

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

ابراهیم رحیمی<sup>۱\*</sup>، امیر شاکریان<sup>۱</sup>، فروغ علیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران  
<sup>۲</sup> دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱

## چکیده

انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارتوس از مهم ترین عوامل مسمومیت های غذایی در جهان محسوب می شوند و شیر و فرآورده های آن غالباً در مسمومیت های استافیلوکوکال نقش دارند. این مطالعه با هدف بررسی حضور انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکوس ارتوس در شیر خام گاو، شتر، گوسفند و بز در استان فارس انجام شد. به این منظور ۸۴ نمونه شیر شامل شیر گاو (n=۳۵)، شیر شتر (n=۸)، شیر گوسفند (n=۲۰) و شیر بز (n=۲۱) از مخازن جمع آوری شیر ۳۵ مزرعه پرورش دام شیری در طول سه فصل پاییز، زمستان ۱۳۸۹ و بهار ۱۳۹۰ جمع آوری و به منظور تعیین حضور انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارتوس به روش الایزا مورد آزمون قرار گرفتند. از ۸۴ نمونه ی مورد مطالعه ۱۲ نمونه ی (۱۴/۲٪) حداقل از نظر یک انتروتوکسین مثبت گزارش شدند. از این تعداد، ۳ نمونه برای SEA (۲۵ درصد)، ۲ نمونه برای SED (۱۶/۶ درصد)، ۲ نمونه برای SEC (۱۶/۶ درصد)، ۲ نمونه برای SEA+SED (۸/۳ درصد)، ۱ نمونه برای SEA+SEC (۸/۳ درصد) و ۲ نمونه برای SED+SEC (۱۶/۶ درصد) مثبت بوده و هیچ یک از نمونه ها از نظر وجود SEB و SEE مثبت گزارش نشد. هیچ اختلاف آماری در میزان آلودگی نمونه های شیر به انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارتوس در فصول مختلف سال در نمونه های مورد بررسی مشاهده نشد. مطالعات بیشتری در خصوص حضور انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارتوس در مواد غذایی مختلف و نقش آن ها در ایجاد مسمومیت های غذایی پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: انتروتوکسین، استافیلوکوکوس ارتوس، شیر خام.

## ۱- مقدمه

پس از نمونه‌گیری از نظر حضور انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس با استفاده از روش الیزا مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مطالعه تجربی، نمونه‌ها به طور تصادفی ساده از بین دامداری‌های استان فارس انتخاب شدند. تعداد نمونه‌های اخذ شده در فصول پاییز، زمستان و بهار به ترتیب ۱۶، ۳۰ و ۳۸ نمونه بود.

## ۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌ها

مطابق دستور العمل ارائه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و حداکثر در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتیگراد و با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، لایه‌ی چربی سطح نمونه‌ها برداشته شد. فاز آبی به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطرسترون رقیق و با کمک فیلترهای سرنگی میلی پور ۰/۲۲ میکرون (Merck, Germany) فیلتر شدند.

## ۲-۳- روش آزمایش

کیت الیزا 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. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتری به حفره‌های میکروپلیت اضافه و سپس به مدت ۱ ساعت به دور از نور و در درجه حرارت ۲۵-۲۰ 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 ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شست و شو، شسته شد (عمل شست و شو دوبار تکرار گردید) و هر بار بعد از تخلیه‌ی مایع شست و شو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا کاملاً باقیمانده آب شست و شو خارج شود. بدین ترتیب، موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده‌اند خارج شدند. سپس، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگ شده با آنزیم به حفره‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در گرم خانه ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفت. بعد از این زمان، مایع موجود در حفره‌ها به طول کامل تخلیه شد. سپس، همه‌ی حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص

استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان سومین عامل مهم بیماری‌های منتقله از غذا در جهان محسوب می‌شود (۱۵، ۲۶). این باکتری، توانایی رشد و تولید انتروتوکسین‌های مختلف را در محدوده‌ی وسیعی از شرایط مختلف در انواع مواد غذایی دارد لذا این باکتری را جزء یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت زایی مواد غذایی قرار داده‌اند (۱۴). 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 (۷، ۱۰، ۱۷). آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به استافیلوکوکوس ارئوس ممکن است به طور اولیه و یا در طول فرآیند تولید و نگه داری صورت پذیرد (۴). 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 می‌کنند (۳ و ۸). مسمومیت استافیلوکوکی نتیجه‌ی مصرف غذاهای آلوده به انتروتوکسین‌های تولید شده توسط استافیلوکوکوس ارئوس می‌باشد (۱۳). انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس انتروتوکسین‌های A, B, D, E معرفی شده‌اند و انتروتوکسین A معمولی‌ترین انتروتوکسین باز یافت شده از غذاهای عامل مسمومیت‌های غذایی بوده است (۵).

