Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Study of Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance *Staphylococcus aureus* Isolated from Handmade Sweets in Hamadan

Shahnaz Fatahi[1], Mahdi Taheri[1], Hossein Ghaderi[2], Mohammad Reza Arabestani[3]

1. Department of Nutrition, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
2. Department of Bacteriology, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Department of Microbiology, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2018/02/06
Accepted: 2018/05/21
Available online: 2018/06/30

Article Subject:
Clinical Microbiology

IJMM 2018; 12(2): 78-87

Corresponding author:

Mohammad Reza Arabestani
Associate Professor,
Department of Microbiology,
Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
Tel: 081-23838077
Email:
mohammad.arabestani@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Staphylococcus aureus* is one of the most common causes of food poisoning, which due to excessive use of antibiotics has become resistant to different antibiotics. In addition, it is also capable of producing biofilm. The aim of this study was to investigate antibiotic resistance patterns and phenotypic study of biofilm production in *S. aureus* isolates separated from confectionary pastries in Hamadan.

Materials and Methods: In this descriptive- cross-sectional study, 370 samples of creamy (280) and dried (90) pastries were collected randomly (May to February 2017). To separate possible microbial contaminations, part of samples were cultivated with conventional microbiological methods. The separated *S. aureus* isolates were confirmed using polymerase chain reaction (PCR) and *nuc* gene amplification. The antibiotic susceptibility pattern of all isolates was determined by disk agar diffusion (DAD) method based on CLSI guideline and also, microplate modified method was used to identify biofilm strains.

Results: The results showed that 34.64% of the creamy pastries and 3.33% of the dried pastries were infected with *S. aureus*. Antibiogram results showed the highest resistance was related to penicillin (90%). In the quantitative study of biofilm production, 42 strains (42%) were strongly adhesive, while 17 (17%) and 41 (41%) strains were weakly adhesive and lacking adhesive ability, respectively.

Conclusions: Consumption of creamy pastries increases the risk of infection with *S. aureus* and is a serious warning to the health system. Pasteurization and storage of food stuff in the refrigerator, continuous microbial control of pastries and the screening of the confectionary staff can reduce the level of microbial contamination and the risk of staphylococcal poisoning.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Sweets, PCR, Biofilm

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Fatahi S, Taheri M, Ghaderi H, Arabestani M R. Study of Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance Staphylococcus aureus Isolated from Handmade Sweets in Hamadan. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2): 78-87

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۲ – خرداد-تیر ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم و مطالعهٔ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرینی‌های عرضه‌شده در سطح شهر همدان

شهناز فتاحی[۱]، مهدی طاهری[۱]، حسین قادری[۲]، محمدرضا عربستانی[۳]

۱. گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. گروه باکتری‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۳۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع:

میکروب شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 78-87

نویسنده مسئول:

محمدرضا عربستانی

دانشیار،گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تلفن: ۰۸۱- ۲۳۸۳۸۰۷۷

پست الکترونیک:

mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئورس* یکی از شایع‌ترین علل مسمومیت غذایی است که با مصرف بیش‌ازحد آنتی‌بیوتیک ها به گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است. افزون‌بر این، قادر به تولید بیوفیلم است. هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرینی‌های عرضه‌شده در قنادی های شهر همدان است.

مواد و روش‌کار: در این مطالعهٔ مقطعی‌توصیفی، تعداد ۳۷۰ نمونه شیرینی خامه‌ای (۲۸۰ نمونه) و خشک (۹۰ نمونه) به‌شکل تصادفی از شیرینی‌فروشی‌های سطح شهر همدان جمع‌آوری شدند (اردیبهشت تا بهمن ۹۶). برای جداسازی آلودگی‌های احتمالی میکروبی، بخشی از نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت اختصاصی ارزیابی شدند. در ادامه تأیید مولکولی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده، با استفاده از PCR و تکثیر ژن اختصاصی *nuc* باکتری انجام شد. برای تعیین مقاومت ایزوله‌ها از روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI و برای شناسایی سویه‌های مولد بیوفیلم از روش اصلاح‌شدهٔ میکروپلیت استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۳۴/۶۴ درصد از شیرینی‌های خامه‌ای و ۳/۳۳ درصد از شیرینی‌های خشک به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده‌اند. همچنین نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط‌به آنتی‌بیوتیک پنی سیلین (۹۰ درصد) است. در بررسی کمی تولید بیوفیلم ۴۲ سویه (۴۲ درصد) چسبندهٔ قوی، ۱۷ سویه (۱۷ درصد) چسبندهٔ ضعیف و ۴۱ سویه (۴۱ درصد) بدون توانایی چسبندگی بودند.

