



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

Shahnaz Fatahi<sup>1</sup>, Mahdi Taheri<sup>1</sup>, Hossein Ghaderi<sup>2</sup>, Mohammad Reza Arabestani<sup>3</sup>

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



## بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلیم و مطالعه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیرینی های عرضه شده در سطح شهر همدان

شهناز فتاحی<sup>۱</sup>، مهدی طاهری<sup>۱</sup>، حسین قادری<sup>۲</sup>، محمدرضا عربستانی<sup>۳</sup>

۱. گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲. گروه باکتری شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳. گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع ترین علل مسمومیت غذایی است که با مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها به گروهی از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده است. افزون بر این، قادر به تولید بیوفیلیم است. هدف از این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلیم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیرینی های عرضه شده در قنادی های شهر همدان است.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه مقطعی توصیفی، تعداد ۳۷۰ نمونه شیرینی خامه ای (۲۸۰ نمونه) و خشک (۹۰ نمونه) به شکل تصادفی از شیرینی فروشی های سطح شهر همدان جمع آوری شدند (اردیبهشت تا بهمن ۹۶). برای جداسازی آلودگی های احتمالی میکروبی، بخشی از نمونه ها با استفاده از محیط کشت اختصاصی ارزیابی شدند. در ادامه تأیید مولکولی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده، با استفاده از PCR و تکثیر ژن اختصاصی *nuc* باکتری انجام شد. برای تعیین مقاومت ایزوله ها از روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI و برای شناسایی سویه های مولد بیوفیلیم از روش اصلاح شده میکروپلیت استفاده شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که ۳۴/۶۴ درصد از شیرینی های خامه ای و ۲/۳۳ درصد از شیرینی های خشک به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده اند. همچنین نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۹۰ درصد) است. در بررسی کمی تولید بیوفیلیم ۴۲ سویه (۴۲ درصد) چسبندگی قوی، ۱۷ سویه (۱۷ درصد) چسبندگی ضعیف و ۴۱ سویه (۴۱ درصد) بدون توانایی چسبندگی بودند.

**نتیجه گیری:** مصرف شیرینی خامه ای احتمال آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس را افزایش می دهد و هشدار جدی برای سیستم بهداشتی محسوب می شود. پاستوریزاسیون و نگهداری مواد غذایی در یخچال، کنترل مداوم میکروبی شیرینی جات و غربالگری کارکنان قنادی ها ممکن است میزان آلودگی میکروبی و همچنین خطر مسمومیت استافیلوکوکی را کاهش دهد.

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

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷  
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۳۱  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹  
موضوع:  
میکروبی شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 78-87

نویسنده مسئول:

محمدرضا عربستانی

دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشگاه  
علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تلفن: ۰۸۱- ۲۳۸۳۸۰۷۷

پست الکترونیک:

mohammad.arabestani@gmail.com



### مقدمه

و حتی برخی بیماران جان خود را از دست می دهند. مسمومیت های غذایی به شکل هر گونه بیماری، ناراحتی، کسالت و اثرات نامطلوب پس از مصرف غذا تعریف می شوند (۱). فرآورده های قنادی بخش مهمی از رژیم غذایی جامعه را تشکیل می دهند. این فرآورده ها به علت داشتن برخی مواد مغذی مانند فرآورده های شیری و تخم مرغ، محیط مناسبی برای رشد باکتری ها به شمار

طبق تعریف سازمان سلامت جهانی (WHO)، بیماری های ناشی از غذا، به بیماری های عفونی یا مسمومیت هایی گفته می شود که در اثر استفاده از آب یا غذای آلوده ایجاد می شوند. بیماری های منتقل شونده از راه غذا مشکل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می شوند که سالانه میلیون ها نفر از جمعیت جهان را به خود مبتلا می کنند. بعضی افراد در بیمارستان ها بستری می شوند

متی سیلین مانند کلوگراسیلین و سفوکسیتین و یا نامشابه با متی سیلین مانند کلیندامایسین، تراسایکلین و ماکرولیدها نیز مقاومند (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 متصل به کپسول پلی ساکاریدی به نام بیوفیلیم را دارا است (۷،۸). بیوفیلیم شامل مجموعه‌ای از میکرو ارگانیزم‌هایی است که در سطح و ماتریکس جسم غیر زنده و یا موجود زنده به هم متصل و سبب ایجاد سطح ژله‌ای می‌شوند (۹). این لایه، افزون بر اینکه محیطی مناسب برای باکتری فراهم می‌کند، شرایط ایده‌آلی برای رشد و تکثیر با آن در محیط‌های ناپایدار به وجود می‌آورد. از مهم‌ترین ویژگی‌های بیوفیلیم 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).

