تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

توزیع فراوانی توکسین1- سندروم شوک توکسیک (TSST-1) در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان شهداء تبریز

مرتضی تیهو
گروه میکروبیولوژی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

هائده مبین
گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

نور امیر مظفری
گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی ایران

سیدرضا مودب
گروه میکروبیولوژی ، دانشکده پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

خسرو صدیق بیان
گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

شفیقه مونس راست
کارشناس آزمایشگاه بیمارستان شهداء تبریز

نویسنده مسئول: مرتضی تیهو

تلفن :

پست الکترونیک:
Morteza_teyhoo@yahoo.com

آدرس : دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

وصول مقاله: 90/6/21
اصلاح نهایی: 90/10/5
پذیرش مقاله:90/10/10

چکیده

زمینه و هدف *:استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت های کسب شده از بیمارستانها و اجتماع می باشد. انترو توکسین ها و توکسین1- سندروم شوک توکسیک مترشحه از این باکتری از دسته فاکتورهای ویرولانس بسیار مهم وجزء سوپرآنتی ژنهای توکسین پیروژنیک(PTSAgs) می باشند. هدف این مطالعه، شناسایی ژن tst در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان شهداء تبریز می باشد.*

روش بررسی: *در طول دوره یکسال 1389-90، تعداد 1454 نمونه از بیماران مختلف بستری در بیمارستان شهداء تبریزجمع آوری و مورد بررسی قرار گرفت. پس از جداسازی و خالص سازی ، ایزوله های مورد مطالعه با آزمایشهای بیوشیمیائی مورد شناسایی و تعیین هویت نهایی واقع شدند. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده با روش دیسک دیفیوژن آگار تعیین شد. پس از استخراج DNA ژنومی سویه های ایزوله شده با روش جوشاندن، وجود ژن tst با روش PCR بررسی شد.*

یافته‌ها*: در طول دوره مطالعه از 546 مورد کشت مثبت ، تعداد 100 ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های اخذ شده از بیماران جدا گردید که فراوانی آن در کل مراجعین 6/87% و در موارد کشت مثبت 18/3% می باشد. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که تمام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به لینزولید حساس(و 83% آنها به متی سیلین مقاوم) بودند. ژن tst در20 ایزوله (20%) از استافیلوکوکها شناسائی شد که 8 مورد از زخم و 4 مورد از آبسه جدا شده بود.*

نتیجه گیری *: شیوع بالای ژن tst در سویه های مورد مطالعه و گردش این سویه ها در جامعه، میتواند سلامت و بهداشت عمومی را به مخاطره بی اندازد*

واژه های کلیدی *:استافیلوکوکوس اورئوس، توکسین -1- سندروم شوک توکسیک،مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR*

آدرس مقاله:
تیهو م، مبین ه ، امیر مظفری ن ، مودب س ر، صدیق بیان خ ، مونس راست ش. توزیع فراوانی توکسین1- سندروم شوک توکسیک (TSST-1) در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان شهداء تبریز. مجله علوم آزمایشگاهی، 1390دوره پنجم(شماره1) : 44-38

مقدمه

استافیلوکوکها از نظر پزشکی بسیار مهم هستند، گروهی از آنها جزء فلور طبیعی پوست و مخاط هستند و گروهی مشکلات بسیار جدی از نظر پزشکی را از قبیل: عفونتهای پوستی و بافتی($SSTI_s$)، آلودگیهای محلهای جراحی شده، اندوکاردیت و آلودگیهای باکتریایی اکتسابی بیمارستانی ایجاد می کنند. تعدادی از عفونتها، منسوب به استفاده از تجهیزات پزشکی مثل استفاده از اعضای مصنوعی و سوندها و یا مصرف داروهای سرکوب کننده ی ایمنی می باشند(1-4).

استافیلوکوکوس‌اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی است که در خلال چندین دهه‌ی گذشته از جمله عوامل اصلی ایجاد کننده‌ی عفونت‌های کسب شده در سطح جامعه و بیمارستان بوده است (5). عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس-اورئوس مکرراً در بیماران بستری شده روی می‌دهد که علی رغم درمان آنتی‌بیوتیکی عوارض شدیدی از خود بر جای می-گذارند (6و7).