نتیجه‌گیری: مصرف شیرینی خامه‌ای احتمال آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* را افزایش می‌دهد و هشداری جدی برای سیستم بهداشتی محسوب می‌شود. پاستوریزاسیون و نگهداری مواد غذایی در یخچال، کنترل مداوم میکروبی شیرینی‌جات و غربالگری کارکنان قنادی‌ها ممکن است میزان آلودگی میکروبی و همچنین خطر مسمومیت استافیلوکوکی را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، PCR، شیرینی، بیوفیلم

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

طبق تعریف سازمان سلامت جهانی (WHO)، بیماری‌های ناشی از غذا، به بیماری‌های عفونی یا مسمومیت‌هایی گفته می‌شود که در اثر استفاده‌از آب یا غذای آلوده ایجاد می‌شوند. بیماری‌های منتقل‌شونده از راه غذا مشکل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان را به خود مبتلا می‌کنند. بعضی افراد در بیمارستان‌ها بستری می‌شوند و حتی برخی بیماران جان خود را از دست می‌دهند. مسمومیت‌های غذایی به‌شکل هر گونه بیماری، ناراحتی، کسالت و اثرات نامطلوب پس از مصرف غذا تعریف می‌شوند (۱). فرآورده‌های قنادی بخش مهمی از رژیم غذایی جامعه را تشکیل می‌دهند. این فرآورده‌ها به علت داشتن برخی مواد مغذی مانند فرآورده‌های شیری و تخم مرغ، محیط مناسبی برای رشد باکتری‌ها به‌شمار

می‌روند و در صورت تهیه و نگهداری در شرایط نامناسب مستعد فساد می‌شوند. آلودگی میکروبی فرآورده‌های قنادی از نظر بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت بسیاری است. این نوع فساد افزون‌بر محدودکردن مدت زمان نگهداری فرآورده های قنادی باعث شیوع مسمومیت‌های غذایی نیز می‌شود (۲).

استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری گرم مثبت، بی‌حرکت، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری است. *استافیلوکوکوس*ها دارای بیش از ۲۰ گونه‌اند که در زیستگاه‌های گوناگون پراکنده‌اند. برخی از آنها در پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی جانوران و انسان وجود دارند و به فرآورده‌های دامی مثل شیر، پنیر و گوشت منتقل و همچنین از راه منابع محیطی مثل خاک، شن، گردوغبار هوا و آب‌های طبیعی سبب آلودگی مواد غذایی می‌شوند (۳). این باکتری در نقش باکتری کلونیزه‌شونده روی پوست و مخاط انسان و حیوانات به‌عنوان مخازن اولیهٔ باکتری حضور دارد؛ بنابراین به‌راحتی طی پروسهٔ تهیه، آماده‌سازی، خردکردن، بسته‌بندی و نگهداری مواد غذایی سبب آلودگی مواد غذایی می‌شود. در بین باکتری‌ها، استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی است که باعث مسمومیت غذایی می‌شود و هرساله صدهاهزار نفر از مردم را به این بیماری مبتلا می‌کند. غذا برای ایجاد مسمومیت استافیلوکوکی محیط مناسبی برای رشد باکتری است. در انسان، این باکتری در قسمت قدامی بینی بزرگ‌سالان وجود دارد و در ۲۰ تا ۳۰ درصد از جمیعت انسانی به‌طور دائم و پایدار و در ۶۰ درصد افراد به‌شکل متناوب دیده می‌شود. بنابراین افرادی که در مراکز تهیه، عمل‌آوری و توزیع مواد غذایی فعالیت دارند در صورت رعایت‌نکردن مسائل بهداشتی سبب انتقال این باکتری به مواد غذایی می‌شوند. استافیلوکوکوس اورئوس قادر است در طیف وسیعی از شرایط محیطی از قبیل دما، pH و غلظت‌های نسبتاً بالای کلرید سدیم رشد کند. این ویژگی‌ها باعث قابلیت رشد باکتری در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی می‌شود (۴).

مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* در سراسر جهان نسبت‌به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج رو به افزایش است و به‌عنوان خطری جدی در جهت افزایش مقاومت‌به عوامل آنتی‌باکتریال مطرح است. درمان عفونت‌های با منشأ *استافیلوکوکوس اورئوس* از سال ۱۹۷۰ تاکنون سبب شیوع سویه‌های مقاوم‌به متی سیلین شده است که از راه بیان ژن *mecA* و *mecC* انجام شده است. بیشتر ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌به پنی سیلین، برخی مقاوم‌به متی سیلین، نفسیلین و به‌ندرت مقاوم‌به وانکومایسین‌اند. سویه‌های مقاوم‌به متی سیلین نسبت‌به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های مشابه با متی سیلین مانند کلوگزاسیلین و سفوکسیتین و یا نامشابه با متی سیلین مانند کلیندامایسین، تتراسایکلین و ماکرولیدها نیز مقاوم‌اند (۵،۶).