بیوفیلیم‌ها یکی از مشکلات اساسی در صنایع غذایی محسوب می‌شوند؛ زیرا باعث چسبیدن انواع عوامل بیماری‌زا به سطوح و تجهیزات صنایع غذایی می‌شوند. بیوفیلیم‌ها باعث کاهش اثربخشی ضدعفونی‌کننده‌ها، افزایش سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وارد کردن زیان‌های اقتصادی به صنایع غذایی می‌شوند. به همین دلیل از جنبه ایمنی و فساد مواد غذایی اهمیت زیادی دارند (۱۱). فرایند چسبیدن و تولید بیوفیلیم در این باکتری شامل دو مرحله است: ۱. اتصال اولیه (INITIAL ADHERENCE): سلول‌ها به یک سطح (به وسیله فاکتورهای اتصال دیواره 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). با توجه به پتانسیل بسیار آلودگی شیرینی‌جات به ویژه شیرینی‌های خامه‌ای و همچنین به دلیل مصرف زیاد این فراورده‌ها و در نتیجه افزایش احتمال ایجاد مسمومیت‌های غذایی، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فنوتیپی بیوفیلیم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیرینی‌های عرضه شده در قنادی‌های شهر همدان (اردیبهشت تا بهمن ۹۶) انجام شد.

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 افزون بر محدود کردن 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. استافیلوکوکوس‌ها 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 به عنوان مخازن اولیه باکتری حضور دارد؛ بنابراین به راحتی طی پروسه تهیه، آماده‌سازی، خرد کردن، 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 هر ساله صدها هزار 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 جمعیت 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 رعایت نکردن 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 نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج رو به افزایش است و به‌عنوان خطری جدی در جهت افزایش مقاومت به عوامل آنتی‌باکتریال مطرح است. درمان عفونت‌های با منشأ استافیلوکوکوس اورئوس از سال ۱۹۷۰ تاکنون سبب شیوع سویه‌های مقاوم به متی سیلین شده است که از راه بیان ژن *mecA* و *mecC* انجام شده است. بیشتر ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین، برخی مقاوم به متی سیلین، نفسیلین و به‌ندرت مقاوم به وانکومایسین‌اند. سویه‌های مقاوم به متی سیلین نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های مشابه با

## مواد و روش‌ها

## جمع‌آوری نمونه‌ها

منتقل شد و پس از ۱۸ ساعت، ۱۴۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری یا سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از حذف مایع رویی به رسوب سلولی حاصل ۲۰۰ میکرولیتر لایزیز بافر (۱٪ تریتون ۱۰۰x، ۰/۵٪ توین ۲۰، ده میلی مول تریس با pH ۸، یک میلی مولار EDTA) اضافه و کاملاً ورتکس شد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه جوشید و پس از جوشاندن با سرعت دور ده هزار در دقیقه به مدت 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 سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۳۳۵۹۱ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش تکثیر با برنامه 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 مشاهده باندها ژل در دستگاه ترانس لومیناتور قرار داده، عکس‌برداری شد. نمونه‌های دارای باند ۲۸۰ جفت بازی به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در نظر 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 تهیه محیط کشت، سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک فارلند از کشت ۱۸-۲۴ ساعته باکتری در محیط نوترینت برات تهیه شد (با غلظت نهایی  $10^8 \times 1-2$  CFU/mL). سپس با استفاده از سوآپ استریل به روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌شکل یکنواخت و چمنی کشت داده شد. ۱۵ دقیقه بعد از تلقیح، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام (از شرکت هایمدا، هند)، شامل سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفوکستین (۳۰ میکروگرم)،

در این مطالعه 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 میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان برای کشت منتقل شدند و تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال (دمای  $4 \pm 1$  سلسیوس) نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل استاندارد ملی ایران (ISIRI) به شماره استاندارد ۲۳۹۵ برای شیرینی‌جات بررسی و ارزیابی شدند (۱۳).

## کشت و جداسازی اولیه 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 مرحله غنی‌سازی شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه رقیق‌شده، به محیط برات غنی‌کننده ژئولیتی کانتونی برات (شرکت مرک، آلمان) برای استافیلوکوکوس اورئوس اضافه و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس از سوسپانسیون رشدیافته در محیط ژئولیتی کانتونی برات به محیط برد پارکر (شرکت مرک، آلمان) آگار منتقل و کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس از کلنی‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس که کلنی‌های سیاه و مدور همراه با هاله شفاف در اطرافشان بودند، بر محیط بلاد آگار کشت داده و مجدد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. تشخیص قطعی استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس مورفولوژی کلنی‌ها روی محیط بلاد آگار و ایجاد همولیز بتا، مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای در زیر میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز 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 ساعته هر ایزوله به محیط کشت نوترینت برات (شرکت مرک، آلمان)

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

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

#### جدول ۱. مشخصات پرایمر استفاده‌شده در این مطالعه

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

#### جدول ۲. چرخه دمایی و حجم مواد استفاده‌شده برای PCR با هدف ژن nuc

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

آزادسازی رنگ موجود در دیواره 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 قرائت‌کننده 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 چسبنده ضعیف (weakly-adherent) و نمونه‌هایی که OD آن‌ها بالاتر از ۰/۵ باشد چسبنده قوی (strongly-adherent) در نظر گرفته می‌شوند (۱۹).