استافیلوکوکها به سرعت نسبت به اغلب آنتی بیوتیکها مقاومت پیدا میکنند و مشکلات درمانی متعددی پدید می آورند. استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای ویرولانس متعددی دارد که پاتوژنسیته و کلونیزاسیون باکتری را به آنها نسبت می دهند. انتروتوکسین های باکتری و توکسین سندروم شوک توکسیک (TSST-1) از فاکتورهای ویرولانس مهم این باکتری و از دسته سوپر آنتی ژنهای توکسین پیروژنیک (PTSAgs) می باشند که تاثیرات بسیار مهمی بر میزبان خود دارند. سوپر آنتی ژنها توانایی منحصر به فردی برای واکنش با مولکول MHC کلاس دو، پرولیفراسیون وسیع لنفوسیت های T و در نهایت آسیب ناشی از انتشار مقادیر بالایی از سایتوکاین ها دارند(8). از طرفی توکسین های این خانواده همگی به طور افقی و از طریق عناصر متحرک ژنتیکی مانند فاژها و جزایر پاتوژنسیته منتقل می شوند و این به خصوص در مورد افراد در معرض خطر مانند جمعیت سالخورده، کودکان، زنان باردار و افراد دارای نقص ایمنی بسیار خطرناک است (9و10). توکسین -1-سندروم شوک توکسیک، یک پروتئین با وزن مولکولی تقریباً 24000دالتون و نقطه ایزو الکتریک 6/8-7/2 و بعنوان عامل اصلی سندروم شوک توکسیک(TSS) در نظر گرفته شده است. در 100%-90 سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جمع آوری شده از زنان با TSS این پروتئین(TSST-1) وجود دارد.

سندروم شوک توکسیک(TSS)، یک بیماری سیستمیک است که بوسیله استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می شود و اولین بار توسط Todd و همکارانش معرفی شده است. قبلاً فرض میشد که بوسیله پروتئین استافیلوکوکی به همراه انتروتوکسینF و اگزوتوکسین پیروژنیکC تولید می شوند و بعداً بعنوان توکسین -1-سندروم شوک توکسیک نامیده شد. این پروتئین تقریباً توسط تمام سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به دوره قاعده گی و تعداد زیادی از سویه های غیر وابسته به قاعده گی سنتز می شود، همچنین این پروتئین توسط استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از افراد سالم نیز سنتز می شود. این بیماری با علائمی از قبیل تب ، استفراغ ، اسهال ،درد عضلانی و راش های جلدی مخملکی شکل و در موارد شدید افت فشار خون ، لنفادنوپاتی ، نارسایی کبدی و کلیوی همراه است(10و11).

سندروم شوک توکسیک ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس یک بیماری تهدید کننده حیات فرد با نقص چندگانه اعضا می باشد؛ که امروزه شیوع در حال افزایش موارد غیر تامپونی آن در افراد با عفونت های ساده استافیلوکوکی مانند زخم، آبسه و یا جراحی نگران کننده است(11). ژن tst که عامل بیماری است، می توانند در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در جامعه به راحتی منتقل شود، از آنجائیکه بخش عمده ای از کارکنان شاغل در بیمارستانها حامل باکتری در پوست خود هستند ، می توانند آن را به راحتی به سایرین منتقل نموده و سبب گردش سویه های خطرساز مولد TSST-1 شوند(12). این مطالعه در نظر دارد میزان شیوع ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مولد TSST-1 و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنرا تعیین نماید.

روش بررسی

تعداد1454 نمونه‌ی بالینی مختلف مثل ادرار، خون، ترشحات، زخم و.... در طول دوره یکسال1389-1390 از بیماران بستری بیمارستان شهداء تبریز در این مطالعه وارد شد. ایزوله‌های مشکوک به استافیلوکوکوس‌اورئوس که درآزمایشگاه بیمارستان شهداء جدا شده بوده، به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز منتقل شد. تمامی ایزوله‌ها مجدداً با استفاده از آزمایشات روتین میکروب شناسی مورد شناسایی و تعیین هویت قرار گرفتند. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به روش دیسک دیفیوژن آگار بر اساس رهنمودهای CLSI انجام شد. آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در این مطالعه به ترتیب شامل سفتازیدیم (30µg)، کوتریموکسازول(25µg)، لینزولید(30µg)، تتراسایکلین(30µg)، جنتامایسین(10µg) و سیپرو فلوکساسین(5 µg) (شرکتMast) بود.