در کنار بروز مقاومت، این باکتری توانایی تولید عوامل بیماری‌زای مختلفی مانند توکسین‌ها، آنتی‌ژن‌های سطحی، آنزیم‌های خارج سلولی و برخی عوامل وابسته و متصل‌به کپسول پلی ساکاریدی به نام بیوفیلم را دارا است (۷،۸). بیوفیلم شامل مجموعه‌ای از میکرو ارگانیزم‌هایی است که در سطح و ماتریکس جسم غیر زنده و یا موجود زنده به‌هم متصل و سبب ایجاد سطح ژله‌ای می‌شوند (۹). این لایه، افزون‌بر اینکه محیطی مناسب برای باکتری فراهم می‌کند، شرایط ایده‌آلی برای رشد و تکثیر با آن در محیط‌های ناپایدار به‌وجود می‌آورد. از مهم‌ترین ویژگی‌های بیوفیلم می‌توان به نمونه‌هایی اشاره کرد. مانند:کمک‌به بقای باکتری در شرایط سخت محیطی؛ نقش در بیماری‌زایی و ایجاد بیماری‌های مزمن؛ و اثرگذاری آن در ایجاد و تقویت مقاومت دارویی از راه نفوذناپذیری آنتی‌بیوتیک در ماتریکس پلیمری (۱۰). بیوفیلم‌ها یکی از مشکلات اساسی در صنایع غذایی محسوب می‌شوند؛ زیرا باعث چسبیدن انواع عوامل بیماری‌زا به سطوح و تجهیزات صنایع غذایی می‌شوند. بیوفیلم‌ها باعث کاهش اثربخشی ضدعفونی‌کننده‌ها، افزایش سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی و واردکردن زیان‌های اقتصادی به صنایع غذایی می‌شوند. به همین دلیل از جنبهٔ ایمنی و فساد مواد غذایی اهمیت زیادی دارند (۱۱).

فرایند چسبیدن و تولید بیوفیلم در این باکتری شامل دو مرحله است: ۱. اتصال اولیه (INITIAL ADHERENCE): سلول‌ها به یک سطح (به وسیلهٔ فاکتورهای اتصال دیوارهٔ سلول) متصل می‌شود؛ ۲. تجمع و تراکم (ACCUMULATION) : تکثیر سلول‌ها و ایجاد یک ساختار بالغ است که از تعداد زیادی لایه‌های مختلف سلولی تشکیل شده است و توسط اتصالات داخل سلولی پلی ساکاریدی (PIA) به یکدیگر متصل می‌شوند (۱۲). باتوجه‌به پتانسیل بسیار آلودگی شیرینی‌جات به‌ویژه شیرینی‌های خامه‌ای و همچنین به‌دلیل مصرف زیاد این فراورده‌ها و درنتیجه افزایش احتمال ایجاد مسمومیت‌های غذایی، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فنوتیپی بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از شیرینی‌های عرضه‌شده در قنادی‌های شهر همدان (اردیبهشت تا بهمن ۹۶) انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعهٔ توصیفی که به‌روش مقطعی انجام شده است، نمونه‌برداری از ۲۰ قنادی در سطح شهر همدان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. نمونه‌گیری به‌شکل کاملاً تصادفی از نقاط مختلف شهر انجام شد. شیرینی‌های مطالعه‌شده شامل انواع شیرینی خشک (۹۰ نمونه) و شیرینی خامه‌ای (۲۸۰ نمونه) (ساده، رولت، میوه‌ای و ژله‌ای) بودند. پس از نمونه‌برداری نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان برای کشت منتقل شدند و تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال (دمای ۱±۴ سلسیوس) نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها مطابق‌با دستورالعمل استاندارد ملی ایران (ISIRI) به شمارهٔ استاندارد ۲۳۹۵ برای شیرینی‌جات بررسی و ارزیابی شدند (۱۳).

کشت و جداسازی اولیهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس*

به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم از هر نمونه شیرینی به ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر (امین طب، ایران) استریل اضافه (رقت ۰/۱) و سپس وارد مرحلهٔ غنی‌سازی شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونهٔ رقیق‌شده، به محیط براث غنی‌کنندهٔ ژیولیتی کانتونی براث (شرکت مرک، آلمان) برای *استافیلوکوکوس اورئوس* اضافه و ۲۴ساعت در ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. سپس از سوسپانسیون رشدیافته در محیط ژیولیتی کانتونی براث به محیط برد پارکر (شرکت مرک، آلمان) آگار منتقل و کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس از کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* که کلنی‌های سیاه و مدور همراه با هالهٔ شفاف در اطرافشان بودند، بر محیط بلاد آگار کشت داده و مجدد به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. تشخیص قطعی *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس مورفولوژی کلنی‌ها روی محیط بلاد آگار و ایجاد همولیز بتا، مشاهدهٔ کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای در زیر میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز و DNase و تخمیر قند مانیتول بر روی محیط کشت مانیتول سالت آگار بررسی و تأیید شدند (۱۴).

تأیید مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جداشده

استخراج DNA

برای استخراج DNA ابتدا سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعتهٔ هر ایزوله به محیط کشت نوترینت براث (شرکت مرک، آلمان) منتقل شد و پس از ۱۸ ساعت، ۱۴۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از حذف مایع رویی به رسوب سلولی حاصل ۲۰۰ میکرولیتر لایزیز بافر (۱٪ تریتون ۱۰۰x، ۰/۵٪ تویئن ۲۰، ده میلی مول تریس با pH ۸ ، یک میلی مولار EDTA) اضافه و کاملاً ورتکس شد. در مرحلهٔ بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشید و پس از جوشاندن با سرعت دور ده هزار در دقیقه به‌مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به‌عنوان مایع حاوی DNA استفاده شد (۱۵).

