) in Staphylococcus aureus Isolated from Crude Milk and Determination of Toxin Productivites of S.aureus. Arq Inst Biol, Sao Paulo. 2006; 73(2): 165-169.

13. Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B. 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.

14. Mahdiyoun, S M, Ahanjan M, Goudarzi M, Rezaee R. Prevalence of Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Determining Aminoglycoside Resistance Gene by PCR in Sari and Tehran Hospitals. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(128): 97-107 [In persian].

15. Nazari R, Godarzi H, Rahimi Baghi F, Moeinrad M. Enterotoxin Gene Profiles among *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk. Iran J Vet Res. 2014; 15(4): 409.

16. Alni, R, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P, Alikhani M. Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin (tsst) Gene Among *Staphylococcus aureus* Isolated from Patients and Healthy Carriers. Avicenna J Clin Microbiol Infect. 2018; 5(1): 1-5.

17. MahdaviS. Prevalence of Six Genes Encoding Enterotoxins Production of *Staphylococcus aureus* Isolated from White-Brined-Cheese by Multiplex PCR. Journal of Food Hygiene. 2014; 3(4): 1-7.

18. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 30th ed. CLSI Supplement M100, CLSI, Wayne, Pa, USA; 2020.

19. Ghazavi N, Rahimi E, Esfandiari Z, Shakerian A. Enterotoxigencity, distribution of enterotoxigenic genes and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isilated from traditional sweet. Tropical Biomedicine. 2018; 35(4): 880-892.

20. Shekarforoush SS, N Rokni, G Karim, Rohani Razavi SM, Kiaie S M M, Abbasvali M. Study on the Overview on Food Borne Bacteria in Foodstuffs with Animal Origin in Iran, Part Two: Meat and Meat Products. J Food Hyg. 2012; 2(3): 1-14.

21. Sadeghi, M R. The prevalence of Enterotoxigenic Isolates of *Staphylococcus aureus* in Bovine and Sheep Bulk Tank Milk Samples of Maku. J Vet Microbiol. 2015; 11(1): 27-38.

22. Imani-Fooladi A.A, Riazipour M, Sattari M. Molecular and serological detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. J Shahrekord Univ Med Sci. 2010; 11(4): 19–26. [persian]

23. Singh P, Prakash A. Prevalance of coagulase positive pathogenic *Staphylococcus aureus* in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. Journal Guide-Acta Agriculturae Slovenica. 2010; 96(1): 37–41.

24. Mohammadi Sani A. The survey of the distributed cheese to listeria monocytogen, *Staphylococcus aureus* and Ecoli pathogens in Mashhad and Ghochan. Twelf th national congress of Iran environment health, Shahid Beheshti medical sciences university. 522-533.

25. Molla Abaszadeh H, Haji Sheikhzadeh B. Surveying the contamination rate, sensibility and antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from Traditional cheese consumed in Qotur of Khoy province. J Fasa univ med sci. 2014; 4(2): 209-217.

26. Abbasi S, Taei S, Zamanzad B. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains producing enterotoxin A and B. Tehran Univ Med J. 2016; 73(11):778-83 [In persian].

27. Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. Vet microbiol. 2007; 124: 66-72.

28. Vicosa GN, Le Loir A, Le Loir Y, de Carvalho AF, Nero LA. egc characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates obtained from raw milk and cheese. Int J Food Microbiol. 2013; 165: 227-30.

29. Mashouf R, Hosseini S.M, Mousavi S.M. Arabestani M. Prevalence of Enterotoxin Genes and Antibacterial Susceptibility Pattern of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Animal Originated Foods in West of Iran. Oman med j. 2015; 30 (4): 283.

30. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. Turk J Biol. 2005; 29: 229-232.

31. Ahmadi E, Ghuzivandi A, Ebrahim Pourbaser, K, Karimi Dareabi, H. Identification of sea and seb frequency in *Staphylococcus aureus* isolated from cow, sheep and goat mastitic milk samples in Sanandaj city. Iran Vet J. 2018; 14(2): 5-13.

32. Imani Fooladi A.A, Tavakoli H.R, Naderi A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iran J Microbiol. 2010; 2(3): 137–142.

33. Khazaei S, Pourtahmaseby P, Kanani M, Madani S.H, Malekianzadeh E. *Staphylococcus aureus* Resistance to Vancomycin: A Six Years Survey,(2006-2012). Med J Tabriz Univ Med Sci Health Services. 2013; 35(5): 40-45.

34. Ma Y, Zhao Y, Tang J, Tang C, Chen J, Liu J. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance & enterotoxins/enterotoxin-likes genes in *Staphylococcus aureus* from food. CyTA-J Food. 2018; 16(1): 76-84.

35. Zhuge S.Y, Tan D.M, Li X.G. Research on Staphylococcus aureus enterotoxin property and drug resistance in quick frozen flour product in Guangxi. Mod Prev Med. 2015; 42: 1765-1767.

36. Teyhoo M, Mobin M, Mozafari NA, Moadab SR, Sedigh Bayan KH, Mones Rast SH. The prevalence of Toxic shock syndrome toxin -1 (TSST-1) producing clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strain isolated from shohada hospital in Tabriz, Iran. Med lab j. 2011; 5 (1): 38-44.[persian]

37. Kumar R, Yadav B, Singh R. Antibiotic Resistance and Pathogenicity Factors in *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitic Sahiwal Cattle. J of biosciences. 2011; 36(1): 175-88.

38. Parastan R, Kargar M, Solhjoo K,Kafilzadeh F. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. Gene Reports.2020; 20, 100739.

39. Parastan R, Kargar M, Solhjoo K,Kafilzadeh F. A synergistic association between adhesion-related genes and multidrug resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolates from different patients and healthy individuals. Journal of Global Antimicrobial Resistance.2020; 22: 379-385.

40. Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M. Multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodbornepathogens in raw milk. Journal of Applied Microbiology.2019; 127:262-273.

41. Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M. Developing a multiplex real-time PCR with anew pre-enrichment to simultaneously detect four foodborne bacteria in milk. Future Microbiol. 201914(10):885–898.

42. Dahyot S, Lbeurre J, Argemi X, Francois P, Lemee L, Prevost G, et al. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping *Staphylococcus lugdunensis*. Sci Rep. 2018; 8: 1-11.