استخراج DNA:

استخراج DNA ژنومی ایزوله ها به کمک کیت تهیه شده از شرکت سینا ژن و به شرح زیر انجام شد.

ایزوله های مورد مطالعه در محیط کشت لوریل براث به مدت 24 ساعت در دمای 37 سیلیسیوس کشت داده شد. یک سی سی از کشت باکتریایی مورد آزمایش را در میکروتیوب ریخته و با دور 4500 rpm به مدت 10دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بر روی رسوب حاصل مقدار 100میکرولیتر G+ Prelysis buffer و مقدار 20 میکرولیتر لیزوزیم اضافه کرده و پس از مخلوط کردن آن به مدت 30دقیقه در دمای 37 درجه سیلیسیوس انکوبه شد. سپس 10میکرولیتر آنزیم Ributinase به نمونه افزوده و پس از مخلوط کردن آنها را به مدت 30دقیقه در دمای 55درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم. سپس مطابق دستورالعمل کیت به ترتیب با افزودن بافر لیز کننده ، Precipitation solution ، انتقال به تیوب جدید و اضافه کردن محلول های شستشو و Elution buffer مایع حاوی DNA بدست آمد. به منظور تائید DNA استخراج شده از نمونه ها، DNA ژنومی هر سویه بر روی ژل آگاروز 1% الکتروفورز شد.

DNA های ژنومی استخراج شده تا زمان استفاده در C° 20 - ذخیره شدند.

واکنش PCR : برای تکثیر ژن *tst-1* از پرایمر اختصاصی (جدول1) استفاده شد و از چرخه‌های حرارتی واکنش PCR مطابق برنامه پیشنهادی Deurenberg استفاده شد(12). وجود باندی با طول 483جفت باز برای ژن tst-1 استفاده شد.

الکترو فورز با ولتاژ ۱۰۰ mv ، به مدت 1 ساعت انجام شد و سپس از دستگاه ژل داکیومنت برای مشاهده و عکس برداری از باندها استفاده شد.

یافته ها

طی مطالعه‌ی حاضر تعداد 1454 نمونه بالینی مختلف از بیماران بستری شده در بیمارستان شهداء تبریز، مورد مطالعه قرار گرفتند. در میان کل بیماران مورد مطالعه، تعداد 483 مورد (33/21 %) از نمونه‌های مورد بررسی متعلق به زنان و 971 مورد (66/78 %) متعلق به مردان بودند. از 1454 نمونه مورد مطالعه، 556 نمونه (38/23%)، از نظر رشد میکروارگانیسم مثبت و 898مورد (61/76%) منفی بودند. لازم به ذکر است که از 132 ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس‌اورئوس پس از خالص‌سازی در محیط کشت مانیتول سالت آگارو شناسایی نهایی با آزمایشات روتین،100سویه (6/87%) به عنوان استافیلوکوکوس‌اورئوس تعیین هویت و تشخیص آن‌ها تأیید شد و مطالعات بعدی روی این ایزوله‌ها ادامه یافت.

نتایج آنتی بیوگرام سویه‌های جدا شده بیمارستان شهداء تبریز در نمودار1گزارش شده است. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده که از 100 نمونه‌ی استافیلوکوکوس-اورئوس که با روش دیسک‌آگاردیفیوژن بررسی شد، 83 مورد (83 درصد) مقاوم نسبت به متی سیلین بودند و همه‌ی 100 سویه‌ی استافیلوکوکوس‌اورئوس در برابر لینزولید حساس گزارش شدند. همچنین 39مورد(39%) مقاوم نسبت به تتراسایکلین،25مورد(25%) مقاوم نسبت به سفتازیدیم، 15مورد(15%) مقاوم نسبت به سیپروفلوکساسین، 21مورد(21%)مقاوم نسبت به جنتامایسین، 11مورد(11%)مقاوم نسبت به کوتریموکسازول بودند.