آزمون PCR برای شناسایی ژن ترمو نوکلئاز (*nuc*)

برای تأیید مولکولی ایزوله‌های مشکوک *استافیلوکوکوس اورئوس* از تکثیر ژن اختصاصی ترمونوکلئاز(*nuc*) با روش PCR استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برای کنترل منفی از آب مقطر استریل به‌جای اسید نوکلئیک استفاده شد و از DNA استخراج‌شده از سویهٔ استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۳۳۵۹۱ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش تکثیر با برنامهٔ دمایی در جدول ۲ آمده است. محصولات حاصل از انجام واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و برای مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز انجام شد. سپس برای مشاهدهٔ باندها ژل در دستگاه ترانس لومیناتور قرار داده، عکس‌برداری شد. نمونه‌های دارای باند ۲۸۰ جفت بازی به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* درنظر گرفته شدند.

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (با استفاده از روش انتشار دیسک)

سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر مقاومت به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مرسوم به‌روش دیسک دیفیوژن و طبق استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) در محیط مولر هینتون آگار ارزیابی شدند.

پس از تهیهٔ محیط کشت، سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک فارلند از کشت ۱۸-۲۴ ساعتهٔ باکتری در محیط نوترینت براث تهیه شد (با غلظت نهایی CFU/mL $۱-۲\times۱۰^{۸}$). سپس با استفاده از سواپ استریل به روی سطح محیط کشت مولر هینتون اگار به‌شکل یکنواخت و چمنی کشت داده شد. ۱۵ دقیقه بعد از تلقیح، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام (از شرکت هایمدیا، هند)، شامل سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)،

سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۵ میکروگرم) و کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، با فواصل مناسب از هم بر محیط کشت قرار داده شدند و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شد. از *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد ATCC ۳۳۵۹۱ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

پس از ۲۴ ساعت با اندازه‌گیری هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و مقایسهٔ آن‌ها با جدول استاندارد CLSI نتایج به‌صورت مقاوم، نیمه‌مقاوم و حساس گزارش شدند (۱۷).

جدول ۱. مشخصات پرایمر استفاده‌شده در این مطالعه

رفرنس	دمای آنیلینگ(°C)	اندازهٔ محصول (جفت باز)	توالی پرایمرها	ژن هدف
۱۶	۵۵	۲۸۰	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R:AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	*Nuc*

جدول ۲. چرخهٔ دمایی و حجم مواد استفاده‌شده برای PCR با هدف ژن *nuc*

چرخهٔ دمایی برای تکثیر	حجم	نام مواد یا محلول
مرحلهٔ واسرشت اولیه: ۹۴ درجهٔ سلسیوس، ۵ دقیقه	۱۰ میکرولیتر	مستر میکس
مرحلهٔ واسرشت: ۹۴ درجهٔ سلسیوس، ۳۰ ثانیه	۱ میکرولیتر	پرایمر رفت
مرحلهٔ اتصال: ۵۵ درجهٔ سلسیوس، ۵۵ ثانیه	۱ میکرولیتر	پرایمر برگشت
مرحلهٔ گسترش: ۷۲ درجهٔ سلسیوس، ۶۰ ثانیه	۲ میکرولیتر	DNA
مراحل ۲ تا ۴: ۳۵ سیکل	۶ میکرولیتر	آب مقطر استریل
مرحلهٔ گسترش نهایی: ۷۲ درجهٔ سلسیوس، ۱۰ دقیقه	۲۰ میکرولیتر	حجم کلی

تعیین فنوتیپی سویه‌های تولیدکنندهٔ بیوفیلم

برای بررسی کمی تولید بیوفیلم با استفاده از تست کنگورد آگار پلیت (CRA plate) سویه‌های جداشده بر محیط BHI agar حاوی ۰/۸ g/L کنگورد و ۳۶ g/L ساکارز کشت داده شدند. سویه‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق باقی ماندند. از نظر تولید بیوفیلم، سویه‌هایی که کلنی آن‌ها بر محیط سیاه بود مثبت، کلنی‌های قرمز تیره بیوفیلم متوسط و سویه‌هایی که کلنی آن‌ها قرمز بود به‌عنوان منفی درنظر گرفته شدند (۱۸).