#### تحلیل آماری

داده‌های حاصل از نتایج توسط نرم‌افزار SPSS (version 20) و آزمون کای مربع در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0/05$ ) 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  $P \text{ value} < 0/05$  به‌عنوان تفاوت معنادار آماری در نظر گرفته شد.

#### تعیین فنوتیپی سوبه‌های تولیدکننده بیوفیلم

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

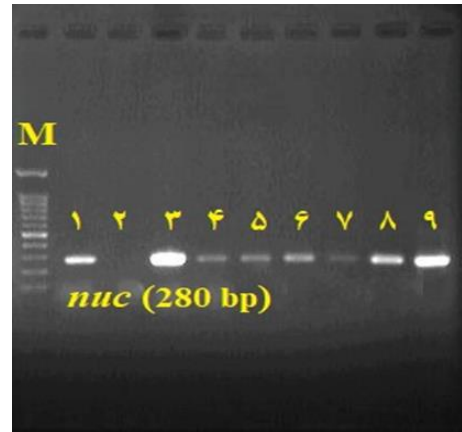
برای بررسی کمی تولید بیوفیلم با روش میکروپلیت تیتراسیون (MTP assay) ابتدا نمونه بر محیط تربیتیکاز سوی براث (شرکت مرک، آلمان) حاوی ۱ درصد گلوکز کشت (۲۴ ساعت انکوباسیون) داده شد و در ادامه از نمونه‌های غنی‌شده کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای پلی استرین منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه 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



یافته‌ها

جداسازی نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و تأیید مولکولی آن‌ها

از ۳۷۰ نمونه شیرینی جمع‌آوری شده تعداد ۱۰۰ نمونه (۲۷/۰۲ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند که از این تعداد، ۹۷ نمونه (۳۴/۶۴ درصد) مربوط به 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 نمونه تأیید شده درکشت میکروبی، درهمه این نمونه‌ها وجود ژن *nuc* اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *nuc* چاهک M- مارکر ژنی 100bp، چاهک ۱- سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 (کنترل مثبت، دارای ژن *nuc*)، چاهک ۲- سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC PAO1 (کنترل منفی، فاقد ژن *nuc*)، چاهک ۳ تا ۹- ایزوله‌های مثبت استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه شیرینی‌های جمع‌آوری شده

حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس تأیید شده به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

نتایج مربوط به آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین بوده است و نسبت به آنتی‌بیوتیک هاسیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل و سفالوتین ۱۰۰ درصد حساسیت وجود دارد. در مجموع همه ایزوله‌ها نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه شده حساسیت درخور توجهی نشان دادند.

آنتی‌بیوتیکی با آزمون کای مربع، اختلاف آماری معنی‌داری بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین و سفوکسیتین با مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و جنتامایسین، کلیندامایسین، سفالوتین و کلرامفنیکل در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P = 0/029$ ) مشاهده شد. در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط به 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 سویه بررسی شده، ۴۰ سویه (۴۰ درصد) چسبنده قوی، ۱۹ سویه (۱۹ درصد) چسبنده ضعیف و ۴۱ سویه (۴۱ درصد) بدون قدرت چسبندگی بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات، اختلاف آماری معنی‌داری بین نتایج تست کمی (بیوفیلم چسبنده قوی و ضعیف و بدون چسبندگی) و کیفی (کلنی سیاه و قرمز تیره و قرمز) بیوفیلم در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0/001$ ) با آزمون کای دو مشاهده شد.