جدول1: توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن *TSST-1* در سویه های استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از بیمارستان شهداء تبریز

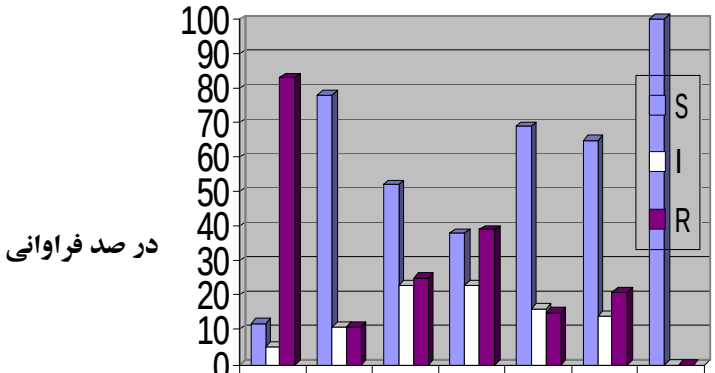
Primer		Sequence
TSST	tst-F	5'CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA3'
	tst-R	5'CCCCTTTAACGCTAATACGACGATCAA3'

جدول2: فراوانی ارگانیسم های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان شهداء تبریز

نوع میکروارگانیسم	تعداد نمونه	درصد
استافیلوکوکوس‌اورئوس	100	6/87
ا ستافیلوکوک های کوآگولاز منفی	93	6/3
سودومو ناس آئروجینوزا	46	3/1
اشریشیاکلی	36	2/4
قارچ‌های مختلف	27	1/8
گونه های کلبسیلا	15	1/03
گونه های استرپتوکوکوس	12	0/82
باسیل گرم منفی متفرقه	205	14/09

جدول3: مشخصات سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن tst جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان شهداء تبریز

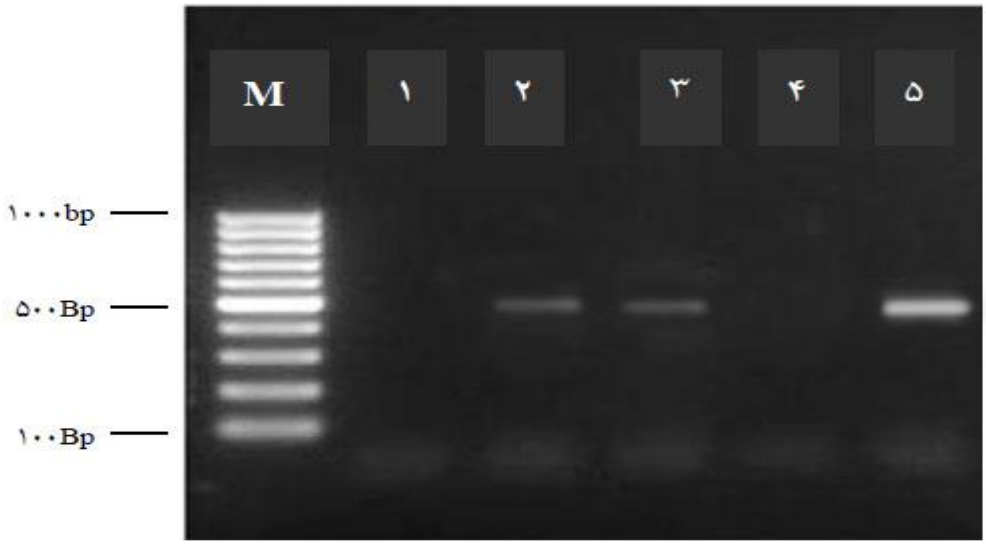
شماره سویه	جنس	سن	نوع نمونه	مقاومت آنتی بیوتیکی
1	مرد	47	آبسه	متی سیلین،کوتریموکسازول
2	مرد	38	فمور	متی سیلین
3	مرد	28	فمور	متی سیلین
4	مرد	53	ترشحات بینی	متی سیلین، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین،سفتازیدیم
5	مرد	62	زخم	متی سیلین، تتراسایکلین
6	زن	30	زخم	متی سیلین
7	مرد	55	تراشه	متی سیلین
8	مرد	35	زخم	متی سیلین
9	مرد	42	خون	متی سیلین، تتراسایکلین
10	مرد	41	آبسه	تتراسایکلین
11	زن	38	مایع مغزی -نخاعی	متی سیلین
12	مرد	24	خون	متی سیلین، تتراسایکلین،کوتریموکسازول
13	زن	40	زخم	متس سیلین، تتراسایکلین
14	مرد	34	زخم	تتراسایکلین
15	زن	29	آبسه	متی سیلین، تتراسایکلین،کوتریموکسازول
16	زن	19	زخم	متی سیلین، تتراسایکلین
17	مرد	57	فمور	متی سیلین، تتراسایکلین
18	مرد	35	زخم	متی سیلین
19	زن	28	زخم	متی سیلین
20	مرد	39	آبسه	تتراسایکلین