برای بررسی کمی تولید بیوفیلم با روش میکروپلیت تیتراسیون (MTP assay) ابتدا نمونه بر محیط تریپتیکاز سوی براث (شرکت مرک، آلمان) حاوی ۱ درصد گلوکز کشت (۲۴ ساعت انکوباسیون) داده شد و در ادامه از نمونه‌های غنی‌شده کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای پلی استرین منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرماگذاری شد. چاهک‌ها پس از ۴ بار شست‌وشو با محلول فسفات بافر سالین(PBS) نمونه‌ها با کریستال ویوله ۱ درصد رنگ‌آمیزی و ۳ بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. برای آزادسازی رنگ موجود در دیوارهٔ باکتری‌هایی که مولد بیوفیلم‌اند، ۲۰۰ میکرولیتر الکل استون به هر چاهک اضافه شد. در نهایت OD نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت‌کنندهٔ الیزا ثبت شد. برای اطمینان از صحت کار ۳ بار جذب نوری هر یک از نمون‌ها بررسی شد. بر اساس میزان جذب نوری، نمونه‌هایی که OD آن‌ها زیر ۰/۳۵ باشد منفی (non- adherent)، نمونه‌هایی که OD آن‌ها بین ۰/۳۵-۰/۴۹ باشد چسبندهٔ ضعیف (weakly- adherent) و نمونه‌هایی که OD آن‌ها بالاتر از ۰/۵ باشد چسبندهٔ قوی (strongly- adherent) درنظر گرفته می‌شوند (۱۹).

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از نتایج توسط نرم‌افزار SPSS (version 20) و آزمون کای مربع در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P <$ ۰/۰۵) تحلیل شد و ارتباط آماری بین شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین نتایج تست کمی و کیفی بیوفیلم تعیین شد. معناداری تست دو جهتی two-tailed بوده است و *P value* < ۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنادار آماری درنظر گرفته شد.

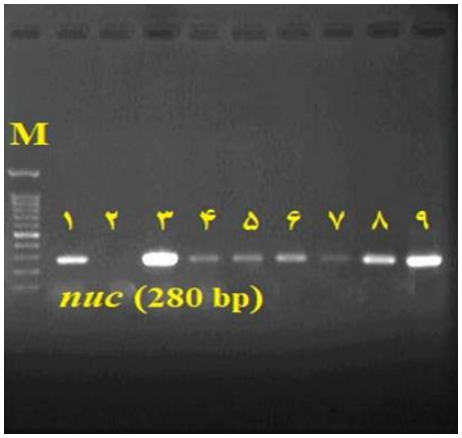
یافته‌ها

جداسازی نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و تأیید مولکولی آن‌ها

از ۳۷۰ نمونه شیرینی جمع‌آوری‌شده تعداد ۱۰۰ نمونه (۲۷/۰۲ درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند که از این تعداد، ۹۷ نمونه (۳۴/۶۴ درصد) مربوط‌به شیرینی‌های تر و ۳ نمونه (۳/۳۳ درصد) مربوط به شیرینی‌های خشک بودند.

همچنین آلودگی دست کارگران و جوش و دمل‌های چرکی دست یا صورت ممکن است عامل مؤثری در آلودگی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس باشد.*

با استفاده از PCR و بررسی مولکولی ۱۰۰ نمونهٔ تأییدشده درکشت میکروبی، درهمهٔ این نمونه‌ها وجود ژن *nuc* اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصولاتPCR حاصل از تکثیر ژن *nuc*
چاهک M- مارکر ژنی 100bp، چاهک۱- سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 (کنترل مثبت، دارای ژن *nuc*)، چاهک۲- سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC PAO1 (کنترل منفی، فاقد ژن *nuc*) ، چاهک ۳ تا ۹- ایزوله‌های مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه شیرینی های جمع آوری شده

حساسیت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تأییدشده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

نتایج مربوط‌به آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند بیشترین مقاومت نسبت‌به پنی سیلین بوده است و نسبت‌به آنتی‌بیوتیک هاسیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل و سفالوتین ۱۰۰ درصد حساسیت وجود دارد. در مجموع همهٔ ایزوله‌ها نسبت‌به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه‌شده حساسیت درخور توجهی نشان دادند.

آنتی‌بیوتیکی با آزمون کای مربع، اختلاف آماری معنی‌داری بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌*های* آمپی سیلین و سفوکسیتین با مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و جنتامایسین، کلیندامایسین، سفالوتین و کلرامفنیکل در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P =۰/۰۲۹) مشاهده شد. در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط‌به مقاومت

تولید بیوفیلم

نتایج مربوط به آزمون کیفی تولید بیوفیلم نشان داد که از مجموع ۱۰۰ سویه، ۴۷ سویه (۴۷ درصد) کلنی سیاه (بیوفیلم مثبت)، ۱۲ سویه (۱۲ درصد) کلنی‌های قرمز تیره (بیوفیلم متوسط) و ۴۱ سویه (۴۱ درصد) کلنی قرمز (بیوفیلم منفی) ایجاد کردند. در آزمون کمی تولید بیوفیلم از ۱۰۰ سویهٔ بررسی‌شده، ۴۰ سویه (۴۰ درصد) چسبندهٔ قوی، ۱۹ سویه (۱۹ درصد) چسبندهٔ ضعیف و ۴۱ سویه (۴۱ درصد) بدون قدرت چسبندگی بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات، اختلاف آماری معنی‌داری بین نتایج تست کمی (بیوفیلم چسبندهٔ قوی و ضعیف و بدون چسبندگی) و کیفی (کلنی سیاه و قرمز تیره و قرمز) بیوفیلم در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P < ۰/۰۰۱) با آزمون کای دو مشاهده شد.