جدول ۳. فراوانی و درصد مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده، 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)

جدول ۴. مقایسه نتایج تست کمی و کیفی تولید بیوفیلیم در نمونه‌های شیرینی

تست کمی تست کیفی	سوبه‌های چسبنده قوی	سوبه‌های چسبنده ضعیف	سوبه‌های بدون چسبنده	جمع کل
کلنی‌های سیاه	۳۸	۷	۲	۴۷
کلنی‌های قرمز تیره	۲	۱۰	۰	۱۲
کلنی‌های 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 اولیه باکتری، حضور دارد (۲۰). بنابراین به‌راحتی ممکن است طی فرایند تهیه، آماده‌سازی، خردکردن، بسته‌بندی و ذخیره غذاهایی که نیازمند پروسه‌های دستکاری‌اند، غذاها را آلوده کنند (۲۱). بی‌شک تمایل بسیار مردم برای خرید مواد غذایی آماده مصرف (مانند شیرینی) از نظر وجود طعم و رنگ جذاب آن، بهداشت ضعیف محیط و وسایل تهیه این مواد، شست‌وشوی نامناسب دست‌ها 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، مربوط به شیرینی خامه‌ای ۳۴/۶۴ درصد (۲۸۰) بود. آلودگی شیرینی خامه‌ای در دیگر مطالعات نیز بررسی و گزارش شده است. برای نمونه، در مطالعه نیک‌نیز و همکاران در تبریز میزان آلودگی ۳۱/۲ درصد بود که (۳۱/۲) درصد تقریباً مشابه مطالعه حاضر بود (۲۳). اما در مطالعه 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 مطالعه دیگری که میرزابیگی و همکاران در سال ۱۳۸۵ انجام داده‌اند، میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در مواد لبنی و شیرینی خامه‌ای عرضه‌شده در غرب تهران ۱۶ درصد بوده است (۲۶). در بازه سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۹۸ نیز 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). مطالعه دیگری در هند نشان داد که میزان آلودگی شیرینی‌های خامه‌ای به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۸۷ درصد است (۲۸). به‌رحال 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 در نظر گرفته می‌شود. به‌دلیل استفاده نادرست و زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها شمار باکتری‌های مقاوم به عوامل آنتی‌بیوتیکی به‌سرعت در حال افزایش است. ایزوله‌های غذایی در دهه اخیر افزایش ملاحظه‌پذیری در مقاومت علیه اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند (۲۹). غذاها فاکتور مهمی برای انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی‌اند. این انتقال ممکن است به‌وسیله باقیمانده آنتی‌بیوتیکی در غذا، انتقال عوامل بیماری‌زای مقاوم با منشأ غذایی یا خوردن سوبه‌های مقاوم میکروفلور اولیه غذاها و انتقال مقاومت به سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا انجام شود (۲۹).

در این مطالعه با توجه به نتایج حاصل از آزمایش دیسک‌گذاری و مقایسه آن با الگوی استاندارد مشخص گردید که هیچ یک از ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل و سفالوتین مقاوم نمی‌باشند، اما نسبت به پنی‌سیلین بیشترین مقاومت را دارا می‌باشد. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با مطالعه حسینی‌جزنی و همکاران در ارومیه مطابقت دارد. طبق گزارش آن‌ها، از ۱۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از نمونه‌های تحت بررسی ۱۰۰٪ نمونه‌ها 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 نمونه‌های تحت بررسی هیچ یک نسبت به متی‌سیلین مقاوم نبودند اما در مطالعه حاضر ۳۵٪ نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین (متی‌سیلین) مقاوم بودند. طبق مطالعات صورت

فصل‌های گرم است (۲۴). منشأ آلودگی شیرینی‌ها، به‌ویژه شیرینی خامه‌ای، می‌تواند به‌دلیل آلودگی اولیه‌ی شیر، استفاده از خامه‌های محلی و غیر پاستوریزه، رعایت نکردن چرخه 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 با توجه به آلودگی تقریباً زیاد شیرینی‌ها، ممکن است صنعتی کردن 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

مقاله 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

گرفته یکی از علت اصلی به وجود آمدن باکتری‌هایی با مقاومت بالا ناشی از تجویز خودسرانه و نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۳۰). در مطالعه Pereira و همکاران (۲۰۰۷) بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از مواد غذایی مختلف، ۳۸ درصد از آن‌ها به عنوان سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین گزارش شدند (۲۹).

مطالعات مختلف نشان داده است که اساسی‌ترین مرحله در عفونت‌زایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، توانایی میکروارگانیزم‌ها 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 جدا شده از مواد غذایی اثبات شده است. برای نمونه، Moretro و همکاران در مطالعه خود (۲۰۰۳) در نروژ نشان دادند که از میان ۱۴۴ سویه جدا شده 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 نسبت به شیرینی‌های خشک افزایش می‌دهند. خامه، به‌دلیل ایجاد شرایط مغذی و رطوبت مناسب، محیط مناسبی برای رشد بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌ویژه در

*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 PMID:PMC4702756
6. Gunawardena ND, Thevanesam V, Kanakarathne 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](http://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 enterotoxin A in cream filled cake. Int J Food Microbiol. 1995;26(2):259-63. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00122-M](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00122-M)
28. Desai B, Kamat MY. Recovery and characterization of enterotoxigenic 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 methicillin-susceptible and methicillin-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. Moretto 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>