	ME	TS	CAZ	T	CIP	GM	LZD
S	12	78	52	38	69	65	100
I	5	11	23	23	16	14	0
R	83	11	25	39	15	21	0

نمودار1: ؛ نتایج آنتی‌بیوگرام سویه‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از بیمارستان شهداء تبریز .CAZ ؛ سفتازیدیم CIP ؛ سیپروفلوکساسین GM؛ جنتامایسین T ؛تتراسایکلین TS؛ کوتریموکسازول ME ؛ متی سیلین و LZD؛ لینزولید

از 100 ایزوله مورد بررسی در 20 مورد (20%) ژن tst شناسایی شد (تصویر1) که عمدتاً باکتریهای جدا شده از زخم و آبسه بودند(جدول 3)



تصویر1: محصول PCR ژن *tst* درآگارز1 درصد استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شده از بیمارستان شهداء تبریز

M: سایزمارکر، ستون1: کنترل منفی (آب دیونیزه) ، ستون 2،3: نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن tst ، ستون 4: نمونه استافیلوکوکوس اورئوس فاقد ژن tst ، ستون 5: کنترل مثبت

بحث

در این مطالعه، از 556 نمونه ارسالی مثبت از نظر کشت میکروبی، از 100 مورد(17/98 %) استافیلوکوکوس‌اورئوس جدا شدکه پس از باسیل های گرم منفی خانواده آنتروباکتریاسه و استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی بعنوان سومین عامل عفونت در بیمارستان مورد مطالعه میباشد که بیشترین تعداد آن به ترتیب از نمونه‌های خون ، زخم ، ادرار و آبسه به‌دست آمد.

در مطالعه‌ی شکوهی و همکاران، که در سالهای 1377 تا 1383 انجام شده است با بررسی511 نمونه ی بالینی که از بیماران بیمارستان لقمان حکیم ایزوله شد ، 180 سویه‌ی جدا شده به‌عنوان استافیلوکوکوس‌اورئوس شناسایی شد. در این تحقیق استافیلوکوکوس‌اورئوس به‌عنوان شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستان بوده است و بیشترین سویه‌های در این بررسی نیز از نمونه‌های خون و ادرارجدا شده بود (13).

با توجه به اهمیت بررسی وجود ژن tst جانسون در سال 1991 نشان دادند که استفاده از روش PCR برای شناسایی ژن tst نسبت به سایر روش ها مثل روش های ایمونولوژیک، روشی مناسب، حساس، سریع و ارزان می باشد(14)، براین اساس در این مطالعه از این روش برای شناسائی این ژن استفاده شد.

درمطالعه پارسونت و همکاران در سال 2008 ، 159 سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زنان را مورد بررسی قرار دادند. 14سویه (9%) tst مثبت گزارش شدند و 2سویه از 12 سویه توکسیژنیک مقاوم به متی سیلین گزارش شد(15). در مطالعه ما از 20 ایزوله که tst مثبت گزارش شده بودند، 15سویه(75%)مقاوم نسبت به متی سیلین بودند ، یکی از دلایل این تفاوت می تواند به روش مطالعه حساسیت به متی سیلین مرتبط باشد زیرا در این روش ما از دیسک متی سیلین و در محیط مولر هینتون بدون افزودن نمک طعام استفاده نمودیم که ممکن است آمار مقاومت را بیشتر از حد معمولی نشان دهد.

در سال 2005، وینک و همکاران، 103سویه استافیلوکوکوس اورئوس را که از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز ایزوله شده بود مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که 12 سویه از 51 سویه (24%) ایزوله شده از اجتماع، 5سویه از36 سویه (14%) ایزوله شده از بیمارستان و 4سویه از 16سویه (25%) ایزوله شده از بیماران گرانولوماتوز،tst مثبت گزارش شدند(12). نتایج این تحقیق نشان میدهد که توزیع ژن tst در استافیلوکوکوس اورئوس به محل جدا سازی و بستری بودن بیمار ارتباطی ندارد.

در سال 2007، اسلام و همکاران، از 30 استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت،1 سویه (3/33%) tst مثبت جدا نمودند که از آمار ما بسیار پائین تر است. (17).