جدول ۳. فراوانی و درصد مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* های جداشده، به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	فراوانی نمونه‌های مقاوم	فراوانی نمونه‌های حدواسط	فراوانی نمونه‌های حساس
پنی سیلین	۸۷ (٪۸۷)	-	۱۳ (٪۱۳)
سیپروفلوکساسین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
تتراسایکلین	۶ (٪۶)	-	۹۴ (٪۹۴)
کلرامفنیکل	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
سفوکسیتین	۳۵ (٪۳۵)	-	۶۵ (٪۶۵)
جنتامایسین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
اریترومایسین	-	۶ (٪۶)	۹۴ (٪۹۴)
سفالوتین	-	-	۱۰۰ (٪۱۰۰)
آمپی سیلین	۲۴ (٪۲۴)	-	۷۶ (٪۷۶)
کلیندامایسین		۸ (٪۸)	۹۲ (٪۹۲)

جدول۴. مقایسهٔ نتایج تست کمی و کیفی تولید بیوفیلم در نمونه‌های شیرینی

تست کمی تست کیفی	سویه‌های چسبندهٔ قوی	سویه‌های چسبندهٔ ضعیف	سویه‌های بدون چسبنده	جمع کل
کلنی های سیاه	۳۸	۷	۲	۴۷
کلنی های قرمز تیره	۲	۱۰	۰	۱۲
کلنی های قرمز	۰	۲	۳۹	۴۱
جمع	۴۰	۱۹	۴۱	۱۰۰

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس در نقش باکتری کلونیزه‌شونده بر روی پوست و مخاط انسان و حیوان‌ها، به‌عنوان مخازن اولیهٔ باکتری، حضور دارد (۲۰). بنابراین به‌راحتی ممکن است طی فرایند تهیه، آماده‌سازی، خُردکردن، بسته‌بندی و ذخیرهٔ غذاهایی که نیازمند پروسه‌های دستکاری‌اند، غذا ها را آلوده کنند (۲۱). بی‌شک تمایل بسیار مردم برای خرید مواد غذایی آمادهٔ مصرف (مانند شیرینی) از نظر وجود طعم و رنگ جذاب آن، بهداشت ضعیف محیط و وسایل تهیهٔ این مواد، شست‌وشوی نامناسب دست ها و تماس طولانی دست کارکنان با شیرینی (غذا) از جمله عوامل مهم آلودگی مواد غذایی به این باکتری به‌شمار می‌رود (۲۲).

بر این اساس در مطالعه حاضر، میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیرینی‌های خامه‌ای و خشک عرضه‌شده در سطح شهر همدان بررسی و گزارش شد. نتایج کشت نشان داد که ۲۷/۰۲ درصد از نمونه‌های شیرینی به این باکتری آلوده‌اند. بیشترین میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، مربوطبه شیرینی خامه‌ای ۳۴/۶۴ درصد (۲۸۰) بود. آلودگی شیرینی خامه‌ای در دیگر مطالعات نیز بررسی و گزارش شده است. برای نمونه، در مطالعهٔ نیک‌نیاز و همکاران در تبریز میزان آلودگی ۳۱/۲ درصد بود که (۳۱/۲ درصد) تقریباً مشابه مطالعهٔ حاضر بود (۲۳). اما در مطالعهٔ سلطان‌دلال و همکاران در تهران و همچنین حسینی‌جزنی و همکاران در ارومیه میزان آلودگی به ترتیب ۱۲ درصد و ۱۵ درصد گزارش شده است (۲۴، ۲۵). در مطالعهٔ دیگری که میرزابیگی و همکران در سال ۱۳۸۵ انجام داده‌اند، میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد لبنی و شیرینی خامه‌ای عرضه‌شده درغرب تهران ۱۶ درصد بوده است (۲۶). در بازهٔ سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۹۸نیز در برزیل، مسمومیت‌های غذایی متعددی ناشی از مصرف کیک‌های خامه‌ای در اثر آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیش از ۵۰ درصد شیرینی‌های خامه‌ای که در دمای اتاق نگهداری می‌شدند آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۲۷). مطالعهٔ دیگری در هند نشان داد که میزان آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۷ درصد است (۲۸). به‌هرحال این تفاوت در میزان آلودگی ممکن است مربوط به اختلاف در حجم نمونه، موقعیت جغرافیایی، زمان نمونه‌برداری، فصل و سطح بهداشتی افراد باشد.

در دهه‌های اخیر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به‌عنوان مشکلی بزرگ در سلامت عمومی درنظر گرفته می‌شود . به‌دلیل استفادهٔ نادرست و زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها شمار باکتری‌های مقاوم‌به عوامل آنتی‌بیوتیکی به‌سرعت در حال افزایش است. ایزوله‌های غذایی در دههٔ اخیر افزایش ملاحظه‌پذیری در مقاومت علیه اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند (۲۹). غذاها فاکتور مهمی برای انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی‌اند. این انتقال ممکن است به‌وسیلهٔ باقیماندهٔ آنتی‌بیوتیکی در غذا، انتقال عوامل بیماری‌زای مقاوم با منشأ غذایی یا خوردن سویه‌های مقاوم میکروفلور اولیهٔ غذاها و انتقال مقاومت به سایر میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا انجام شود (۲۹).