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 انتروتوکسین‌های A, B, C, D, E در شیر خام گاو، گوسفند، بز و شتر به روش الیزا طراحی و انجام شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

از مرداد ماه ۱۳۸۷ الی دی ماه ۱۳۸۸ در مجموع ۸۴ نمونه شیر گاو، گوسفند، بز و شتر از مراکز پرورش دام استان فارس جمع‌آوری و در اسرع وقت در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل و حداکثر ۱۲ ساعت

به استافیلوکوکوس ارئوس متغیر و از ۵ درصد تا بیش از ۷۰ درصد می باشد و بیش از ۵۰ درصد از استافیلوکوکوس ارئوس های جدا شده از شیر و فرآورده های آن قادر به تولید انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس بوده اند و میزان آلودگی شیر و فرآورده های آن به این توکسین ها ۲ تا ۳۰ درصد گزارش شده است (۵، ۱۳، ۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۳، ۲۴). که اکثراً با نتایج به دست آمده از مطالعه ی حاضر همخوانی دارد. تفاوت نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف را می توان به اختلاف در روش های نمونه گیری فصل سال، موقعیت جغرافیایی و روش های آزمایش نسبت داد.

در بین انتروتوکسین های کلاسیک تشخیص داده شده انتروتوکسین A در ۳ نمونه، انتروتوکسین D در ۲ نمونه، انتروتوکسین C و D در ۲ نمونه شناسایی شد. در حالی که انتروتوکسین E و B در هیچ یک از نمونه های بررسی شده مشاهده نگردید. در شیر گاو عمدتاً انتروتوکسین های A و D در شیر گوسفند و بز عمدتاً انتروتوکسین C مشاهده شد (جدول ۱). انتروتوکسین A و پس از آن انتروتوکسین D سمی ترین و شایع ترین عامل مسمومیت غذایی در بین انواع انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس شناخته شده است (۱۲، ۲۰). اگر چه به روش الایزا تنها قادر به ردیابی انتروتوکسین های کلاسیک (A-E) در مواد غذایی هستیم و این تکنیک قادر به ردیابی سایر انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارئوس نمی باشد اما گزارش شده ۹۵ درصد از مسمومیت های غذایی استافیلوکوکوس مربوط به انتروتوکسین های A تا E می باشد (۵) و تنها ۵ درصد از مسمومیت های استافیلوکوکوس مربوط به سایر انتروتوکسین های آن بوده است. مطابق نظریه Tranter (۱۹۹۶) اگر چه مقدار انتروتوکسین لازم جهت بیماری مشخص نشده است اما حداقل ۱ گرم توکسین در ۱۰۰ گرم غذا جهت بروز علائم مسمومیت کافی است (۲۷).

داده های این مطالعه، نشان داد فراوان ترین انتروتوکسین ردیابی شده در نمونه های 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 (۲۰۰۷)، Rall و همکاران از برزیل (۲۰۰۷)، Zouharova و همکاران از جمهوری چک (۲۰۰۸)، Jorgensen و همکاران از نروژ (۲۰۰۵)، Akineden و همکاران از آلمان (۲۰۰۸) مشابه است (۱، ۱۰، ۱۸، ۲۳ و ۲۸).

شست و شو، شسته شد. عمل شست و شو دوبار تکرار گردید و هر بار بعد از تخلیه ی مایع شست و شو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می گرفت تا کاملاً باقیمانده آن شست و شو خارج شود. سپس، ۵۰ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر کروموژن به هر حفره اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵-۲۰ درجه ی سانتیگراد در تاریکی گرم-خانه گذاری شد. در نهایت برای توقف واکنش محلول قطع واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره ها اضافه شد و میزان جذب هر نمونه با قرائت کننده الایزا (Stat Fax 2100, England) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت و اطلاعات مربوط به میزان جذب (OD) هر حفره به تفکیک ثبت شد.

## ۲-۴- کنترل کیفیت آزمون

بر اساس دستور العمل شرکت سازنده ی کیت، میزان جذب (OD) کنترل مثبت باید برابر یا بیش تر از ۰/۵ واحد و میانگین میزان جذب (OD) برای کنترل منفی باید مساوی یا کم تر از ۰/۳ باشد.

## ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

یافته های به دست آمده از آزمایش و اطلاعات جمع آوری شده با نرم افزار SPSS/16 و دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

در این مطالعه، مجموعاً ۸۴ نمونه شیر خام گاو، شتر، گوسفند و بز با هدف بررسی حضور انتروتوکسین های کلاسیک (A, B, C, D, E) استافیلوکوکوس ارئوس به روش الایزا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد ۱۴/۲ درصد نمونه ها حامل حداقل یک انتروتوکسین کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس بوده است به ترتیب از ۳۵ نمونه شیر گاو، ۲۰ نمونه شیر گوسفند و ۲۱ نمونه شیر بز، ۶ (۷/۱ درصد)، ۳ (۳/۵ درصد)، و ۳ (۳/۵ درصد) نمونه حامل انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس تشخیص داده شد. هیچ یک از نمونه های شیر شتر از نظر این انتروتوکسین ها مثبت نبود. ۷ نمونه حامل تنها یک نوع انتروتوکسین و ۵ نمونه حامل دو انتروتوکسین بودند (جدول ۱). مطالعات مختلف نشان می دهد میزان آلودگی نمونه های شیر خام

جدول ۱- 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
گاو	۳۵	۶	۳	-	۱	۲	-
گوسفند	۲۰	۳	-	۲	۱	-	-
بز	۲۱	۳	-	-	-	-	۱
شتر	۸	۰	-	-	-	-	-
مجموع	۸۴	۱۲	۳	۲	۲	۲	۱

جدول ۲- شیوع فصلی آلودگی نمونه‌های شیر گاو، گوسفند و بز به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس ارئوس

فصل	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت	آنتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس				
			A	C	D	A+D	A+C
پاییز	۳۰	۷	۳	۲	-	۱	۱
زمستان	۱۶	۲	-	-	۱	۱	-
بهار	۳۸	۳	-	-	۱	-	-
مجموع	۸۴	۱۲	۳	۲	۲	۲	۲

است (۱۵). در مطالعه‌ی Pereira و همکاران (۲۰۰۹) نیز هیچ یک از استافیلوکوکوس ارئوس‌های جدا شده از مواد غذایی در پرتغال حامل ژن‌های مولد انتروتوکسین e و b نبوده است (۲۱). 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 (۷ و ۲۴).

جدول ۲ 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 (۲۳/۳ درصد) و به دنبال آن فصل زمستان (۱۲/۵ درصد) و بهار (۷/۹ 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

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 ( ۱، ۲، ۶، ۹، ۱۷ و ۲۵).

از بین نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه هیچ یک از نمونه‌ها حامل انتروتوکسین B و E نبود. مطالعه‌ای از Zouharova و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان می‌دهد از ۷۰/ 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 ۱۰ درصد از سوش‌ها حامل ژن مواد انتروتوکسین b بوده‌اند (۲۸). همچنین، نتایج مطالعه Morandi و همکاران (۲۰۰۷) از ایتالیا در خصوص تعیین انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس ارئوس از شیر و فرآورده‌های آن حاکی از آن است که هیچ یک ۱۲ نمونه حامل انتروتوکسین E نبوده است تنها ۱ نمونه حامل انتروتوکسین B بوده

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 aureus* 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, Poggio A, et al. 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus*

همکاران (۲۰۱۱) حاکی از آن است که اختلاف آماری معنی داری در شیوع آلودگی شیر گاو به انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکوس ارتوس در فصول مختلف سال وجود نداشته است (۲۲).

نتایج این مطالعه، نشان می دهد در شیر و به دنبال آن فرآورده های شیر می توانند به عنوان عوامل مهم مسمومیت استافیلوکوکی در ایران مطرح باشند با این وجود مطالعات اپیدمیولوژیک بیش تری جهت بررسی حضور انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارتوس، قدرت توکسین زایی این پاتوژن در مواد غذایی و بررسی ژن های مولد انتروتوکسین و عامل حدت استافیلوکوکوس ارتوس جدا شده از مواد غذایی لازم به نظر می رسد.

#### ۴- سپاس گذاری

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

#### ۵- 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 A in 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.

aureus enterotoxigenic strains from bulk tank milk. *Zoonoses and Public Health*, 55: 279-330.

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, Fernandes Jr, Candeias JMG, et al. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from 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*