نتایج ما نشان داد که میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس حامل ژن tst در شهر تبریز موضوع نگران کننده ای است. گردش این ایزوله ها در اجتماع بویژه برای افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت کمی را به خود اختصاص نمی دهند دارای اهمیت است. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا 60-50% در ناحیه نازوفارنکس و 30-5% در پوست و مو با کلونیزاسیون دائمی 20-10% می رسد(12و15) اهمیت بیشتری می یابد. مانیتورینگ این ایزوله ها در بیمارستانها می تواند در کنترل موارد خطرساز در افراد در معرض خطر موثر باشد. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چار ه اندیشی در این

حیطه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به گزارش های گذشته و حال خود آگاهی دارند (10). بدین ترتیب نتایج به دست آمده از نقاط دیگر دنیا نمی تواند به طور موثری ما را در زمینه وضعیت سلامت و بهداشت عمومی کشورمان روشن کند و بدون شک جهت نیل به این اهداف نیاز مبرمی به مطالعات بیشتر، به خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و شناخت سویه های غالب با تکنیک های حساس تایپینگ ژنوتیپی و فنوتیپی در کشور ما احساس می شود .

تشکر و قدر دانی

از مسئولین دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی به دلیل فراهم نمودن امکانات تحقیق نهایت تشکر و قدردانی می شود.

References

1.Biswajit S, Anil KS, Abhrajyoti G, Manjusri B. *Identification and characterization of a Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus isolated from Kolkata (South Asia).* Journal of Medical Microbiology.2008; 57: 72-79.

2. Casey AL, Lambert PA, Elliot TSJ. *Staphylococci*. International Journal of Antimicrobial Agents.2007; 29(3): 23-32.

3.Morse SI. *Staphylococci. In Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics.*1980; 3: 623-633.

4. Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñiz J, Alvarez MA, Martín MC. *Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of Staphylococcus aureus associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles*. J Clin Microbiol 2005;43(3):1278-84.

5. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. *Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates.* FEMS Microbiol Lett .2005;246(2):191-8.

6. Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. *Biotyping of enterotoxigenic Staphylococcus aureus by enterotoxin gene cluster (egc) polymorphism and spa typing analyses*. Appl Environ Microbiol. 2006;72(9):6117-23.

7. Todd EC. *Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review.* World Health Stat Q .1997;50(1-2):30-50.

8. El-Ghodban A, Ghenghesh KS, Márialigeti K, Esahli H, Tawil A. *PCR detection of toxic shock syndrome toxin of Staphylococcus aureus from Tripoli, Libya.* J Med Microbiol. 2006;55(2):179-82.

9. Fueyo JM, Mendoza MC, Martín MC. *Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in Staphylococcus aureus recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings.* Microbes Infect. 2005;7(2):187-94.

10. Chapaval L, Moon DH, Gomes, JE, Duarte FR, Tsai SM. *An alternative method for Staphylococcus aureus DNA isolation***.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.2008; 60(2): 299-306.

11. Sindhu N, Sharma A ,Jain VK. *Coagulase gene based molecular detection of staphylococcus aureus directly from mastitic milk samples of murrah buffalo.* Buffalo Bulletin; 29(1):52-59.

12. Deurenberg H, Nieuwenhuis F, Driessen C, London N, Frank R, Ellen E , etal. *The prevalence of the Staphylococcus aureus tst gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener_s Granulomatosis patients.* FEMS Microbiology Letters. 2005; 245 (1) 185–189.

13. Shokohi sh , aminzadeh z , shrafi k , ashrafi m. *Evaluation of antibiotic resistance of resistant Staphylococcus aureus to acquired metisilin.* Journal Microbiology.2009;1(2):59.

14. Gohnson w, tyler M, ewan S, ashton E, pollard F, Rozee K.R. *Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in Staphylococcus aureus by the Polymerase Chain Reaction*. Journal of Clinica Microbiology. 1991;29(3):426-430.

15. Parsonnet J, Goering R, Hansmann M, Jones M, Ohtagaki K, Davis C , Totsuka K. *Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1)-Producing Strains of Staphylococcus aureus and Antibody to TSST-1 among Healthy Japanese Women.* Journal of clinical microbiology. 2008; 46(8): 2731–2738.

16. Islam MJ, Uddin MS, Nasrin MS, Nazir KHM, Rahman MT .Alam MM. *Prevalence of enterotoxigenic and toxic shock syndrome toxin-1 producing coagulase positive staphylococcus aureus in human and their characterization.* Bangl J Vet Med. 2007; 5 (1 &2): 115–119.