در این مطالعه با توجه به نتایج حاصل از آزمایش دیسک گذاری و مقایسه آن با الگوی استاندارد مشخص گردید که هیچ یک از ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل و سفالوتین مقاوم نمی باشند، اما نسبت به پنی سیلین بیشترین مقاومت را دارا می باشد. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با مطالعه حسینی جزنی و همکاران در ارومیه مطابقت دارد. طبق گزارش ان ها، از ۱۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از نمونه های تحت بررسی ۱۰۰٪ نمونه ها به جنتامایسین، کلرامفنیکل و سفالوتین حساس بودند (۲۵). در مطالعه ای که توسط Shimamura و همکاران انجام شد از ۹۴ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از نمونه های تحت بررسی هیچ یک نسبت به متی سیلین مقاوم نبودند اما در مطالعه حاضر ۳۵٪ نمونه ها به آنتی بیوتیک سفوکسیتین(متی سیلین) مقاوم بودند. طبق مطالعات صورت

گرفته یکی از علت اصلی به وجود آمدن باکتری هایی با مقاومت بالا ناشی از تجویز خودسرانه و نابجای آنتی بیوتیک ها می باشد (۳۰). در مطالعه Pereira و همکاران (۲۰۰۷) بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* های جداشده از مواد غذایی مختلف، ۳۸ درصد از آ ن ها به عنوان سویه های مقاوم به متی سیلین گزارش شدند (۲۹).

مطالعات مختلف نشان داده است که اساسی‌ترین مرحله در عفونت‌زایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، توانایی میکرو ارگانیسم‌ها در چسبیدن و تولید بیوفیلم بر روی سطوح است (۳۱،۳۲).

در این مطالعه، نتایج حاصل از تست‌های کمی و کیفی نشان داد ۵۹ درصد از نمونه‌های شیرینی، دارای توانایی تولیدند. مشابه با این مطالعه در مطالعات دیگر نیز تولید بیوفیلم از نمونه‌های جداشده از مواد غذایی اثبات شده است. برای نمونه، Moretro و همکاران در مطالعهٔ خود (۲۰۰۳) در نروژ نشان دادند که از میان ۱۴۴ سویهٔ جداشده از مواد غذایی، ۱۹/۴ درصد ایزوله‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند (۳۳). به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان داد که مصرف شیرینی‌های خامه‌ای، احتمال انتقال *استافیلوکوکوس اورئوس* را نسبت‌به شیرینی‌های خشک افزایش می‌دهند. خامه، به‌دلیل ایجاد شرایط مغذی و رطوبت مناسب، محیط مناسبی برای رشد بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌ویژه در فصل‌های گرم است (۲۴). منشأ آلودگی شیرینی‌ها، به‌ویژه شیرینی خامه‌ای، می‌تواند به‌دلیل آلودگی اولیه‌ی شیر، استفاده از خامه‌های محلی و غیر پاستوریزه، رعایت‌نکردن چرخهٔ سرما در حین نگهداری، آلودگی وسایل و در نهایت انتقال باکتری از دست و بینی پرسنل، در حین فرآوری و حمل‌ونقل باشد. این مطالعه برای نخستین بار نشان داد که در همدان، میزان آلودگی محصولات شیرینی به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توجه‌پذیر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که باتوجه‌به آلودگی تقریباً زیاد شیرینی‌ها، ممکن است صنعتی‌کردن تولید محصولات قنادی، پاستوریزاسیون و نگهداری محصولات اولیه در یخچال، غربالگری، کشت و کنترل مداوم میکروبی، فرهنگ‌سازی و آموزش بهداشتی کارکنان قنادی‌ها در کاهش بار آلودگی میکروبی مؤثر باشد و خطر مسمومیت‌های غذایی را به حداقل برساند.

سپاسگزاری

مقالهٔ حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شده است. نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine milk in Hungary. Int J Food Microbiol. 2007;118(2):186-93. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.010 PMID:17727995
2. Smith JP, Daifas DP, El-Khoury W, Koukoutsis J, El-Khoury A. Shelf life and safety concerns of bakery products—a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004;44(1):19-55. https://doi.org/10.1080/10408690490263774 PMID:15077880
3. Bartolomeoli I, Maifreni M, Frigo F, Urli G, Marino M. Occurrence and characterization of Staphylococcus aureus isolated from raw milk for cheesemaking. International Journal of Dairy Technology. 2009;62(3):366-71. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00498.x
4. Best N, Fraser JD, Rainey PB, Roberts SA, Thomas MG, Ritchie SR. Nasal carriage of Staphylococcus aureus in healthy Aucklanders. N Z Med J. 2011;124(1332):31-9. PMID:21747421
5. Becker K, Denis O, Roisin S, Mellmann A, Idelevich EA, Knaack D, et al. Detection of mecA- and mecC-Positive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay. J Clin Microbiol. 2016;54(1):180-4. https://doi.org/10.1128/JCM.02081-15 PMID:26491186 PMCID:PMC4702756
6. Gunawardena ND, Thevanesam V, Kanakaratne N, Abeysekera D, Ekanayake A, Perera N. Molecular identification of methicillin resistance and virulence marker in Staphylococcus aureus. Sri Lankan J Infect Dis. 2012; 2(2):18-29. https://doi.org/10.4038/sljid.v2i2.4303
7. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol. 2000; 61(1):1-10. PMID:11028954
8. Havaei SA, Assadbeigi B, Esfahani BN, Hoseini NS, Rezaei N, Havaei SR. Detection of mecA and enterotoxin genes in Staphylococcus aureus

isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in MRSA strains. Iran J Microbiol. 2015;7(3):161-7. PMID:26668704 PMCID:PMC4676986

9. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res. 2012;135(3):389-96. PMID:22561627 PMCID:PMC3361877

10. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. BioMed Research International. 2012;2012. http://dx.doi.org/10.1155/2012/976972

11. Oyama T, Miyazaki M, Yoshimura M, Takata T, Ohjimi H, Jimi S. Biofilm-Forming Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice. Toxins (Basel). 2016;8(7):198. https://doi.org/10.3390/toxins8070198 PMID:27376326 PMCID:PMC4963831

12. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection. Clin Microbiol Infect. 2005;11(12):967-73. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01274.x PMID:16307550

13. Lancette GA, Bennett RW. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.AJPH; Washington: Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins; 2001. p. 384–403.

14. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010;9(1):23. https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23 PMID:20707914 PMCID:PMC2927478

15. Yadegar A, Sattari M, Amir Mozafari N, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Microb Drug Resis. 2009;15(2):109-13. https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0897 PMID:19496674

16. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2004;42(11):4947-55. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4947-4955.2004 PMID:15528678 PMCID:PMC525205

17. Pa W. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically Approved standard M7-A7 Clinical and Laboratory Standard Institute. 2006.

18. Silva GDI, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NPJ, Peacock SJ. The ica Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. J Clin Microbiol. 2002;40(2):382-8. https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.382-388.2002

19. Christensen GD, Simpon WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Meleton DM, Edwin H, Beachey EH. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996-1006. PMID:3905855 PMCID:PMC271866

20. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol 2007;115(3):290-6. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.049 PMID:17321621

21. Oh SK, Lee N, Cho YS, Shin DB, Choi SY, Koo M. Occurrence of toxigenic Staphylococcus aureus in ready-to-eat food in Korea. J Food Prot. 2007;70(5):1153-8. https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1153

22. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment food safety and public health implications. Foodborne Pathog Dis. 2005;2(2):115-29. https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115 PMID:15992306

23. Nikniaz Z, Mahdavi R, Jalilzadeh H, Vahed Jabbari M. Evaluation of microbial contamination in cream filled pastries distributed in Tabriz confectionaries. Food Technol Nutr. 2011;8(1):66-71.

24. Soltan Dallal MM, Fazelifard P, Tabatabaei Bafroei A, Rashidi S, Zarrin M. Determination the rate of microbial contamination of cream pastry from confectionaries in south of Tehran. J Microbial Biotech. 2010;2(6):7-11.

25. Hosseini Jazani N, Zartosht M. Determination of the Rate of methicillin resistant and enterotoxigenic Staphylococcus aureus in different kinds of creamy pastries sold in pastry shops in Urmia. Proceedings of the 13th Iranian and 2nd International Congress of Microbiology; 2012 July 14-16; Ardabil, Iran.

26. Faramarzi T, Jonidi jafari A, Dehghani S, Mirzabeygi M, Naseh M, Rahbar Arasteh H. A Survey of Bacterial Contamination of Food Supply in the West of Tehran. J Fasa Univ Med Sci. 2012;2(1):11-8.journal.fums.ac.ir/article-1-68-fa.pdf

27. Anunciacao L L C, Linardi W R, do Carmo L S, Bergdoll M S. Production of staphylococcal entrotoxin A in cream filled cake. Int J Food Microbiol. 1995;26(2):259-63. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00122-M

28. Desai B, Kamat MY. Recovery and characterization of entrotoxigenic strains of staphylococci and microbiological quality of processed Indian foods. J Food Sci Tech. 1998;35:461-5.

29. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol. 2009;26(3):278-82. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.008 PMID:19269569

30. Shimamura Y, Kidokoro S, Murata M. Survey and properties of Staphylococcus aureus isolated from Japanese-style desserts. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(7):1571-7. https://doi.org/10.1271/bbb.50617 PMID:16819155

31. Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H ,El-Baky RMA. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries. 2009;3(5):342-51. PMID:19759503

32. Petrelli D, Repetto A, D'Ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M, *et al*. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. J Med Microbiol. 2008;57(3):364-72. https://doi.org/10.1099/jmm.0.47621-0 PMID:18287301

33. Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among staphylococci from food and food processing environments. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;69(9):5648-55. https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5648-5655.2003